



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDI MUTACIONAL D'EGFR I PIK3CA I D'HIPERMETILACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN BRCA1, EN CÀNCER DE MAMA, TIPUS "TRIPLE NEGATIU"

*Memòria presentada per **Esther Sanfeliu Torres**, per a optar al grau de Doctorat en Medicina.*

*Aquest treball s'ha dut a terme, sota la direcció del Dr. **Francisco Javier Andreu Navarro** i inscrita en el programa de doctorat en "Morfologia i Patologia Estructura i Molecular" al departament de "Ciències Morfològiques de la Universitat Autònoma de Barcelona",*

Esther Sanfeliu Torres

Francisco Javier Andreu Navarro

Barcelona, Juny 2016

Al meu marit

Als meus fills

I a la meva família

AGRAÏMENTS

Finalitzada aquesta Tesi Doctoral, volia recordar i agrair a totes les persones que m'han fet companyia i recolzat al llarg d'aquest trajecte. Aquest treball ha ocupat uns anys molt importants de la meva vida, durant els quals la meva família ha crescut en nombre.

L'inici va ser dur, no només pel sentiment de no dedicar prou temps a la família, sinó també per la incertesa que genera la investigació. Recordo, però, que alguns dels "mestres" que m'ajudaven, em van animar a ser perseverant amb el meu objectiu de treure'm la Tesi Doctoral. El més important és voler-ho fer, avançar de forma constant, i anar redefinint a mida que es van treien conclusions.

Tot va començar amb algun intent fallit, que per certes exigències i la meva situació personal, no podia assumir. L'objectiu de la investigació, que semblava desaparèixer, va donar pas a una altra possibilitat aparentment més factible i combinable amb la meva vida en aquell moment; iniciar la Tesi Doctoral amb un dels meus "mestres en la patologia", el patòleg Xavier Andreu, en una àrea de la patologia que m'atrau especialment com és "el càncer de mama", i introduint una àrea que sempre m'ha fascinat com és el "món de la biologia molecular" amb ajuda del biòleg Rubén Carrera, començant així un nou repte.

El principi va ser divertit perquè tot va començar amb la transcripció de l'inici de la base de dades dels estudis moleculars d'una llibreta a l'ordinador. Com que estava al mateix lloc on acabava la residència, no hi havia problemes de disponibilitat horària, així com, també disposava de la companyia de les meves resis petites, Ana i Marta, amb qui vaig compartir moltes hores.

La simpatia amb el càncer de mama i la curiositat d'un dels primers estudis de molecular realitzats al Taulí sobre la inestabilitat de microsatèl·lits ens va crear la curiositat de veure si entre els casos amb diagnòstic de Síndrome de Lynch hi havia història de càncer de mama, i en els pocs casos que teniem es va estudiar la situació de les proteïnes reparadores de l'ADN per immunohistoquímica, així com, també l'estat dels microsatèl·lits per molecular. Tot i que els primers resultats obtinguts de forma retrospectiva van ser molt

interessants, l'escassa possibilitat de reclutament de nous casos suposava un problema per a poder obtenir una Tesi Doctoral. Després de passar certa angoixa i inseguretats, el "meu mestre" em va ajudar a reorientar la Tesi cap a l'estudi d'algunes característiques dels càncers de mama tipus triple negatiu, sense perdre de vista el càncer de mama ni la molecular.

Partint d'una petita idea recentment descrita a la literatura, la vam anar ampliant fins a aconseguir la Tesi actual, amb l'esperança d'haver assolit els objectius.

Amb el canvi de plantejament de la tesi i el pas dels anys, no només va canviar el treball i la cerca de bibliografia, sinó també la meua situació personal i professional. A part de tenir un nen que anava creixent i a qui calia començar a educar, l'Albert, vaig tornar a ser mare de dues bessones; i una possible estabilitat laboral se'm brindava, encara que una mica més lluny de casa i del Taulí on he fet la Tesi Doctoral. Tot això feia que fos més difícil trobar el temps i la disponibilitat per a dur a terme la Tesi, però les ganes de fer-la i la disponibilitat adaptativa d'horaris, sobretot del biòleg, no em van deixar perdre l'esperança.

Ara bé, no tot han sigut alegries i bones cares durant el transcurs d'aquests anys, ja que en el moment de necessitar nous/més reactius per dur a terme els estudis moleculars o per a fer determinats estudis immunohistoquímics van sorgir alguns problemes, que fins i tot em van fer plantejar el possible abandonament de la Tesi. Per sort, gràcies a l'ajuda de nous coneguts com el Dr. Eugeni Saigi, el meu director el Dr. Xavier Andreu i el Dr. Carles Llebaria, el meu actual cap, vam poder solucionar-ho per a tirar endavant.

Així mateix, no ha sigut pas fàcil trobar el temps suficient per a fer tots els estudis, ja que tots, però sobretot el biòleg i els tècnics, estaven realitzant treball assistencial a "full time". És per això que a tots ells (el Rubén, la Mari Carmen, el Jose, la Rosa, la Maribel i l'Eli Campos), vull agrair-los la seva ajuda per a tirar endavant aquest projecte dia darrera dia, després de les meves contínues insistències i reclamacions. Sense oblidar de mencionar les hores extres, fora d'horari laboral, dedicades pel biòleg, i la facilitat del meu cap

i de la meua companya, Ana, per adaptar el meu horari laboral a les demandes de la Tesi.

Com és d'esperar, ja se sap que el final tarda a arribar, però quan comences a veure que tota la part pràctica d'estudis s'està acabant, i arriba el moment de començar a escriure la Tesi, la recta final s'ha d'iniciar amb un "calendari" aproximat d'objectius. Aquesta ha estat l'etapa més dura, degut a la pressió personal, les ganes d'acabar i els ànims de la família, del director, del biòleg i alguns amics.

Els últims mesos han sigut un sense fi d'escriptura i modificacions continues per a poder crear la Tesi. Amb la família i la vida laboral a jornada completa en un hospital diferent no ha estat gens fàcil trobar el temps per a fer-ho. Sort n'he tingut de l'amor i comprensió dels meus pares, Josep i M^a Esther, el meu marit Pere, la meua germana Anna i el meu cunyat Xavi, a qui vull agrair de tot cor que s'hagin cuidat més que mai dels meus fills, mentre jo arribava tard o "m'amagava" per treballar.

Així com, tampoc no puc oblidar de donar les gràcies a algunes de les meves companyes de feina, les meves amigues Ali, Mari, Jenny, Laura, Sandra i Leti, que m'han hagut d'aguantar en moments d'estrès, i que, en més d'una ocasió, m'han recordat que per molta feina laboral que tingués, l'horari s'havia acabat i tocava dedicar una estona a la Tesi. També, als patòlegs Irmgard Costa i Joan Carles Ferreres que m'han recolzat en moments de màxima desesperació. Així com, a alguna administrativa i tècnica que s'ha preocupat de preguntar-me com m'anava la Tesi; i sobretot, al meu cap, que ha escoltat dia a dia els meus problemes i modificacions d'horaris inesperades.

I per últim, vull tornar a donar les gràcies al meu director Xavier Andreu i al biòleg Rubén, que m'han hagut d'aguantar durant tots aquests anys, i especialment aquests darrers mesos, amb trucades i visites pesades i contínues, perquè m'ajudessin.

Aquesta Tesi està especialment dedicada a la meua família.

ÍNDEX

ÍNDEX

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓ | 3 |
| GENERALITATS..... | 3 |
| ANATOMIA..... | 5 |
| Embriologia: | 5 |
| Desenvolupament: | 5 |
| Morfologia:..... | 7 |
| CARCINOGENÈSIS..... | 9 |
| CÀNCER DE MAMA..... | 11 |
| CÀNCER DE MAMA VIST DES DE LA PATOLOGIA..... | 16 |
| EL CàNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIU (TNBC)..... | 30 |
| EGFR | 39 |
| PIK3CA | 41 |
| BRCA1 | 44 |
| Altres | 46 |
| HIPÒTESI DE TREBALL | 53 |
| OBJECTIUS..... | 57 |
| METODOLOGIA | 61 |
| AMBIT DE L'ESTUDI..... | 61 |
| DISSENY DE L'ESTUDI | 61 |
| PROCEDIMENT..... | 61 |
| RECOPIACIÓ DE DADES..... | 61 |
| REVISIÓ DE LES CARACTERÍSTIQUES HISTOLÒGIQUES..... | 62 |
| REALITZACIÓ D'ESTUDIS IMMUNOHISTOQUÍMICS..... | 62 |
| • Reactius dels estudis immunohistoquímics: | 63 |
| • Protocol dels estudis immunohistoquímics:..... | 63 |
| • Valoració dels resultat immunohistoquímics: | 65 |
| REALITZACIÓ D'ESTUDIS moleculars | 67 |
| • PROTOCOL D'EXTRACCIÓ D'ADN | 68 |
| • PCR..... | 70 |
| • TÈCNICA DE PIROSEQÜENCIACIÓ..... | 71 |

ÍNDIX

| | |
|--|------------|
| Mutacions <i>EGFR</i> | 75 |
| • Reactius:..... | 75 |
| • Protocol: | 75 |
| • Valoració dels resultat: | 76 |
| Mutacions <i>PIK3CA</i> | 76 |
| • Reactius:..... | 77 |
| • Protocol: | 77 |
| • Valoració dels resultat: | 79 |
| Hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> | 79 |
| • Reactius:..... | 80 |
| • Protocol: | 80 |
| • Valoració dels resultat: | 84 |
| RESULTATS | 87 |
| Resultats dades clíniques i quirúrgiques..... | 87 |
| Resultats dades histològiques..... | 89 |
| Resultats del seguiment/supervivència | 100 |
| Resultats dels estudis immunohistoquímics..... | 104 |
| Resultats dels estudis moleculars | 113 |
| Correlació de tots els resultats..... | 124 |
| DISCUSSIÓ | 131 |
| CONCLUSIONS | 147 |
| BIBLIOGRAFIA | 151 |

ÍNDEX D'AVREBIATURES

AL: imatges d'invasió angiolímfàtica
Angiolimf: angiolímfàtica present
antec: antecedent
BAG: biòpsia amb agulla gruixuda
BL: basal-like
Car: carcinoma
CDI: carcinoma ductal infiltrant
CGH: hibridació genòmica compartida
CID: carcinoma ductal in situ
CIL: carcinoma lobel·lar in situ
CK: citoqueratina
CLI: carcinoma lobel·lar infiltrant
Contralat: contralateral
Diag: diagnòstic
EGFR: receptor del factor de creixement epidèrmic
EXT: extensa
gg: ganglis
HDA: hiperplàsia ductal actípica
HE: hematoxilina-eosina
Her2: receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (Her2/neu)
HLA: hiperplàsia lobel·lar atípica
IHQ: immunohistoquímica
IM: immunomodulador
Ipsilat: ipsilateral
ITC: cèl·lules tumorals aïllades
LAR: luminal receptors andrògens
LOD: límit de detecció
LOH: pèrdua d'heterocigocitat
LPBC: carcinoma de mama predominantment limfocític
M: mesenquimal
MD: mama dreta
ME: mama esquerra
MIN: mínima
MOD: moderada
MSL: mesenquimal stem-like
NEG: negatiu/absència
Neo: neoplàsia
No inf: no informatiu, és a dir absència de mutació patogènica coneguda
Nº: número
NOS: no específic
NS: no estudiat

ÍNDEX

PARP: polimerasa-1 poliADP-ribosa
PN: imatges d'invasió perineural
POS: positiu/presència
POST-QT: post-quimioteràpia
preQT: quimioteràpia prèvia a cirurgia
RA: receptors d'andrògens
RE: receptors d'estrògens
RH: receptors hormonals
RPG: receptors de progesterona
SEOM: Societat Espanyola d'Oncologia Mèdica
SNC: sistema nerviós central
SPV: supervivència
TCGA: atlas genòmic del càncer
TDLU: unitats ducto-lobel·lars terminals
TILs: infiltració limfocítica tumoral
TNBC: càncer de mama triple negatiu
VSI: variant de significat incert
WT: "Wild-type" o absència de mutació

ÍNDIX

ÍNDIX FIGURES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Desenvolupament de la mama..... | 6 |
| Figura 2: Morfologia de la mama..... | 8 |
| Figura 3: Morfologia i sostenibilitat de la mama | 8 |
| Figura 4: Evolució de la carcinogènesis | 9 |
| Figura 5: Possible evolució de la carcinogènesis | 17 |
| Figura 6: Grau de diferenciació histològic del carcinoma de mama (Elston and Ellis 1991) | 17 |
| Figura 7: Sèrie històrica pròpia de l'Índex Pronòstic de Nottingham | 18 |
| Figura 8: Evolució en l'estudi molecular del càncer de mama..... | 20 |
| Figura 9: Evolució en el coneixement molecular de la patologia mamària neoplàsica..... | 21 |
| Figura 10: Classificació del càncer de mama segons la combinació del resultat immunohistoquímic descrit per Green et al, 2013..... | 23 |
| Figura 11: Esquema del Consens Internacional d'Experts de St. Gallen 2013 | 25 |
| Figura 12: Taula comparativa dels principals test d'expressió gènica utilitzats en càncer de mama | 26 |
| Figura 13: Subclassificació del càncer de mama en 10 clústers segons l'arquitectura genòmica i transcriptòmica | 28 |
| Figura 14: Estandarització aprovada per la valoració de TILs en càncer de mama..... | 29 |
| Figura 15: Taula de resultats d'una sèrie història pròpia (de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Hospital Universitari, compresa entre la dècada de 1990 i 2000) de la valoració del grau de resposta Miller & Payne en càncers de mama amb quimioteràpia neoadjuvant..... | 32 |
| Figura 16: Proposta d'estratificació del TNBC..... | 33 |

ÍNDIX

| | |
|--|----|
| Figura 17: Imatges de gràfiques de combinació de les diferents classificacions dels càncers de mama en els grups descrits per Lehmann | 34 |
| Figura 18: Mapa de microarrays per la classificació TNBC segons Lehmann. | 35 |
| Figura 19: Imatges microscòpiques d'hematoxilina-eosina i immuohistoquímiques utilitzades per a classificar els TNBC | 36 |
| Figura 20: Mapa dels diferents perfils d'expressió ARN dels 4 grups | 37 |
| Figura 21: Esquema del receptor de tirosina cinasa EGFR | 39 |
| Figura 22: Localització dels "hotspot" del gen <i>PIK3CA</i> (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) | 42 |
| Figura 23: Imatge-esquema del cromosoma 17, on es troba situat el gen <i>BRCA</i> | 44 |
| Figura 24: Resultats de les tècniques de seqüenciació massiva en càncer de mama | 47 |
| Figura 25: Imatges d'estudis moleculars on es localitza el carcinoma de mama tipus basal més proper a càncers colorectals, d'ovari o escamosos de pulmó que luminals de mama | 48 |
| Figura 26: Reacció química de conversió de bisulfit | 82 |

ÍNDIX

ÍNDIX TAULES

| | |
|--|-----|
| Taula 1: Aproximació immunohistoquímica als subtipus intrínsecs de càncer de mama | 24 |
| Taula 2: Característiques dels anticossos (AC) immunohistoquímics utilitzats . | 63 |
| Taula 3: Volum de mostra utilitzada pels estudis d'hipermetilació, segons la concentració de mostra de cada ADN a estudi | 83 |
| Taula 4: Relació entre cirurgia local de la mama i maneig axil·lar..... | 88 |
| Taula 5: Resultat de l'estudi ganglionar axil·lar | 88 |
| Taula 6: Relació entre grau i tipus histològic..... | 94 |
| Taula 7: Relació entre tipus histològic i presència de necrosi | 94 |
| Taula 8: Relació entre presència o no d'imatges d'invasió angiolímfàtica i els diferents tipus histològic i graus histològics..... | 94 |
| Taula 9: Relació entre presència o no d'imatges d'invasió perineural i els diferents tipus histològic i graus histològics..... | 96 |
| Taula 10: Característiques clinicopatològiques dels càncers de mama triple negatius de la sèrie (N=60) | 97 |
| Taula 11: Resultats histològics desglossats per tots els casos de la sèrie (N=60) | 98 |
| Taula 12: Relació del casos amb l'estadiatge oncològic patològic a nivell tumoral (pTNM) | 99 |
| Taula 13: Característiques clíniques i histològiques dels casos que han mort per càncer de mama | 101 |
| Taula 14: Característiques histològiques i clíniques dels casos que han mort per altres causes | 101 |
| Taula 15: Característiques de la relació dels casos amb neoplàsies prèvia .. | 102 |

ÍNDIX

| | |
|--|-----|
| Taula 16: Característiques de la relació dels casos amb neoplàsies sincròniques o posteriors | 102 |
| Taula 17: Algunes característiques dels casos amb mutacions patogèniques del gen <i>BRCA</i> | 102 |
| Taula 18: Algunes característiques dels casos amb estudi de <i>BRCA</i> amb absència de mutació patogènica coneguda (no informatiu) | 103 |
| Taula 19: Resultats globals dels paràmetres immunohistoquímics de tots els casos de la sèrie (N=60) | 107 |
| Taula 20: Relació de casos entre resultats de Ki67 amb CK5/6 i EGFR i RA | 112 |
| Taula 21: Relació de casos entre resultats de CK5/6 amb EGFR i RA..... | 112 |
| Taula 22: Relació de casos entre resultats de RA amb EGFR..... | 112 |
| Taula 23: Mutacions del gen <i>PIK3CA</i> presents amb percentatge de mostra tumoral mutada | 116 |
| Taula 24: Grau d'hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> present en els casos metilats amb les seves desviacions estàndards obtingudes..... | 119 |
| Taula 25: Resultats del grau d'hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> present en els seus estromes estudiats dels casos metilats amb les seves desviacions estàndards obtingudes | 121 |
| Taula 26: Resultats del grau d'hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> present en els tumors en comparació amb els resultats obtinguts en els seus estromes estudiats..... | 122 |
| Taula 27: Paràmetres moleculars dels càncers de mama triple negatius de la sèrie (N=60) | 122 |
| Taula 28: Relació dels resultats moleculars en tots els casos de la sèrie (N=60) | 123 |
| Taula 29: Relació d'algunes dades dels pacients morts per càncer de mama i els resultats dels estudis immunohistoquímics de CK5/6 i EGFR | 124 |

ÍNDEX

| | |
|--|-----|
| Taula 30: Estat d'expressió dels marcadors basals immunohistoquímics estudiats en els casos amb mutació patogènica de <i>BRCA</i> coneguda | 125 |
| Taula 31: Característiques clinicopatològiques i immunohistoquímiques en els casos amb hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> | 126 |
| Taula 32: Característiques clinicopatològiques i immunohistoquímiques en els casos amb mutació en algun dels exons estudiats del gen <i>PIK3CA</i> | 127 |
| Taula 33: Característiques clinicopatològiques i immunohistoquímiques en els casos amb expressió de receptors d'andrògens (RA>30%) | 127 |
| Taula 34: Comparativa de diversos paràmetres clinicopatològics descrits en diferents sèries amb pacients amb càncer de mama triple negatiu..... | 133 |
| Taula 35: Percentatges d'expressió de marcadors basals (CK5/6 i EGFR) en diverses publicacions | 138 |

ÍNDIX

ÍNDIX GRÀFICS

| | |
|---|-----|
| Gràfic 1: Sèrie històrica pròpia de les diferents corbes de supervivència de Kaplan-Meier, segons cada grup de risc de càncers de mama valorats segons l'Índex Pronòstics de Nottingham | 18 |
| Gràfic 2: Edats de diagnòstic de totes les pacients de la cohort | 87 |
| Gràfic 3: Divisió dels subtipus histològics presents en la sèrie..... | 89 |
| Gràfic 4: Mida tumoral de tots els casos de la cohort, a excepció dels 5 casos postquimioteràpia i d'un cas no operat que només disposem de la BAG . | 96 |
| Gràfic 5: Resultats de la valoració quantativa individual del resultat immunohistoquímic de l'índex proliferatiu Ki67 de tots els casos de la cohort..... | 104 |
| Gràfic 6: Classificació en grups del resultat immunohistoquímic de l'índex proliferatiu Ki67 | 105 |
| Gràfic 7: Classificació en grups del resultat immunohistoquímic de CK5/6 segons variable qualitativa i quantitativa..... | 105 |
| Gràfic 8: Classificació en grups del resultat immunohistoquímic d'EGFR segons variable qualitativa i quantitativa | 106 |
| Gràfic 9: Classificació dels resultats immunohistoquímic de Receptors d'Andrògens..... | 106 |
| Gràfic 10: Correlació dels casos segons expressió dicotòmica de CK5/6 i EGFR | 112 |

ÍNDIX

ÍNDIX D'IMATGES

| | |
|--|-----|
| Imatge 1: Imatges histològiques dels tipus més freqüents de carcinomes presents en la cohort..... | 90 |
| Imatge 2: Imatges histològiques de carcinomes medul·lars de la cohort | 91 |
| Imatge 3: Imatges histològiques dels subtipus de carcinomes especials observats en la cohort..... | 92 |
| Imatge 4: Imatges histològiques dels subtipus de carcinomes especials observats en la cohort..... | 93 |
| Imatge 5: Imatges histològiques dels diferents graus histològics observats en la sèrie | 95 |
| Imatge 6: Imatges histològiques dels diferents graus de necrosi observats en la sèrie | 95 |
| Imatge 7: Imatges de tincions immunohistoquímiques dels diferents valors d'índex proliferatiu Ki67 observats en la sèrie..... | 108 |
| Imatge 8: Imatges de tincions immunohistoquímiques de les diferents valoracions de CK5/6 observades en la sèrie | 109 |
| Imatge 9: Imatges de tincions immunohistoquímiques de les diferents valoracions d'EGFR observades en la sèrie | 110 |
| Imatge 10: Imatges de tincions immunohistoquímiques de les diferents valoracions de RA observades en la sèrie | 111 |
| Imatge 11: Exemple de lectura obtinguda amb l'espectrofotòmetre, que mostra la corba de quantitat d'ADN d'una mostra de la cohort | 113 |
| Imatge 12: Pirogrames de resultat de l'estudi mutacional d' <i>EGFR</i> per piroseqüenciació | 114 |
| Imatge 13: Pirogrames de resultats mutats de <i>PIK3CA</i> de la cohort per piroseqüenciació, així com un cas wild-type de cada una de les mutacions | 117 |

ÍNDIX

| | |
|---|-----|
| Imatge 14: Pirogrames d'alguns resultats metilats de l'estudi d'hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> per piroseqüenciació | 120 |
| Imatge 15: Pirogrames d'alguns del estudis d'hipermetilació del promotor del gen <i>BRCA1</i> en estromes dels casos metilats | 121 |

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

GENERALITATS

El càncer de mama és una malaltia molt comú i a la vegada devastadora, que necessita una considerable millora en les estratègies preventives, diagnòstiques i terapèutiques. La principal dificultat en el seu coneixement és la gran heterogenicitat clínica i biològica.

El càncer de mama és la neoplàsia més freqüents en el sexe femení i es troba en primera posició entre les causes de mort per càncer en dones adultes **(Tot, 2011)**.

Les últimes dades publicades per la SEOM (Societat Espanyola d'Oncologia Mèdica) al 2016 de les xifres de càncer a Espanya informen d'una incidència en les dones al 2012 de 25.215 casos nous de càncer de mama (28.99% de tots els nous casos de càncer en dones al 2012), seguit del de còlon, pulmó, cèrvix i estómac. Sent la mortalitat per càncer en dones al 2012 en primer lloc per càncer de mama, seguit de còlon i pulmó **(SEOM, 2016)**.

Encara que hi ha hagut una gran reducció en la mortalitat per càncer de mama amb els tractaments actuals, s'estimen més de 450.000 morts per càncer de mama a l'any en el món. L'explicació més plausible és probablement deguda a la manca del coneixement del mapa complet de la heterogenicitat biològica del càncer de mama **(Prat, 2015)**.

Per tal de poder entendre el càncer de mama, primer de tot hem de conèixer i entendre on neix (l'anatomia de la mama) i com neix (la carcinogènesis), seguit de saber què és, quina transcendència té i què es pot fer amb ell.

Fa només tres dècades que els clínics disposaven de molt poques eines per caracteritzar el càncer de mama. En el seu inici, l'únic mètode establert i reconegut era la morfologia, en la qual els patòlegs s'esforçaven a fer les descripcions histològiques per tal de classificar els tumors, però la capacitat de transmetre factors pronòstics i indicacions terapèutiques era limitada. Una revolució va ser el descobriment de l'expressió de receptors d'estrògens per part de les cèl·lules tumorals, ja que esdevingué un dels primers marcadors útils en indicar una teràpia específica. A partir d'aquí s'inicià la cerca de nous

INTRODUCCIÓ

biomarcadors en les cèl·lules neoplàsiques, basats en tincions immunohistoquímiques, que han permès arribar fins al mètode tradicional d'estudi del càncer de mama, basat en les característiques histològiques i l'expressió immunohistoquímica de 4 marcadors (receptors d'estrògens, receptors de progesterona, Her2 i Ki67), que permet subclassificar les pacients en diferents grups, amb pronòstic i dianes terapèutiques diferents.

Ara bé, el coneixement del càncer de mama no s'acaba aquí, ja que la introducció de la genòmica a finals del segle XX ha permès observar una nova perspectiva de la malaltia, que tot just comença a sorgir, plantejant nous reptes i tenint un gran camí per endavant.

ANATOMIA

EMBRIOLOGIA:

La glàndula mamària és un derivat de l'epiteli glandular extern i és el resultat del desenvolupament de les glàndules sudorípares de la pell modificada adaptades a la producció de llet. A l'inici es produeixen una sèrie de processos independents de les influències hormonals, començant amb el desenvolupament fetal de les crestes mamàries ectodèrmiques primitives en la regió pectoral, que pateixen un engruiximent, seguit de creixement tridimensional i diferenciació, i la posterior formació de les polpes epitelials i finalment l'areolar. Seguidament, una mica més enllà de la meitat de la gestació, les hormones sexuals placentàries passen a la circulació fetal i indueixen la canalització dels conductes lactífers, de manera que quan el fetus arriba a terme, la glàndula mamària consta de 15 a 25 conductes galactòfors que desemboquen paral·lels en el centre de l'arèola (**Sadler, 1996**).

DESENVOLUPAMENT:

En el període neonatal, la mama està formada per un sistema rudimentari de conductes, sense diferències entre l'home i la dona, que consisteixen en petites elevacions semihemisfèriques, dures al tacte i de lliure mobilitat.

Histològicament, estan formades per una sèria de canals ramificats amb cèl·lules basals que taponen els seus extrems, i que formaran els conductes galactòfors i els lòbuls glandulars.

Durant la infància i el període prepuberal es produeix un lent però progressiu creixement i ramificació dels conductes, afectant als dos sexes.

Histològicament, estan formades per un escàs nombre de conductes rudimentaris ramificats, recoberts per un epiteli pla i rodejats per teixit connectiu col·lagen.

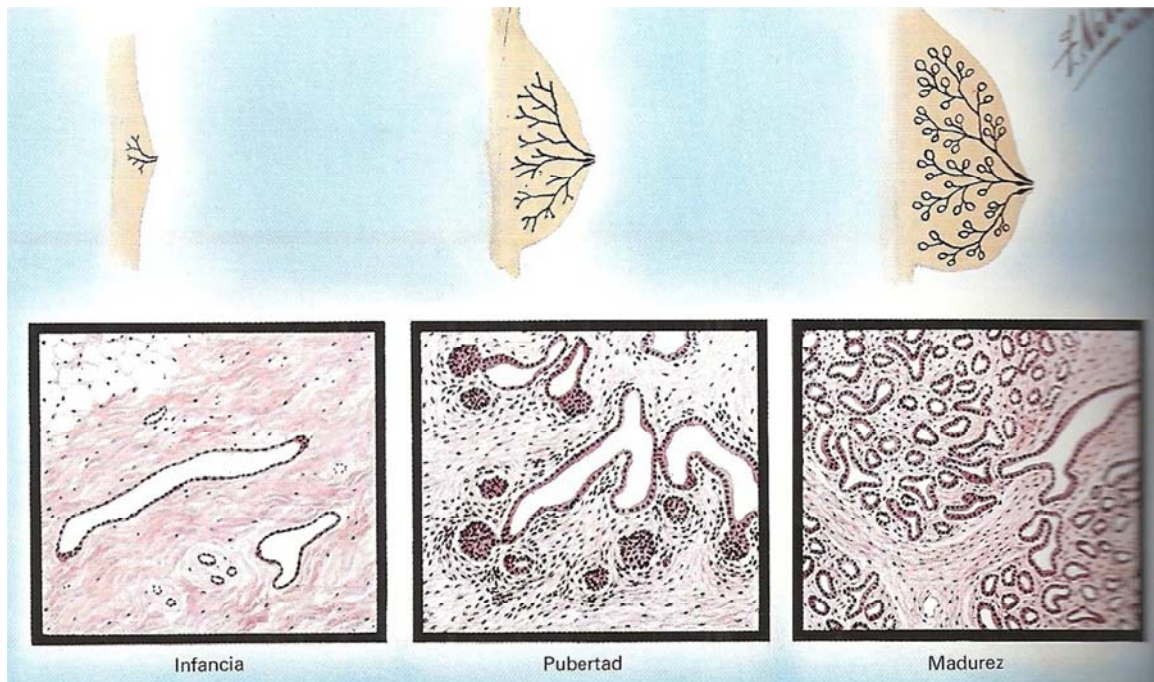
INTRODUCCIÓ

A partir d'aquí, l'home té un escàs desenvolupament posterior i manté unes mames rudimentàries, però amb cèl·lules en el seu interior que si s'estimulessin adequadament podrien desenvolupar glàndules mamàries adultes.

Mentre que en la dona, durant la pubertat, l'acció coordinada dels ovaris (estrògens i progesterona), juntament amb la hipòfisis (hormones estimulants del fol·licle "FSH" i luteïnitzants "LH") provoquen el desenvolupament, creixement i maduració de les mames i els òrgans genitals.

Histològicament, primer, els conductes mamaris s'allarguen i les cèl·lules epitelials que els formen es multipliquen i proliferen, formant el teixit mamari ducto-lobel·lar-alveolar, acompanyant-se del creixement del teixit fibrós. Després, es formen els múltiples lòbuls i acins (Figura 1) **(Modolell, 2015; Netter, 2001)**.

Figura 1: Desenvolupament de la mama



INTRODUCCIÓ

MORFOLOGIA:

La mama adulta és una estructura glandular, parella i simètrica, situada en la part anterior del tòrax, extenent-se des de la 2^a a la 6-7^a costella, i des del marge lateral de l'estern fins la línia axil·lar anterior o mitja. Acompanyada d'una prolongació axil·lar a la que se la coneix com a "cua de la mama o de Spencer". És de localització subdèrmica, està revestida per les fàscies pectorals i el seu suport bé donat pels lligaments de Cooper.

El parènquima mamari consta d'uns 15 a 20 lòbuls, formats cada un per un nombre de 20 a 40 lobulets, que a la vegada consten de 10 a 100 alvèols. L'estroma i el teixit subcutani, que és el responsable de donar volum a la mama, conté grassa, teixit connectiu, vasos, nervis i limfàtics.

El nombre de túbuls i la mida dels acins mamaris varia individualment i durant els diferents períodes de la vida, sent més nombrosos durant l'edat reproductiva i assolint el desenvolupament fisiològic total durant la gestació i la lactància.

La pell de la mama és fina i conté fol·licles pilosos i glàndules; però a nivell de l'arèola és pigmentada, amb nombroses papil·les i terminacions nervioses, sense fol·licles ni glàndules, i descansa sobre el múscul areolar de Sappey, on es troben els tubercles de Montgomery.

El reg sanguini procedeix de les artèries mamàries interna i toràcica lateral. El drenatge venós de les branques perforants de la vena toràcica interna i les branques perforants de les venes intercostals posteriors. La innervació ve donada pels primers 6 nervis intercostals i de la branca supraclavicular del plexe braquial. El drenatge limfàtic està format per dos plexes, un superficial o subareolar i l'altre profund o aponeuròtic **(Modolell, 2015)**.

La unitat morfofuncionant de l'òrgan és una simple glàndula amb una complexa estructura ramificada, formada per dues grans parts: les unitats ducto-lobel·lars terminals (TDLU) i el sistema del gran ducte segmentari i col·lector o galactòfer, que desemboca al mugró, entre ells hi ha el si lactífer (Figures 2 i 3).

El desenvolupament de la mama, depèn de l'estreta interacció dels teixits especialitzats epitelials i mesequimals presents. Les unitats ducto-lobel·lars tenen un sistema epitelial especialitzat, format per dues capes de cèl·lules amb característiques ultraestructurals i immunohistoquímiques diferents: una capa

INTRODUCCIÓ

interna de cèl·lules epitelials, amb funcions secretores i absortives, i una capa externa de cèl·lules mioepitelials (Rosai, 2004).

Figura 2: Morfologia de la mama

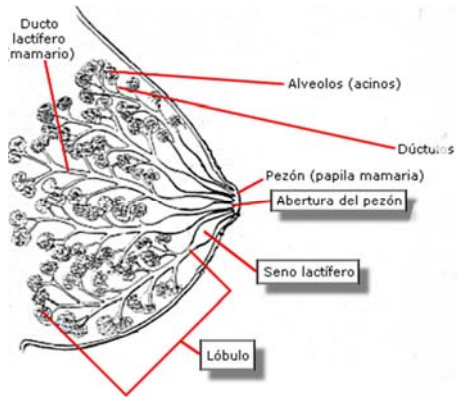
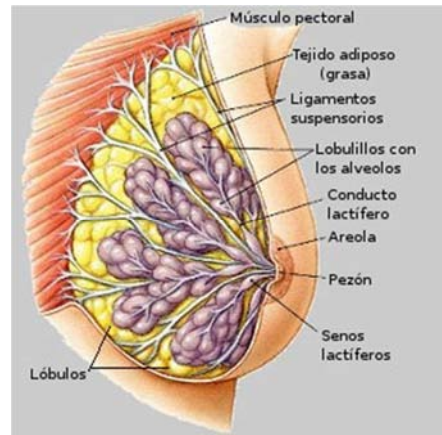


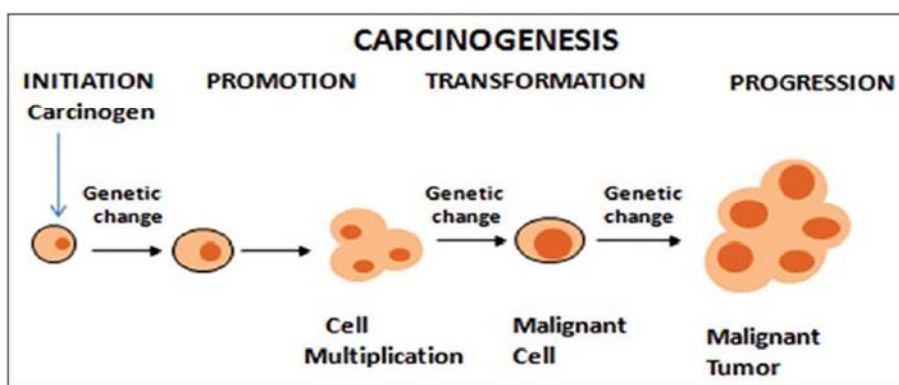
Figura 3: Morfologia i sostenibilitat de la mama



CARCINOGENÈSIS

El terme carcinogènesis o oncogènesis fa referència literal al procés pel qual una cèl·lula normal es converteix en una cèl·lula cancerosa. El càncer representa un desordre en el creixement cel·lular, caracteritzat per una proliferació incontrolada de les cèl·lules d'un determinat teixit, amb capacitat d'invasió i destrucció dels teixits adjacents i disseminació a distància. Per tant, es tracta d'un procés evolutiu que consta de múltiples etapes que es poden englobar en iniciació, promoció i progressió tumoral (Figura 4).

Figura 4: Evolució de la carcinogènesis



Els processos cel·lulars de proliferació, diferenciació i mort programada o apoptosi són essencials per la formació, el manteniment de la funció i els fenòmens de reparació de tots els teixits i òrgans de l'organisme. En condicions normals es troben estrictament regulats, mentre que la seva alteració a nivell genètic i epigenètic (sobretot la metilació de l'ADN) constitueixen la base del mecanisme molecular del càncer (**Martin de Civetta, 2011**).

Finalment, l'aparició del càncer en la població general es pot explicar pels canvis genètics somàtics adquirits i/o la susceptibilitat genètica, que pot ser de baixa penetrància (quan mostren elevada freqüència de variants al·lèliques i que confereixen un baix risc: són càncers amb absència d'història familiar, que apareixen en edat avançada i probablement estan influenciats per altres factors genètics i/o ambientals) o d'alta penetrància (quan mostren alt risc de desenvolupar càncer, sent molt rara la seva troballa en la població general).

En la mama es reconeixen diferents neoplàsies que deriven dels diferents teixits que la formen, la més freqüent és el carcinoma, que neix de les cèl·lules de

INTRODUCCIÓ

l'epiteli glandular, sobretot situades a les unitats ducto-lobel·lars terminals. El càncer de mama és un procés neoplàsic d'etiologia multifactorial, on diversos factors actuen de forma simultània i seqüencial. La naturalesa d'aquests factors es variada i es pot classificar en tres grups: endocrins, genètics i ambientals, que actuen amb una clara interdependència **(Modolell, 2015)**.

CÀNCER DE MAMA

Ja hem dit que el càncer de mama és la neoplàsia més freqüent en el sexe femení i la primera causa de mort en dones adultes. Se sap que la incidència de càncer de mama varia entre els continents, sent major en països occidentals i desenvolupats, com Europa i Amèrica del nord.

Els primers registres d'incidència del càncer de mama es coneix des del voltant dels anys 1930 amb un dràstic increment als anys 1980, seguit d'una estabilització entre 2001 i 2003, amb inici d'una davallada a partir d'aquí. Malgrat tot, s'ha de mencionar que en els darrers 10 anys, s'ha produït un discret augment de la seva incidència, probablement atribuïble a la major exposició a factors de risc i a la introducció de mètodes de diagnòstic precoç.

A Espanya el càncer de mama suposa un 29% de tots els càncers. Encara que la mortalitat de càncer de mama ha disminuït en els últims anys, gràcies als programes de cribatge i a la millora del tractament, segueix sent la primera causa de mort per càncer entre les dones a Espanya.

L'edat de màxima incidència es troba per sobre els 50 anys, però no es pot oblidar que aproximadament un 10% de dones són diagnosticades de càncer de mama abans dels 40 anys (**Santaballa, 2015**).

La supervivència mitja relativa de càncer de mama després de cinc anys és d'un 89.2% de manera global, però aquesta està influenciada per l'estadi en què s'ha diagnosticat el càncer. La supervivència en estadis I és de més del 98% i en canvi en estadis III la supervivència descendeix al 24% (**Santaballa, 2015**).

La causa o causes que produeixen el càncer de mama encara no estan aclarides, malgrat que al llarg de les dècades s'han descrit varis factors de risc, com són història familiar prèvia de càncer de mama, sobretot en familiars de primer grau, lesions proliferatives de la mama, alta densitat mamogràfica, exposició a estrògens endògens (menarquia precoç, menopausa tardana, teràpia hormonal substitutiva en la postmenopausa, la nul·liparitat i edat major de primer fill), alts nivells d'exposició a radiacions, el consum d'alcohol i l'obesitat (**Santaballa, 2015**). Cal mencionar que només un petit percentatge de càncers de mama s'han pogut atribuir a alguns d'aquests factors de risc

INTRODUCCIÓ

coneguts. És per això, que hi ha investigadors epidemiològics que plantegen com a un altre important factor de risc marcadors intrauterins, com el pes al naixement, edat paterna, longitud del neonat al naixement, exposició a dietilestilbestrol, bessons i preclàmpsia/eclàmpsia **(Tot, 2011)**.

El càncer hereditari és aquell que té el seu origen en alguna mutació genètica, en mama, s'estima que entre un 5-10% són hereditaris. D'aquests el 20-25% de les mutacions responsables del càncer de mama hereditari succeeixen en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, on el risc de desenvolupar un càncer de mama al llarg de la vida en les dones portadores és del voltant del 60% i 50%, respectivament **(Santaballa, 2015)**.

Degut a que el càncer de mama és un important problema de salut, tant per la seva elevada incidència i mortalitat, com per les repercussions físiques, psicològiques i econòmiques en la població, és important un bon diagnòstic precoç, ja que un dels principals factors pronòstics és l'estadi de la malaltia en el moment del diagnòstic. Actualment, s'estan utilitzant programes de cribatge amb la mamografia com a prova selectiva entre els 40 i 74 anys, però sobretot en majors de 50 anys. Tenint present que existeix un risc de fals negatiu de fins un 20% de casos de càncer de mama que no es detecten, sobretot degut a mames d'alta densitat i més freqüentment en noies joves **(NIH, 2014)**.

Els principals símptomes són la palpació d'un nòdul i la retracció de la pell o el mugró, els quals avui dia, malgrat els programes de cribatge implementats, encara en un cert percentatge no despreciable de pacients segueixen sent el signe d'alarma associats a presència de procés neoplàsic no conegut.

El diagnòstic de càncer de mama, sovint parteix d'una sospita radiològica, que sempre requereix d'una confirmació histològica de la zona sospitosa, que a la vegada dóna informació del tipus tumoral, grau d'agressivitat i permet realitzar estudis immunohistoquímics (com a mínim, de receptors hormonals, Her2 i índex proliferatiu de Ki67) per a conèixer possibles tractaments. Seguida d'un estudi d'extensió, sobretot axil·lar, utilitzant diferents mètodes d'imatge segons la situació de cada pacient.

INTRODUCCIÓ

El sistema d'estadiatge més conegut i utilitzat en el càncer de mama és la classificació TNM, publicada per la “*American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control*” (Lakhani, 2012), basada en informació clínica i patològica, que inclou la mida tumoral (T), l'afectació ganglionar axil·lar regional (N) i l'afectació a distància (M). La seva terminologia i els seus estadis es descriuen a continuació:

TNM descripcions:

- m múltiples focus de carcinoma invasiu
- r Recurrent
- y post-tractament

Tumor primari, valoració patològica (pT)

- pTx Tumor primari no avaluable
- pT0 No hi ha evidència de tumor primari
- pTis Carcinoma in situ
- pTis (Paget) Malaltia de Paget del mugró no associada a carcinoma invasiu i/o carcinoma in situ en el parènquima mamari subjacent
- pT1 Tumor ≤ 20 mm de diàmetre màxim
 - pT1mi Tumor ≤ 1 mm de diàmetre màxim (microinvasiu)
 - pT1a Tumor > 1 mm però ≤ 5 mm de diàmetre màxim
 - pT1b Tumor > 5 mm però ≤ 10 mm de diàmetre màxim
 - pT1c Tumor > 10 mm però ≤ 20 mm de diàmetre màxim
- pT2 Tumor > 20 mm però ≤ 50 mm de diàmetre màxim
- pT3 Tumor > 50 mm de diàmetre màxim
- pT4 Tumor de qualsevol mida amb afectació directe de paret toràcica i/o cutània (ulceració o nòduls). La invasió única de la dermis no es considera un pT4
 - pT4a Extensió a paret toràcica, sense incloure adhesió o invasió de múscul pectoral
 - pT4b Ulceració i/o nòduls satèl·lits i/o edema (inclouen pell de taronja) cutani, sense complir criteris de carcinoma inflamatori
 - pT4c Els dos estadis T4a i T4b
 - pT4d Carcinoma inflamatori

Ganglis limfàtics regionals “axil·lars”, valoració patològica (pN)

- (sn) gangli sentinella
- (i) estudi immunohistoquímic (IHQ)
- pNx La cadena ganglionar no es avaluable
- pN0 Absència de metàstasis a ganglis limfàtics regionals identificades histològicament.
 - pN0 (i-) No hi ha metàstasis ganglionar histològica ni demostrada IHQ
 - pN0 (i+) Presència de cèl·lules malignes en gangli/s limfàtic regional no major a 0.2 mm o no major a 200 cèl·lules (detectades per HE o IHQ, incloent ITC)

INTRODUCCIÓ

| | |
|-------|--|
| pN1mi | Micrometàstasis (cèl·lules malignes en gangli/s limfàtic regional major de 0.2 mm o major a 200 cèl·lules) |
| pN1a | Metàstasis de 1 a 3 ganglis limfàtics axil·lars, amb al menys una metàstasis major de 0.2 mm |
| pN2a | Metàstasis de 4 a 9 ganglis limfàtics axil·lars |
| pN3a | Metàstasis en 10 o més ganglis limfàtics axil·lars |

Es coneixen alguns factors pronòstics, que seleccionen les pacient que es poden beneficiar d'un tractament adjuvant, i alguns predictius, que identifiquen el millor tractament per la pacient. Encara que la majoria d'aquests factors s'obtenen en la biòpsia, alguns són intrínsecs de les pacients com l'edat i l'estat menopàusic (a més jove més risc). Són factors coneguts de mal pronòstic: major mida tumoral, major nombre de ganglis afectes, menor grau de diferenciació, invasió vasculolinfàtica, absència d'expressió de receptors hormonals i Her2 (encara que l'expressió d'Her2 és un factor de mal pronòstic, existeix un tractament dirigit "Trastuzumab" que prediu la seva resposta i ha revertit el seu mal pronòstic) i el subtipus triple negatiu.

El tractament del càncer de mama s'ha d'individualitzar i depèn de múltiples factors, actualment es recomana la discussió dels casos en comitès multidisciplinaris (que normalment inclouen radiòlegs, oncòlegs, radioterapeutes, cirurgians/ginecòlegs i patòlegs).

El tractament pot ser:

- a) Quirúrgic: és quan s'actua sobre la malaltia i pot ser a diferents nivells, segons les característiques del tumor. A nivell de:
 - a. Mamari:
 - i. Conservador: l'extirpació del tumor amb una petita quantitat de teixit sa del voltant.
 - ii. Mastectomia: l'extirpació de tota la mama amb o sense reconstrucció, immediat o diferida.
 - b. Axil·lar:
 - i. Biòpsia de gangli sentinella: consisteix en extreure el primer gangli que rep el drenatge limfàtic del tumor, el qual ha estat marcat prèviament amb un radiotrazador o tinta.

INTRODUCCIÓ

- ii. Limfadenectomia: buidament de la regió axil·lar per analitzar els ganglis, amb possible risc d'efectes secundaris de la regió.
- b) Radioteràpia: és la utilització de radiacions per destruir les cèl·lules tumorals o impedir que creixin. Aquesta pot ser adjuvant, pal·liativa, externa o interna.
- c) Sistèmic o mèdic: és aquell que actua sobre tot l'organisme, via oral o intravenosa, en l'estadi precoç o en malaltia disseminada, per tal de disminuir el risc de recaiguda.
- d) Neoadjuvant: és aquell tractament sistèmic que s'administra prèviament a la cirurgia, normalment amb l'objectiu de facilitar-la o permetre-la o veure la sensibilitat al fàrmac utilitzat.

El seguiment del càncer de mama és més estret durant els primers cinc anys i després passa a ser anual, amb diferents proves necessàries suplementàries segons el tipus de tractament que rebí la pacient (**Santaballa, 2015**).

CÀNCER DE MAMA VIST DES DE LA PATOLOGIA

El càncer de mama és una malaltia molt heterogènia tant a nivell histològic, molecular/genètic com clínic amb resposta variable a diferents tractaments, té un ampli espectre de subtipus morfològics i un gran ventall de comportaments biològics. Aquest càncer està sotmès a nivell molecular a una complexa xarxa d'alteracions genètiques que afecten als processos cel·lulars. De manera, que l'estudi de la genètica del càncer ha tingut un gran impacte en el coneixement de la progressió i el desenvolupament de la neoplàsia **(Simpson, 2005)**.

Al llarg del temps, els patòlegs han intentat desenvolupar sistemes de classificació relacionats amb el pronòstic d'aquesta malaltia, la majoria d'ells derivats de l'exhaustiu estudi histològic del tumor. Se sap que algunes dades, com el grau histològic, l'estadiatge (mida tumoral i metastasis ganglionars) i el resultat immunohistoquímic dels tres marcadors reconeguts (l'expressió de receptors hormonals, d'estrògens i/o progesterona, i la sobreexpressió d'Her2), són indicadors de pronòstic i prediuen possibles respostes a determinats tractaments. Encara que, segueixen existint limitacions, per les mateixes situacions clíniques i el comportament intrínsec de cada tumor. Això, és molt evident en carcinomes ductals invasius de tipus no específic (NOS), el subtipus més habitual, on tumors amb el mateix grau histològic poden tenir dràstiques diferències en les seves evolucions i les respostes als tractaments sistèmics **(Badve, 2011)**. Estudis moleculars, basats especialment en estudis d'expressió gènica, hibridació genòmica comparativa o de seqüenciació genètica, han permès, per una banda, ampliar els coneixements sobre les lesions precursors del càncer de mama i, per una altra banda, han redefinit el model de progressió de la carcinogènesis mamària.

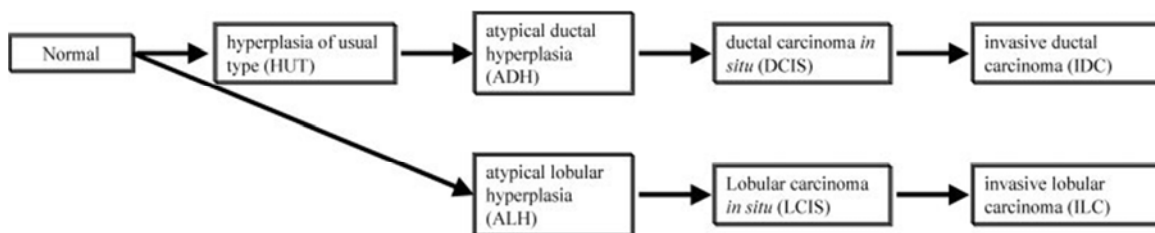
Per exemple, no hi ha dubte que els estudis de microarrays i els seus derivats han contribuït en el coneixement del càncer de mama, demostrant l'evident heterogenicitat a nivell molecular d'aquests tumors: mostrant fonamentals diferències entre els tumors receptors d'estrògens positius i negatius; que existeixen diferents subtipus moleculars de càncer de mama; i que els tipus histològics especials mostren diferents entitats a nivell molecular. A més, han

INTRODUCCIÓ

ajudat a desenvolupar la taxonòmica molecular utilitzada en tests clínics i a conèixer el pronòstic a través de “signatures genètiques” (Weigelt, 2010).

Històricament, la progressió del càncer de mama s’ha vist com un procés de múltiples etapes, similar al model de “Vogelstein” descrit en la carcinogènesis colònica, d’una única via que progressa des de la mama normal, a la hiperplàsia sense atípia, al carcinoma in situ, al carcinoma invasiu i a la metastasi (Simpson, 2005) (Figura 5).

Figura 5: Possible evolució de la carcinogènesis



Malgrat el gran avanç que han comportat els estudis moleculars en el coneixement i el maneig clínic del càncer de mama, l'estudi morfològic rutinari clàssic dels tumors de mama mitjançant el microscopi òptic continua sent l'eina imprescindible en el diagnòstic, classificació i tractament d'aquesta patologia.

La classificació del càncer de mama en grups pronòstics s'ha fet tradicionalment amb els subgrups histològics, sent un important factor predictiu el grau de diferenciació histològic de “Bloom and Richardson”, després modificat per “Elston and Ellis” (Figura 6), basat en la proporció de ductes que es formen, el grau de pleomorfisme nuclear i el número de mitosis (Bloom, 1957; Elston 1991).

Figura 6: Grau de diferenciació histològic del carcinoma de mama (Elston and Ellis 1991)

Tabla 2: Grado histológico del carcinoma de mama (Elston y Ellis, 1991) ([7256])

Formación tubular y/o acinar: (> 75% del tumor, 1 punto; 10-75%, 2 puntos; < 10%, 3 puntos)

Pleomorfismo nuclear: (núcleos uniformes en tamaño y forma, pequeños y cromatina dispersa, sin nucleolo prominente, 1 punto; núcleos más pleomórficos, con nucleolos y son de tamaño intermedio y variable, 2 puntos; núcleos grandes, de tamaños y formas diversas, con uno o más nucleolos prominentes y cromatina grosera, 3 puntos)

Número de mitosis: Localizar, revisando la preparación a bajo aumento (x100), las áreas mitóticamente más activas y contar solo las figuras de mitosis bien definidas, a gran aumento (campo de gran aumento –CGA- o x400); (0-9 mitosis/10 CGA (0.59 mm de diámetro de campo o 0.274 mm² de área de campo), 1 punto; 10-19 mitosis/10CGA, 2 puntos; ≥20 mitosis/10CGA, 3 puntos)

Grado final combinado: Resulta de sumar los puntos adjudicados a cada uno de los tres parámetros:

Si la suma final es 3-5 ⇒ grado 1 (carcinoma de bajo grado o bien diferenciado)

Si la suma final es 6-7 ⇒ grado 2 (carcinoma de grado intermedio o moderadamente diferenciado)

Si la suma final es 8-9 ⇒ grado 3 (carcinoma de alto grado o pobremente diferenciado)

INTRODUCCIÓ

Aquest grau de diferenciació histològica juntament amb l'estat ganglionar, formen el conegut "Índex Pronòstic de Nottingham" que valora

$$\text{"ipN} = \text{mida tumoral (cm)} \times 0.2 + \text{estadi ganglionar} + \text{grau histològic"}$$

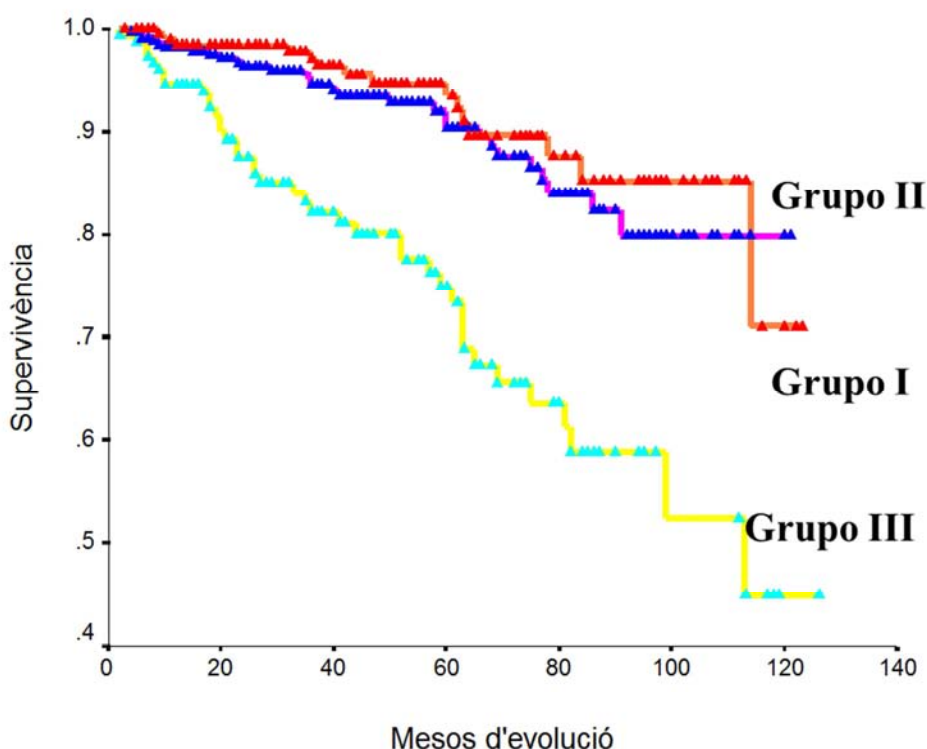
i pot ser utilitzat per a prendre decisions clíniques, ja que divideix les pacients en tres grups de risc: risc baix-I (ipN $\leq 3,4$), risc intermig-II ($> 3,4$ però $\leq 5,4$) i risc elevat-III ($> 5,4$). Sèrie històrica (Figura 7 i Gràfic 1).

Figura 7: Sèrie històrica pròpia de l'Índex Pronòstic de Nottingham

Índex Pronòstic Nottingham

| | Freqüència | Percentatge |
|----------------------|------------|-------------|
| Risc baix | 212 | 29.5 |
| Risc intermig | 350 | 48.7 |
| Risc elevat | 157 | 21.8 |
| Total | 719 | 100.0 |

Gràfic 1: Sèrie històrica pròpia de les diferents corbes de supervivència de Kaplan-Meier, segons cada grup de risc de càncers de mama valorats segons l'Índex Pronòstic de Nottingham



Presentem una taula de resultats (Figura 7), juntament amb les seves corresponents corbes de Kaplan-Meier (Gràfic 1) d'una sèrie històrica pròpia (de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Hospital Universitari, compresa entre la dècada dels anys 1990 i 2000).

INTRODUCCIÓ

Una vegada descrites les característiques histològiques clàssiques del tumor, s'afegeixen els marcadors tradicionals, basats en tres estudis immunohistoquímics, de receptors d'estrògens (RE), receptors de progesterona (RPG) i del receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (Her2/neu), els quals també orienten sobre el pronòstic i resposta a determinats tractaments. Se sap que els tumors que expressen RE responen a teràpies endocrines i encara que poden tenir recurrències acostumen a tenir llargues supervivències; els tumors amb absència d'expressió de RPG tenen menor resposta a la teràpia endocrina i pitjor pronòstic; els tumors amb sobreexpressió Her2, encara que tenen pitjor pronòstic, es prediu una bona resposta al tractament amb anticossos monoclonals anti-Her2 (Traztuzumab); els tumors amb absència d'expressió dels tres marcadors, coneguts com a "triple negatiu", tenen pitjor pronòstic. Existeix un quart marcador, el Ki67, que és un marcador de proliferació cel·lular dirigit contra núcleoproteïnes durant la interfase i durant la divisió es recol·loca a la superfície dels cromosomes; de manera que es un marcador que es troba en totes les cèl·lules durant les fases de divisió dels cicles. És per això, que els tumors amb alt índex proliferatiu de Ki67 s'associen a pitjor pronòstic, encara que són tumors amb molt bona resposta clínica a combinacions de quimioteràpies per la seva elevada proliferació, sent un predictor independent de la resposta patològica completa o de la supervivència lliure de malaltia o de les recurrències locoregionals. El problema és que la seva valoració no està ben estandarditzada, ja que és patòleg dependent i no hi ha un llindar clarament definit **(Yadav, 2015)**.

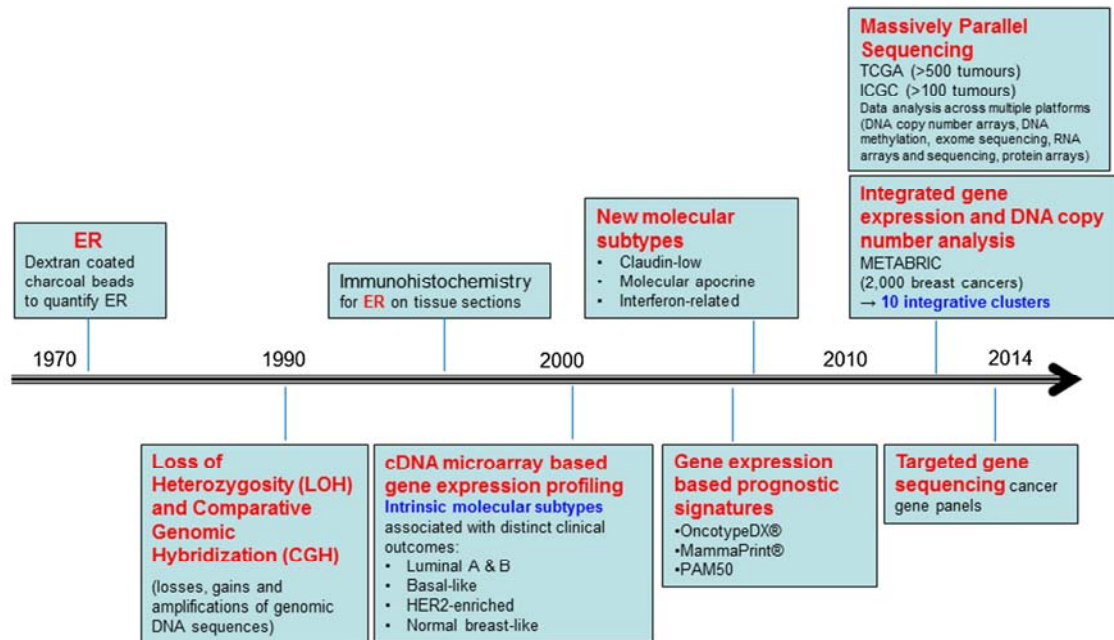
Posteriorment, en les dues últimes dècades s'han afegit els estudis moleculars que van des de la hibridació genòmica compartida (CGH) fins a les tècniques de seqüenciació massiva de nova generació (Next generation sequencing "NGS") **(Vuong, 2014)**.

Els primers estudis moleculars als anys 90 **(Simpson, 2005)** (Figura 8) d'hibridació genòmica comparativa (CGH) i pèrdua d'heterocigocitat (LOH) ja mostraven que els tumors amb major grau histològic tenen major complexitat i diversitat d'alteracions molecular (major inestabilitat genètica amb diversitat de pèrdues i/o guanys de cromosomes i gens), que no els tumors de baix grau (que mostren poques alteracions cromosòmiques, a excepció de pèrdua recurrent de 16q). Fet, que fa pensar, en la dificultat de transformació d'un

INTRODUCCIÓ

tumor de baix grau a un tumor d'alt grau, ja que les alteracions genètiques de base són diferents. De la mateixa manera, que els canvis genètics observats en carcinomes ductals i lobel·lars són diferents.

Figura 8: Evolució en l'estudi molecular del càncer de mama



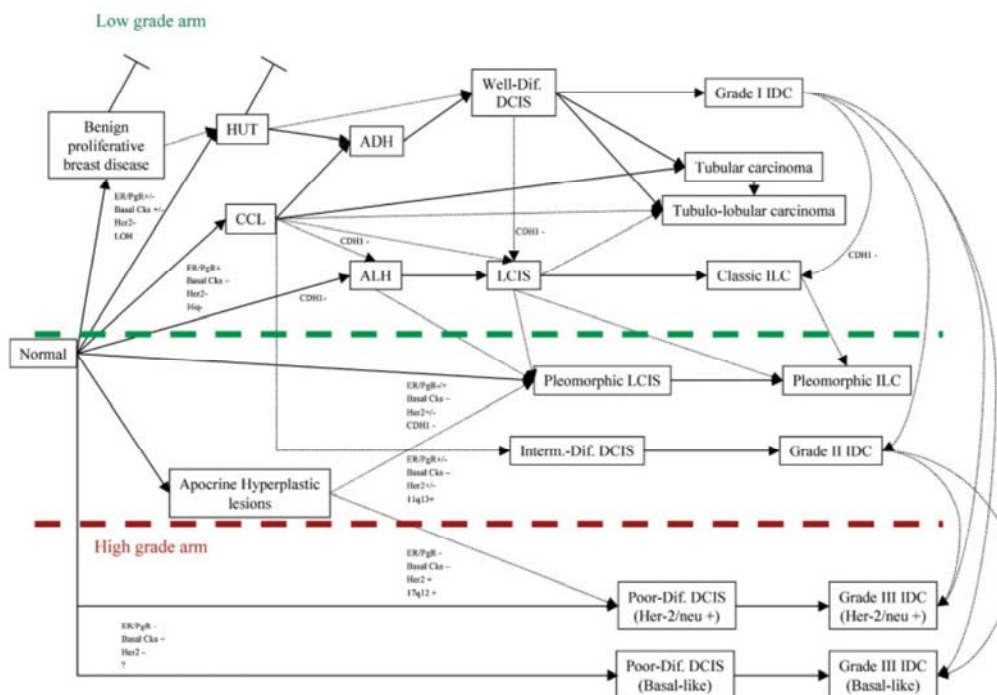
Degut a la seva diversitat, encara no està clara la correlació entre els perfils d'expressió, les característiques genètiques-moleculares i els paràmetres histològics dels tumors.

La freqüent associació entre la lesió invasiva i algunes lesions proliferatives per la seva similitud morfològica, fa pensar que certes entitats puguin estar biològicament relacionades (com la neoplàsia lobel·lar i el carcinoma lobel·lar infiltrant o el carcinoma intraductal i carcinoma ductal infiltrant). Motiu pel qual s'han requerit estudis moleculars per a valorar patrons fenotípics/genòmics, que permetessin associar les lesions preinvasives a determinades neoplàsies.

Al voltant del 2005, *Simpson et al*, comenta que l'evolució molecular de la patologia mamària neoplàsica (Figura 9), es basa en dues grans branques, una de baix grau i una d'alt grau amb una tercera branca intermitja, les quals tenen característiques moleculars molt diferents, que són compartides per determinades lesions malignes i premalignes, permeten així poder començar a entendre el desenvolupament de la malaltia.

INTRODUCCIÓ

Figura 9: Evolució en el coneixement molecular de la patologia mamària neoplàsica



La hiperplàsia ductal i lobel·lar atípica (HDA i HLA) tenen similituds morfològiques, i també moleculars, amb els carcinomes in situ ben diferenciats ductal i lobel·lar (CID i CIL), respectivament, ara no són obligatòriament precursors només dels carcinomes ben diferenciats, sinó de tot tipus de carcinoma in situ. Cal mencionar que hi ha altres lesions no obligatòriament premalignes que costen de situar en l'esquema.

Durant molt de temps la hiperplàsia ductal usual s'ha considerat precursora de HDA i CID, però s'ha vist que les característiques morfològiques, immunoproliferatives i moleculars són extremadament diferents, de manera que la majoria no mostren evidència d'una naturalesa monoclonal/neoplàsica que suggereix tractar-se d'una entitat premaligne.

Per una banda, les lesions de cèl·lules columnars, sí que es coneixen com a possibles precursors de HDA i CID ben diferenciats. Encara que, a nivell molecular tenen un augment en el nombre i complexitat de canvis en relació al número de còpies de cromosomes, també és freqüent la troballa de pèrdua de 16q (indicador de lesions de baix grau).

INTRODUCCIÓ

Mentre que, per altra banda, hi ha entitats com l'adenosi apocrina atípica i l'adenosi microglandular que són lesions precursoras que no estan ben establertes. O altres com, el carcinoma lobel·lar pleomòrfic i el carcinoma ductal infiltrant moderadament diferenciat, que són grups entremig de lesions en que les vies de progressió són menys evidents.

En resum, els canvis genètics observats en les lesions proliferatives benignes són rars i diferents dels descrits en el carcinoma **(Simpson, 2005)**.

Tal i com s'ha anat descrivint, els tumors de mama en humans tenen una gran diversitat en la història natural i les seves respostes a tractaments, probablement influenciades per la gran diversitat biològica de les cèl·lules i els tumors. En cada cèl·lula el sistema de senyals de transducció i regulació, tradueixen un gran volum d'informació de la identitat cel·lular en relació a l'estat ambiental, controlant els nivells d'expressió de cada gen en el genoma humà.

Es per això, que es proposa si la diversitat fenotípica en els càncers de mama s'acompanya de la corresponent diversitat de patrons d'expressió gènica, que es poden conèixer amb tècniques d'estudis moleculars, com els microarrays de ADNc i que ens ajudarien a conèixer millor la base de la taxonòmica molecular d'aquest càncer **(Perou, 2000)**. És a dir, el camí com es percep la reconfiguració del càncer de mama, que malgrat s'ha intentat dividir en subgrups aquests mostren importants limitacions.

Al cap d'uns 10 anys, al l'inici del nou segle, l'estudi molecular parla de com els perfils d'expressió gènica basat en estudis de microarrays divideix de manera intrínseca el càncer de mama en cinc subtipus diferents (Luminal A, Luminal B, Basal-like, Her2 positius i mama normal), que tenen diferents factors de risc epidemiològics, diferents històries naturals i diferents respostes a tractaments sistèmics i teràpies locals **(Perou, 2000)**.

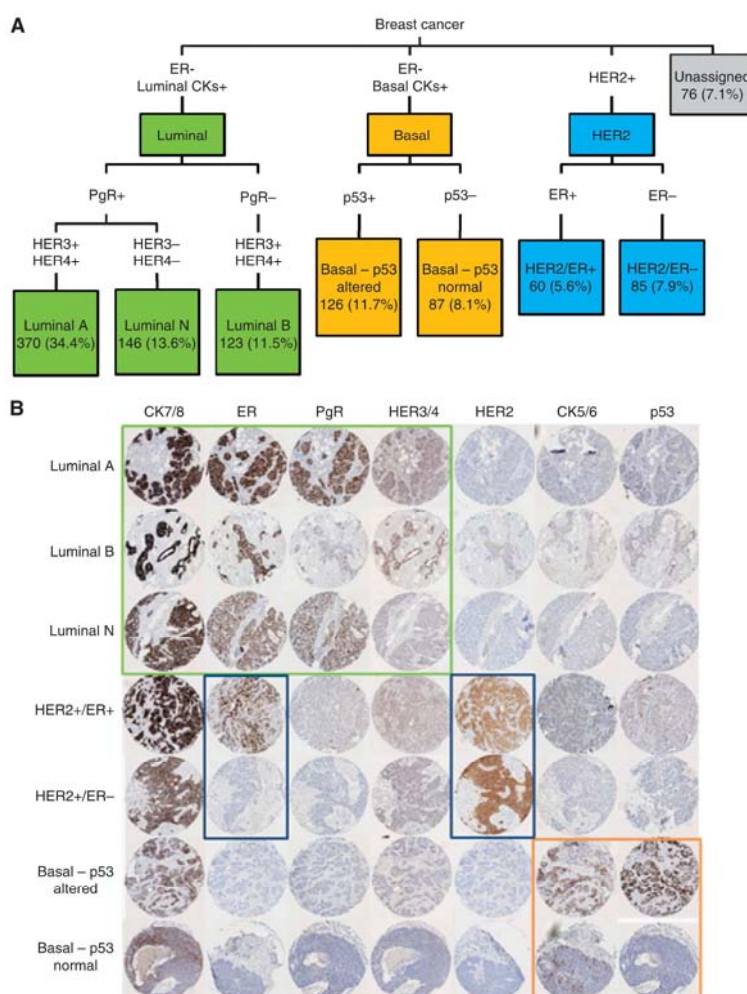
Un estudi posterior **(Sorlie, 2001)** subdivideix el tipus luminal/receptors d'estrògens positius en 3 subtipus: luminal A, B i C. Després, un altre estudi **(Sotiriou, 2003)** va demostrar sis grups similars, amb dos subgrups basal-like i un grup mama normal. Nombrosos estudis posteriors han subclassificat el càncer de mama en subtipus moleculars similars, utilitzant perfils d'expressió

INTRODUCCIÓ

gènica. Encara que, alguns estudis utilitzen fins a 25 marcadors immunohistoquímics per aconseguir dividir els càncers de mama de manera similar als estudis moleculars no són exactes ni s'utilitzen a la pràctica clínica.

Al 2013 un estudi (**Green, 2013**) comenta la possibilitat de classificar els càncers de mama en 6 grups utilitzant una combinació de 10 marcadors immunohistoquímics (receptors d'estrògens "RE", receptors de progesterona "RPG", citoqueratina 5/6 "CK5/6", citoqueratina 7/8 "CK7/8", EGFR, Her2, Her3, Her4, p53 i Mucin 1). Parla de tres luminals (que tenen expressió de CK7/8 i RE amb variabilitat en l'expressió de RPG, Her3 i Her4), dos basals "BL" (que expressen CK5/6 més/menys p53) i un Her2 positiu "HER2"; quedant només un 7.1% de tumors inclassificables (Figura 10).

Figura 10: Classificació del càncer de mama segons la combinació del resultat immunohistoquímica descrit per Green et al, 2013



INTRODUCCIÓ

De manera, que aconseguim una classificació dels càncers de mama similar a l'obtinguda amb els perfils d'expressió gènica, definint diferents subtipus basals i luminals amb diferents evolucions clíniques.

A grans trets, mencionar que a nivell clínic tenen un millor pronòstic els grups Luminal A i N que no el B, degut a que són tumor petits, de grau histològic I i amb ganglis negatius; a diferència de la resta de grups (Luminal B, BL i HER2) que són tumors grans amb alt grau histològic i estadiatge. En el grup Basal, el BL p53 alterada té pitjor pronòstic lliure de malaltia que el grup BL p53 normal. Pel que fa al grup HER2 és el que té un pitjor pronòstic, sobretot HER2 RENegatius té la major taxa de mort per càncer de mama en 5 anys.

Malgrat que a la pràctica clínica el que importa no és la subdivisió en perfils intrínsecs, sino separar els pacients que es poden o no beneficiar de determinades teràpies; i ja que el marc sanitari actual limita la realització de tests de signatures genètiques de pronòstic pel seu elevat cost econòmic, ha sigut necessària la seva aproximació amb els estudis immunohistoquímics habituals.

Motiu pel qual, recentment s'ha acceptat la classificació biològica del càncer de mama en cinc grups diferents basada en un panell de marcadors immunohistoquímics (primera proposta en el Consens Internacional d'Experts de St. Gallen al 2011 i modificada posteriorment en el següent consens al 2013) (**Goldhirsch, 2011 i 2013**) (Taula 1 i Figura 11).

Taula 1: Aproximació immunohistoquímica als subtipus intrínsecs de càncer de mama

| Subtipus | RE | RPG | Ki67 | Her2 |
|--------------------------|---------|-----------------|-------------|---------|
| Luminal A | Positiu | Positiu | < 14% | Negatiu |
| Luminal B – Her2 negatiu | Positiu | < 20% i/o ≥ 14% | | Negatiu |
| Luminal B – Her2 positiu | Positiu | Independent | Independent | Positiu |
| Her2 positiu | Negatiu | Negatiu | Independent | Positiu |
| Triple negatiu | Negatiu | Negatiu | Independent | Negatiu |

INTRODUCCIÓ

Figura 11: Esquema del Consens Internacional d'Experts de St. Gallen 2013

| Intrinsic subtype | Clinico-pathologic surrogate definition | Notes |
|-----------------------|--|---|
| Luminal A | <p>'Luminal A-like'</p> <p>all of:</p> <ul style="list-style-type: none"> ER and PgR positive HER2 negative Ki-67 'low'^a <p>Recurrence risk 'low' based on multi-gene-expression assay (if available)^b</p> | <p>The cut-point between 'high' and 'low' values for Ki-67 varies between laboratories.^a A level of <14% best correlated with the gene-expression definition of Luminal A based on the results in a single reference laboratory [23]. Similarly, the added value of PgR in distinguishing between 'Luminal A-like' and 'Luminal B-like' subtypes derives from the work of Prat et al. which used a PgR cut-point of ≥20% to best correspond to Luminal A subtype [24]. Quality assurance programmes are essential for laboratories reporting these results.</p> |
| Luminal B | <p>'Luminal B-like (HER2 negative)'</p> <ul style="list-style-type: none"> ER positive HER2 negative <p>and at least one of:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ki-67 'high' PgR 'negative or low' <p>Recurrence risk 'high' based on multi-gene-expression assay (if available)^b</p> <p>'Luminal B-like (HER2 positive)'</p> <ul style="list-style-type: none"> ER positive HER2 over-expressed or amplified Any Ki-67 Any PgR | <p>'Luminal B-like' disease comprises those luminal cases which lack the characteristics noted above for 'Luminal A-like' disease. Thus, either a high Ki-67^a value or a low PgR value (see above) may be used to distinguish between 'Luminal A-like' and 'Luminal B-like (HER2 negative)'.</p> |
| Erb-B2 overexpression | <p>'HER2 positive (non-luminal)'</p> <ul style="list-style-type: none"> HER2 over-expressed or amplified ER and PgR absent | |
| 'Basal-like' | <p>'Triple negative (ductal)'</p> <ul style="list-style-type: none"> ER and PgR absent HER2 negative | <p>There is an 80% overlap between 'triple-negative' and intrinsic 'basal-like' subtype. Some cases with low-positive ER staining may cluster with non-luminal subtypes on gene-expression analysis. 'Triple negative' also includes some special histological types such as adenoid cystic carcinoma.</p> |

Sempre recordant, que encara que les característiques patològiques estàndards junt amb els resultats immunohistoquímics habituals permeten definir alguns grups clínics de forma adequada; un dels principals problemes es troba en el grups dels "Luminals", on en els darrers anys s'ha intentat ajustar i buscar solucions per a classificar-los adequadament, sobretot en la valoració immunohistoquímica del Ki67, que és controvertida i molt variable, sent així, aquest el principal grup, en el que actualment es sol·liciten estudis moleculars predictius. Ara, malgrat els importants esforços per a millorar les dades patològiques subrogades que defineixen els subtipus intrínsecs, aquesta classificació continua sent subòptima; sent probablement l'explicació més plausible, la que 3 o 4 biomarcadors no poden concretar els subtipus intrínsecs de càncer de mama definits a nivell molecular (**Prat, 2015**).

Existeixen diferents tests d'expressió gènica (signatures genètiques de pronòstic), indicats i validats en determinades situacions, com són Oncotype DX®, MammaPrint®, PAM-50 ROR® score, EndoPredict® and Breast Cancer Inex®, els quals informen de diferents factors pronòstics o predictius en

INTRODUCCIÓ

càncers de mama amb determinades característiques clinicopatològiques (Figura 12).

Figura 12: Taula comparativa dels principals test d'expressió gènica utilitzats en càncer de mama

| Gene expression test | Oncotype DX® | MammaPrint® | "Intrinsic gene molecular classification/PAM50/Prosigna™ |
|------------------------|--|--|---|
| Provider | Genomic Health | Agendia BV | NanoString Technologies Inc. |
| Assay | 21-gene recurrence score | 70-gene signature | "Intrinsic gene" list or 50-gene PCR |
| RNA isolated from | Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue | Frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue | Frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue |
| Outcome | Disease-free relapse at 10 years | Distant metastasis at 5 years | Disease-free, distant metastasis-free and overall survival |
| Clinical Application | Prediction of recurrence risk in ER+ BC treated with tamoxifen | Prognosis of N0 BC, <5 cm diameter | Classification of invasive breast cancers |
| Risk groups identified | Three risk groups based on recurrence score | Dichotomous; good or poor prognosis | Classification of tumors into luminal A, luminal B, HER2, and basal-like subtypes |

ER estrogen receptor, BC breast carcinoma, GGI Genomic Grade Index

| MapQuant DX® | EndoPredict® | Breast Cancer Index SM (HoxB13:IL17BR/MGI) |
|--|--|---|
| Qiagen (formerly Ipsogen Inc.); still available? | Sividon Diagnostics | bioTheragnostics |
| 97-gene signature or 8-gene qRT-PCR | qRT-PCR 8 prognostic genes, 3 normalization gene | 2-gene HOXB13:IL17R/ molecular-grade index |
| Frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue | Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue | Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue |
| Good (GGI I) or poor (GGI III) prognosis | Distant metastasis at 10 years | Relapse-free and overall survival |
| Molecular grading, for ER+, histological grade II BC | Prognosis of endocrine-treated BC | Prognostic in ER+ BC, prediction of response to tamoxifen |
| Dichotomous; GGI I or GGI III | Dichotomous; low risk or high risk | Continuous variable; risk of recurrence score |

Aquests tests informen de dades pronòstiques addicionals i alguns augmenten també la informació predictiva donada per les actuals característiques clinicopatològiques i els marcadors immunohistoquímics de rutina; però, el benefici de la informació és limitada a un nombre restringit de pacients (receptors d'estrògens positius). De manera, que encara que l'entusiasme amb els microarrays vol que aquesta tecnologia sigui un esglaió més cap a l'escala de la

INTRODUCCIÓ

teràpia individualitzada dels pacients amb càncer de mama; aquest objectiu encara es troba una mica llunyà i probablement s'aconsegueixi amb la integració de les diferents etapes conegudes **(Weigelt, 2015)**.

En el moment del diagnòstic aproximadament el 80% dels càncers de mama són carcinomes ductals infiltrants de tipus no específics (NOS), seguits de carcinomes lobel·lars infiltrants en un 10%; tots dos amb comportaments biològics diferents però amb valor pronòstic independent que no queda clar. Existeixen altres subtipus de càncer menys freqüent, com els tumors papil·lars, mucinosos, tubulars i cribiformes, que s'associen a bon pronòstic; a diferència dels subtipus micropapil·lar, medul·lars, metaplàstics i sòlid lobel·lar, que semblen tenir pitjor pronòstic. Sent l'entitat més agressiva en el càncer de mama localitzat, el tipus inflamatori, caracteritzat per edema i eritema cutani degut a la infiltració tumoral limfàtica dèrmica **(Modolell, 2015)**.

A nivell immunohistoquímic, en el moment del diagnòstic entre el 70 i 80% de càncers de mama mostren expressió de receptors d'estrògens i/o receptors de progesterona, al voltant del 20% sobreexpressen Her-2/neu i un 10% són triples negatius **(Lerma, 2007)**.

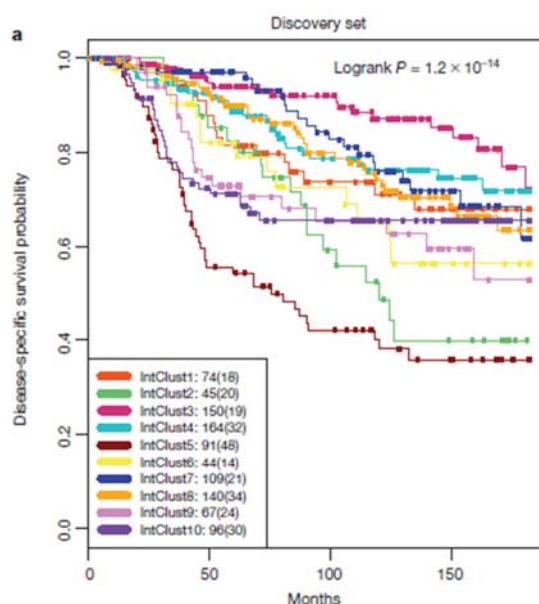
Encara que en la pràctica clínica diària, els factors pronòstics i predictius utilitzats són els anatomopatològics convencionals (com tipus histològic, mida tumoral, grau histològic i afectació axil·lar, entre altres) i immunohistoquímics (receptors d'estrògens i progesterona, Her2, p53 i Ki67). S'ha de tenir present que el càncer de mama amb similituds histològiques mostra una gran divergència en la manera de presentació clínica, agressivitat de la malaltia i resposta als tractaments. Aquestes diferències són possiblement les que limiten l'actual classificació del càncer de mama, basada principalment amb les característiques morfològiques. De manera, que en l'actualitat, les investigacions sistemàtiques dels patrons d'expressió gènica i les seves correlacions amb la diversitat de característiques fenotípiques específiques, són el repte més important per tal de poder classificar, a nivell molecular, els diferents fenotips de càncer de mama i poder permetre una millor estratificació pronòstica i predictiva **(Spitale, 2009)**, sense oblidar que el fet d'observar un

INTRODUCCIÓ

gran nombre de fenotips diferents indica que encara estem molt lluny d'obtenir el mapa complet del càncer de mama (**Perou, 2000**).

Ja acabant, només mencionar, que els últims avenços en la molecular intenten subclassificar el càncer de mama segons la seva arquitectura genòmica i transcryptòmica, basades en la valoració d'aberracions somàtiques adquirides en el número de còpies associades a l'expressió d'uns 40 gens, obtenint una divisió en 10 clústers diferents (Figura 13) (**Vuong, 2014**), però la seva pràctica diària es troba limitada pel cost i el poca estandardització en la seva utilització rutinària.

Figura 13: Subclassificació del càncer de mama en 10 clústers segons l'arquitectura genòmica i transcryptòmica



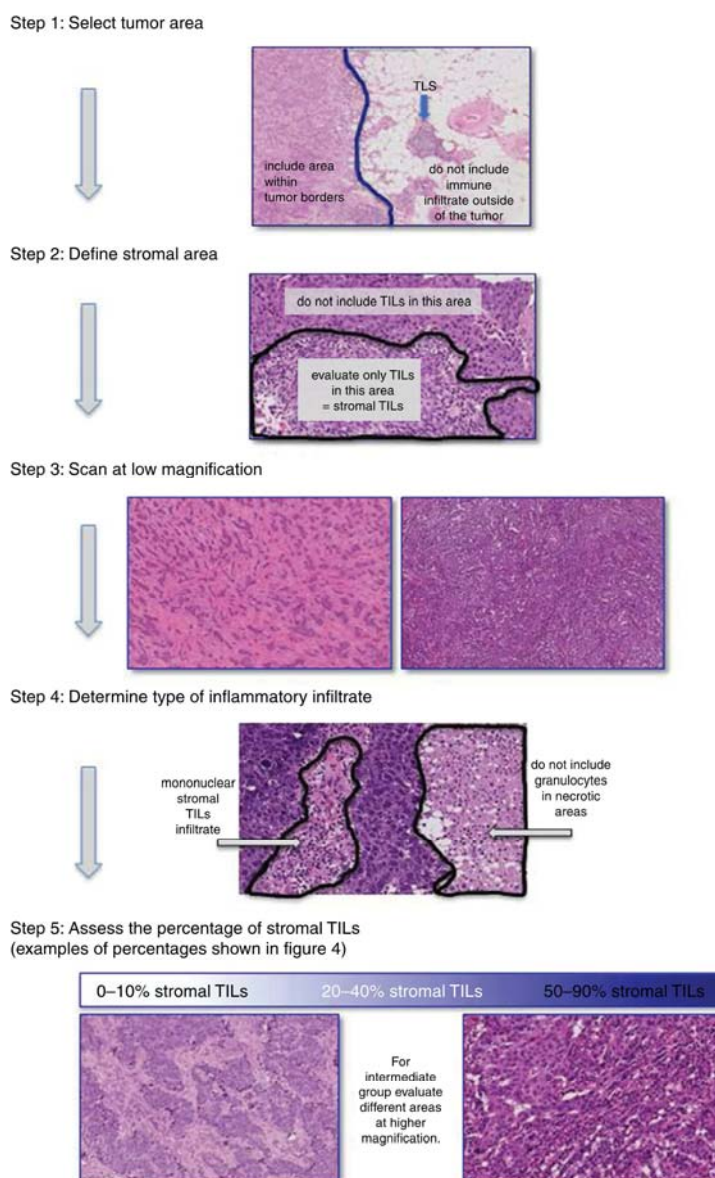
Per últim, no es pot oblidar de fer menció a un concepte innovador que últimament està agafant força en el càncer, que és la importància del sistema immune amb el concepte de “immunoedició del càncer” que es basa en la hipòtesis que la cel·lularitat immune promou el creixement tumoral i també pot erradicar el càncer. La seva influència depèn de la presència de cèl·lules inflamatòries immunosupressores intratumorals i a l'estroma adjacent i dels diferents papers que juguen cada tipus de cèl·lula immune en els diferents càncers (**Mao, 2016**).

En el càncer de mama l'extensa infiltració inflamatòria tumoral és deguda sobretot a cèl·lules T CD8+ citotòxiques (que es troben fortament associades a

INTRODUCCIÓ

la supervivència i la resposta al tractament) i a cèl·lules T CD4+ reguladores (que en funció del tipus es troben associades a millor o pitjor pronòstic) **(Salgado, 2015)**. La interacció del sistema immune amb les cèl·lules tumorals del càncer de mama està associada sobretot amb el tipus TNBC i Her2 positiu. També s'ha descrit el concepte de "LPBC = carcinoma de mama predominantment limfocític" quan hi ha més limfòcits que cèl·lules tumorals, és a dir, que la presència de limfòcits en l'estroma tumoral són en àrees del 50-60% del tumor. És per això que s'han descrit les recomanacions internacionals per a valorar el grau d'infiltració limfocítica tumoral (TILs) en el càncer de mama pel "Working Group 2014" (Figura 14).

Figura 14: Estandarització aprovada per la valoració de TILs en càncer de mama.



EL CÀNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIU (TNBC)

El càncer de mama triple negatiu (TNBC) és un grup heterogeni de tumors (a nivell morfològic, genètic, immunofenotípic i de característiques clíniques), que representa entre el 10-20% de tots els càncers de mama i mostra una gran variabilitat a nivell intra i intertumoral que limita la troballa d'una teràpia dirigida. Aquest tipus de tumor (TNBC) es caracteritza per la manca d'expressió dels tres marcadors (receptors d'estrògens, receptors de progesterona i receptor 2 de factor de creixement epidèrmic "Her2") més emblemàtics en el càncer de mama, no fent més que senyalar que es tracta d'un subtipus de càncer definit "per defecte", i per tant, necessàriament subjecte a futures variacions classificatòries.

Tot i que, la seva vinculació a la disfunció del BRCA, la rellevància dels inhibidors de PARP (polimerasa-1 poliADP-ribosa), l'expressió d'EGFR i, inclòs, l'expressió de receptors d'andrògens, poden marcar la subdivisió natural d'aquest subgrup tan heterogeni i condicionar enfoc terapèutics absolutament dispars entre les diferents parts d'aquesta fragmentació. En general, es pot dir, que, de moment, el tumor triple negatiu està lligat conceptualment a mal pronòstic i a un ventall predictiu divers i, probablement també confús, per la seva gran heterogenicitat, pendent de futures investigacions clíniques i translacionals, entre d'altres, que ajudin a comprendre'l **(GEICAM, 2010)**.

Encara que la majoria mostren expressió intrínseca de gens tipus basal-like i marcadors immunohistoquímics basals (com són l'expressió d'EGFR i de citoqueratines basals CK5/6 i CK14), no són subtipus equivalents. Ja que se sap que dins de la malaltia "triple negativa" es poden identificar tots els subtipus intrínsecs moleculars de càncer de mama, amb predomini del subtipus basal-like (66.1% versus el 9.1%, 3.2% i 1.6% de Her2, Luminal B i Luminal A, respectivament) **(Prat, 2015)**. A més, s'observa que un 71% de TNBC són basal-like per expressió gènica i només un 77% de basals són TNBC. Els càncers de mama triple negatius que no expressen marcadors basals tenen millor pronòstic, mentre que la seva expressió s'associa a significatiu escurçament de la supervivència lliure de malaltia **(Riccardi, 2015)**.

El càncer de mama triple negatiu s'observa més freqüentment en dones afro-americanes i es diagnostica en pacients joves (<50 anys).

INTRODUCCIÓ

A nivell radiològic cal mencionar que els TNBC poden no visualitzar-se amb les tècniques mamogràfiques i ecogràfiques habituals, ja que sovint es presenten com a troballes suggestives de benignitat (masses rodones o ovalades, de marges ben definits i hipoecòiques, sense microcalcificacions associades) i pot existir malaltia multifocal o multicèntrica amagada. Sent la tècnica més precisa pel seu diagnòstic la ressonància magnètica que sempre mostra troballes associades a malignitat **(GEICAM, 2010)**.

A nivell morfològic, la majoria són carcinoma d'alt grau histològic (grau III – pobrament diferenciat de Nottingham), encara que s'ha descrit que al voltant del 10% de casos són de baix grau histològic (grau I – ben diferenciat de Nottingham). No es pot oblidar, que encara que sovint són carcinomes ductals infiltrants de tipus no específic d'alt grau, la seva heterogenicitat es troba afavorida per la major prevalença de subtipus histològics rars (com els carcinomes metaplàstics, medul·lars, adenoides quístics i apocrins, alguns d'ells amb comportaments clínics molt diferents).

Hi ha discordança en quan a la prevalença de metàstasis ganglionars en el moment del diagnòstic, ja que mentre alguns autors parlen de major prevalença, altres no troben diferències. En aquests tumors, la mida tumoral no està relacionada amb el número de metàstasis ganglionars, a diferència del que succeeix en el resta de tipus de càncer de mama **(GEICAM, 2010)**.

El TNBC té un pronòstic desfavorable, ja que s'associa a comportament agressiu, escassa resposta a tractaments habituals (anti-hormonals i anti-Her), només resposta parcialment efectiva a quimioteràpia sistèmica i freqüent progressió precoç. En els casos amb tractament neoadjuvant previ, sovint queda malaltia residual i això determina una pitjor supervivència, a diferència dels càncers de mama no triple negatius; ara, en un 20-30% de TNBC s'aconsegueix una resposta patològica completa després de la quimioteràpia, mostrant aquests una millor evolució posterior (Figura 15). Es àmpliament coneguda la seva freqüent progressió/recurrència amb metàstasis a distància, per via hematògena, particularment viscerals (pulmó i cervell), entre el primer i tercer any del diagnòstic.

INTRODUCCIÓ

Figura 15: Taula de resultats d'una sèrie història pròpia (de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Hospital Universitari, compresa entre la dècada de 1990 i 2000) de la valoració del grau de resposta Miller & Payne en càncers de mama amb quimioteràpia neoadjuvant

| | TN (-) | Luminal-A | HER2 (+) | Luminal-B (HER2+) | Luminal-B (Ki67++) | Total |
|------------------|------------------|-------------|-------------|-------------------|--------------------|-------------|
| | Miller & Payne 1 | 2 3,6% | 2 3,3% | 3 6,7% | 2 6,9% | |
| Miller & Payne 2 | 13 23,6% | 8 13,3% | 5 11,1% | 2 6,9% | 2 6,1% | 30 13,5% |
| Miller & Payne 3 | 12 21,8% | 36 60,0% | 6 13,3% | 3 10,3% | 15 45,5% | 72 32,4% |
| Miller & Payne 4 | 9 16,4% | 10 16,7% | 5 11,1% | 13 44,8% | 5 15,2% | 42 18,9% |
| Miller & Payne 5 | 19 34,5% | 4 6,7% | 20 57,8% | 0 31,0% | 9 27,3% | 67 30,2% |
| Total | 55 | 60 | 45 | 29 | 33 | 222 |

A nivell de tractament, mencionar que, des de fa més de 4 dècades, el tractament conservador forma part del tractament del càncer de mama en estadi precoç. Aquest tractament consisteix en l'exèresi del tumor primari i una quantitat de teixit normal adjacent fins aconseguir uns marges lliures, amb o sense dissecció axil·lar, i radioteràpia posterior, per tal d'erradicar possibles focus microscòpics de tumor que puguin quedar i proporcionar altes taxes de control local i supervivència. Els TNBC són potencialment més quimiosensibles que els tumors de grups Luminals, però per mecanismes que es desconeixen, molts s'escapen del control dels agents citostàtics convencionals, donant lloc a recaigudes més agressives i resistents i, per tant, a pitjor expectativa de supervivència.

La biologia molecular i la fisiopatologia del TNBC no es completament coneguda, malgrat tot amb el pas del temps, la seva gran complexitat s'ha vist parcialment aclarida amb els anàlisis d'expressió gènica i microARNs, que han permès conèixer diferents sensibilitats a terapèutiques concretes i han detectat que habitualment, els TNBC són càncers que mostren a nivell molecular agressivitat biològica, per la presència d'algunes alteracions no exclusives, entre les que hi ha la mutació en línia germinal del gen *BRCA1*, mutacions en el gen *p53*, absència d'expressió de *BCL2* i determinades alteracions cromosòmiques (**Lara-Medina, 2013**). Es per això, que es comenta que estudis de microARNs han contribuït en la comprensió i subclassificació dels TNBC,

INTRODUCCIÓ

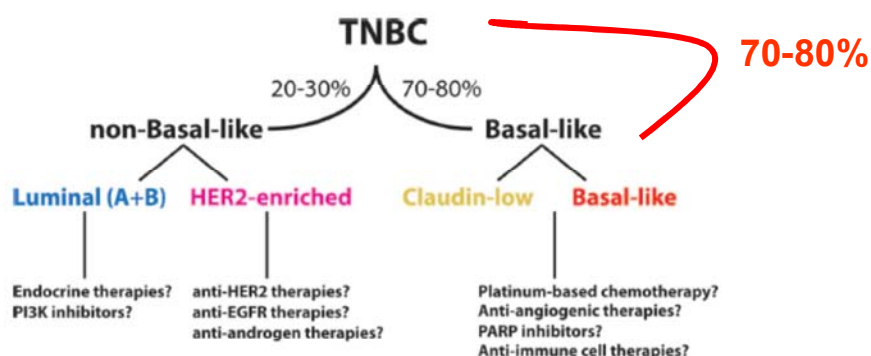
poden representar un fàcil biomarcador per a predir el pronòstic i la resposta a tractaments (**D'Ippoliot, 2013**).

Un important repte clínic és intentar millor la supervivència d'aquest subtipus de càncer de mama, ja que no respon a la teràpia endocrina ni es coneixen altres agents terapèutics específics habituals disponibles, de manera que l'objectiu no només es centrar l'atenció en trobar nous agents terapèutics, sinó també en identificar marcadors predictors de resposta/resistència a tractament quimioteràpics estàndards (**Sharma, 2014**). Així com, la identificació de factors i marcadors pronòstics que permeten seleccionar les pacients de baix i alt risc, per aproximar-se a les diferents terapèutiques i a les diferents respostes a agents específics en cada subtipus (**Hudis, 2011**).

Degut a l'heterogenicitat intrínseca dels càncer de mama triple negatiu, existeixen diferents intents de subdivisió d'aquests tumors per discriminar el seu comportament clínic. Amb el pas del temps s'han descrit diferents intents de subclassificació del càncer de mama triple negatiu, encara que alguns semblen tenir més valor, no hi ha un acord en com dividir-los.

Perou al 2000 que divideix els TNBC a nivell molecular, segons els resultats de patrons d'expressió gènica de microarrays ADNc en: Basal-like (50%), Claudin-low (30%) i la resta Luminal A, B i Her2 (20%), destacant així la disparitat present entre els càncers triple negatius i basal-like (**Perou, 2000**) (Figura 16).

Figura 16: Proposta d'estratificació del TNBC

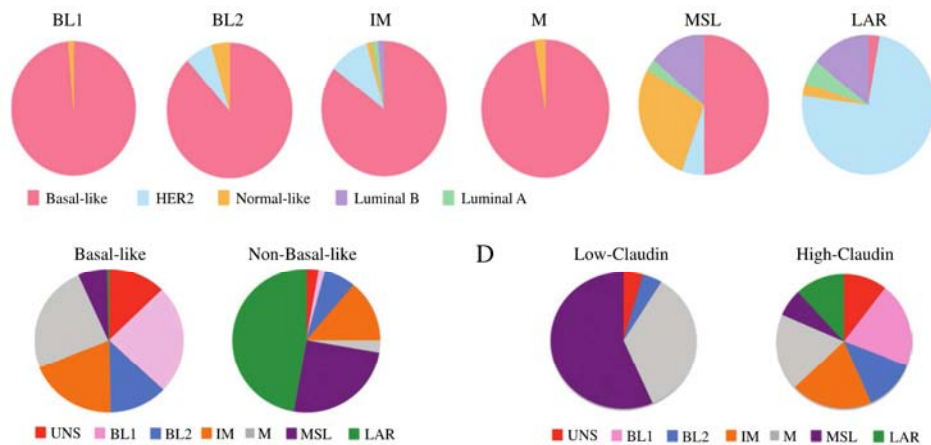


Posteriorment, al 2011 *Lehmann* divideix els TNBC segons metanàlisis de microarrays en 6 subtipus amb diferents sensibilitats a tractaments quimioteràpics determinats: Basal-like 1 (BL-1), Basal-like 2 (BL-2),

INTRODUCCIÓ

immunomodulador (IM), mesenquimal (M), mesenquimal stem-like (MSL) i luminal receptors andrògens (LAR); sent aquesta classificació una de les més acceptades però amb mínimes equivalències a nivell immunohistoquímic per aproximar-s'hi (**Lehmann, 2011; Lehmann, 2014**) (Figura 17).

Figura 17: Imatges de gràfiques de combinació de les diferents classificacions dels càncers de mama en els grups descrits per Lehmann



Aquests 6 subtipus (Figura 18) es diferencien per mostrar característiques biològiques úniques, que s'acompanyen de diferents pronòstics, descrits a continuació:

- BL1: relacionat amb el cicle cel·lular i l'expressió de gens responsables del dany a l'ADN. És un dels grups amb millor pronòstic i que aconsegueix major taxa de resposta patològica completa.
- BL2: es troba enriquit en senyals de factors de creixement i marcadors mioepitelials. Tenen mal pronòstic i són els que aconsegueixen la menor resposta a tractaments neoadjuvants.
- M i MSL: tenen elevada expressió de gens involucrats en transició epitelial-mesenquimal i la via de factors de creixement, encara que MSL mostra disminució de l'expressió de gens involucrats en proliferació. Els MSL tenen millor pronòstic que els M.
- IM: relacionat amb antígens immunes i gens involucrats amb la citosina i via de transducció de senyals immunes. És el que té millor pronòstic i recentment, s'ha descrit la seva associació amb infiltrat limfocític tumoral (TILs).

INTRODUCCIÓ

- LAR: relacionat amb l'expressió de gens luminals i receptors d'andrògens. Es diu, que només aproximadament un 10% aconseguen una resposta patològica completa a tractament neoadjuvant.

Figura 18: Mapa de microarrays per la classificació TNBC segons Lehmann.

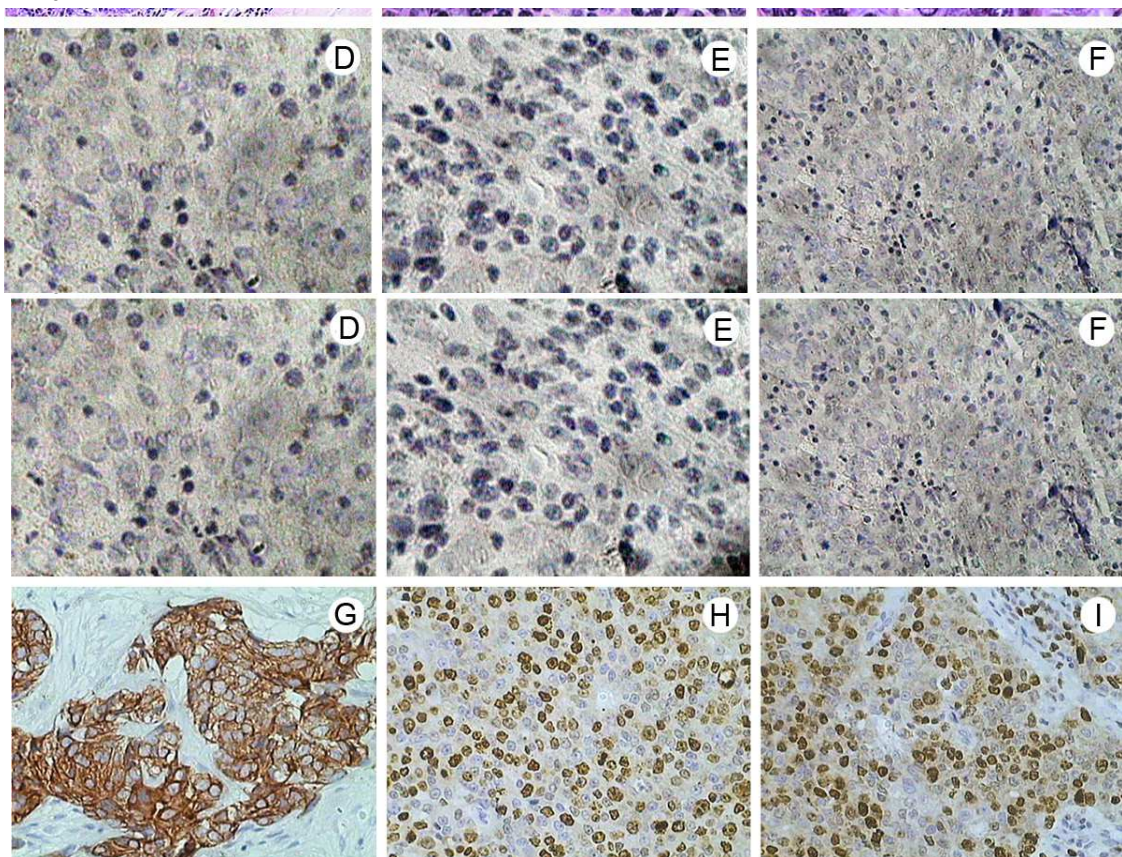


Al voltant del 2013, alguns autors intenten classificar-los segons determinats estudis immunohistoquímics. *Elsawaf* divideixen els TNBC en 4 subgrups (Basal A, Basal B, Basoluminal i Luminal) segons els resultats de determinades tincions immunohistoquímiques (EGFR, ki67, CK5/6, CK7, CK19, vimentina, p16, p53, CD117 i WT1) (**Elsawaf, 2013**).

INTRODUCCIÓ

Així com, també es proposa si l'índex proliferatiu de Ki67, com a factor predictor de recurrència, pot ajudar a subclassificar els TNBC en dos grups amb diferent resposta al tractament i pronòstic. Les tincions de CK5/6 i EGFR ajuden a definir el subtipus basal-like i reflecteixen la supervivència. La tinció de p53 és un marcador de basal-like i la sobreexpressió s'associa amb recurrència local (Zhang, 2013) (Figura 19).

Figura 19: Imatges microscòpiques d'hematoxilina-eosina i immuohistoquímiques utilitzades per a classificar els TNBC

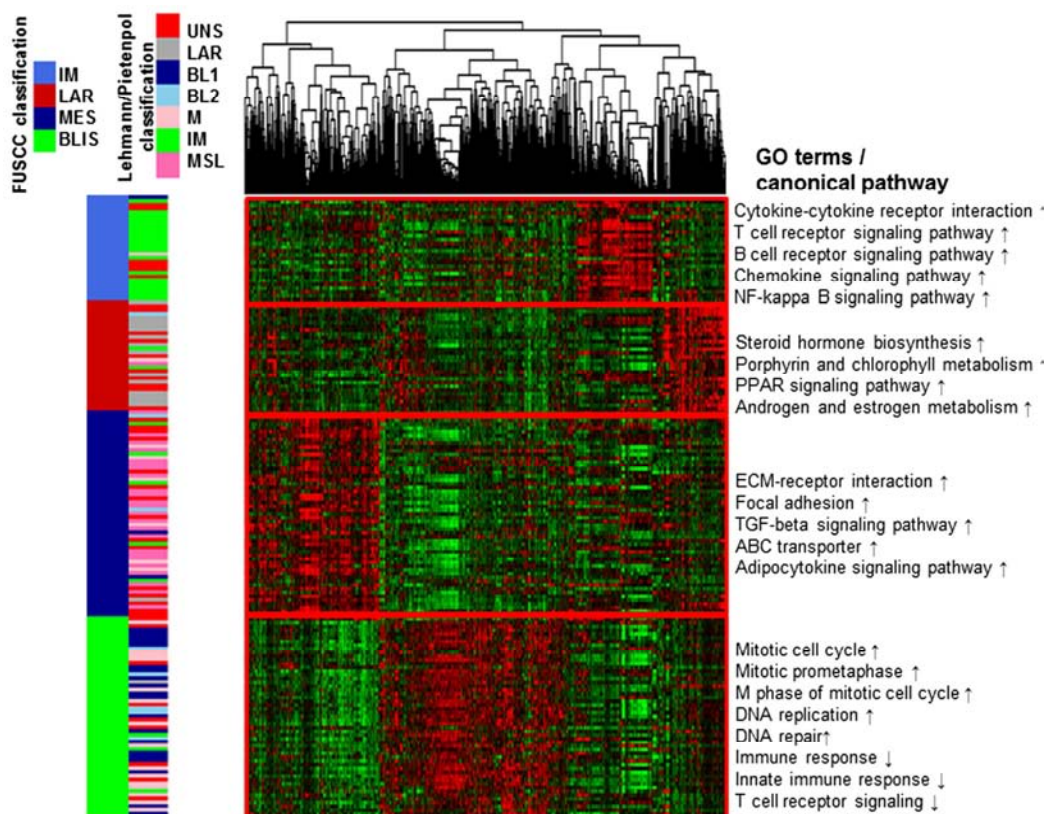


A: Carcinoma medul·lar clàssica, B: Carcinoma medul·lar amb infiltrat limfocític; C: Carcinoma medul·lar amb cèl·lules grans; D: Receptors d'estrògens negatius; E: Receptors de progesterona negatius; F: Her2 negatiu; G: CK5/6 positiva; H: índex proliferatiu de Ki67 alt; I: P53 positiva.

Una de les últimes classificacions descrites es troba basada en anàlisis de transcriptòmica i és la de Lehmann/Pietenpol (Liu, 2016), que partint de la classificació dels TNBC per Lehmann segons l'expressió d'ARN missatger (ARNm) en 6 grups, s'interactuen els resultats amb ARNlnc (long noncoding ARN), per obtenir 4 grups de possible classificació de TNBC (Figura 20).

INTRODUCCIÓ

Figura 20: Mapa dels diferents perfils d'expressió ARN dels 4 grups



- Cluster A o subtipus immunomodulador: via que afecta el procés de cèl·lules immunes (senyal de citosines, cèl·lules immune, presentació d'antigens, entre altres). Pot respondre a teràpies immunològiques.
- Cluster B o subtipus luminal de receptors d'andrògens: via que afecta la regulació hormonal. Pot respondre a teràpies anti-androgèniques i a la tradicional anti-estrogènica.
- Cluster C o subtipus mesenquimal-like: via relacionada amb la interacció de receptor de la matriu extracel·lular, d'adhesió i factors de creixement i transformació (amb baixos nivells dels gens que intervenen en la proliferació i divisió cel·lular).
- Cluster D o subtipus basal-like i immuno-supressor: via relacionada amb la divisió cel·lular i el cicle cel·lular (associats a la proliferació, no amb la resposta immune ni els complements d'activació, que es troben disminuïts). Mencionar que els dos grups basal-like de Lehmann queden inclosos en un únic grup; sent aquest grup el de pitjor pronòstic.

INTRODUCCIÓ

Un concepte emergent és l'infiltrat limfocític tumoral (TILs), que s'ha reportat associat a millor supervivència especialment en el càncer de mama triple negatiu, degut sobretot a la sovint presència de limfòcits en la proximitat tumoral. D'aquí que es descriu la possible utilitat dels TILs com a factor pronòstic, predictiu i marcador de malaltia residual en TNBC (**García-Tejido, 2016**).

TILs com a factor pronòstic de millor supervivència en càncers sense tractament, ja sigui a nivell global, lliure de metàstasis i per disminució del risc de recurrència a distància (diferents estudis parlen d'una reducció del 15-20% de recurrència i mortalitat quan els tumors tenen més d'un 10% de TILs).

TILs com a factor predictor de millor resposta patològica completa amb quimioteràpia neoadjuvant, perquè la quimioteràpia facilita la resposta immune antitumoral (al disminuir la carga tumoral i modificar el microambient o al induir la mort cel·lular, entre altres).

TILs com a marcador de malaltia residual, perquè l'increment de TILs en el tumor residual post-quimioteràpia és un indicador de bon pronòstic, associat a augment del temps lliure de metàstasis i supervivència global.

S'ha vist que el TNBC és el càncer de mama que més s'associa a la presència de TILs, així com a la presència d'agregats limfoide, que prediuen la supervivència i la resposta a tractaments estàndards, poden ser el primer biomarcador predictor de resposta a teràpies immunes. Per això, la importància del subtipus "immunomodulador" caracteritzat per l'elevada expressió de gens involucrats en els antígens i funcions de les cèl·lules T, plantejant el possible tractament amb immunoteràpia.

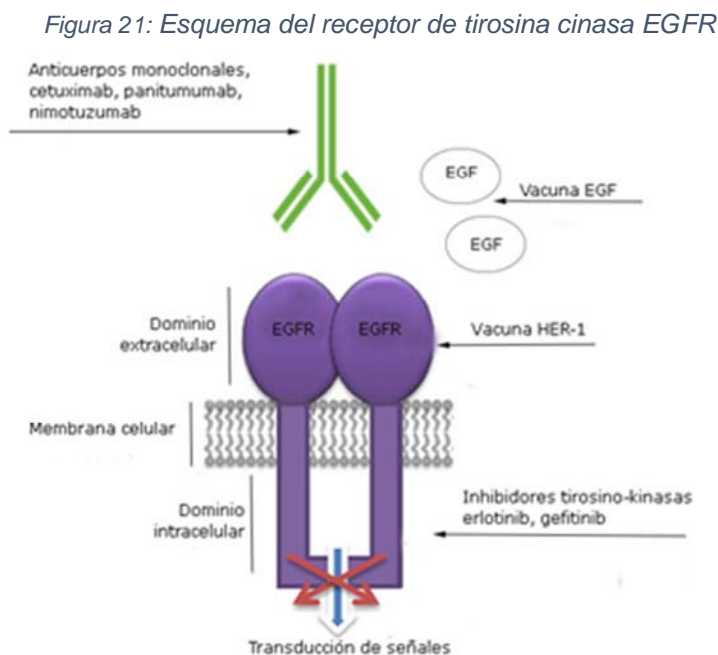
L'expressió de la proteïna PD-L1 (proteïna del lloc de control del sistema immune, la qual es correlaciona amb el microambient tumoral i amb alts nivells de TILs) en càncers de mama s'ha observat entre un 15,8 i un 30% (fins un 55-60% per ARNm *microarrays*), sent molt comú en els TNBC observant-se la seva expressió en les cèl·lules tumorals a nivell de membrana en un 64%, citoplasmàtic en un 80% i a l'estroma en un 93%.

INTRODUCCIÓ

Afegit als intents de subclassificació dels TNBC amb resultats no del tot concluints, es passa a buscar possibles marcadors immunohistoquímics o alteracions moleculars que puguin ajudar a conèixer el comportament biològic de cadascun dels tumors. A la literatura es descriuen diversos biomarcadors possibles, que encara que no són exclusius es presenten amb elevada prevalença, entre els quals hi ha les vies de l'EGFR, el PIK3CA i el BRCA1, en les quals ens centrarem a continuació.

EGFR

L'**EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor) és un gen que es localitza en el braç curt (p) del cromosoma 7 en la banda 12 (7p12), pertany a la família dels receptors tirosina cinasa transmembrana tipus I, que té un pes molecular de 170 kDa i està format per quatre dominis: un intracel·lular, un de curt transmembrana, un jxtamembrana i un extramembrana, que té el lligant activador de l'activitat tirosina cinasa (existeixen varis tipus de lligants, factors de creixement, que es poden unir i activar la cascada) (Figura 21); tot això provoca la fosforilació del residu tirosina cinasa; que desencadena una cascada de senyals amb substrats intracel·lulars (**Lv, 2011**).



Aquest receptor de la tirosina cinasa té un paper important en el transport de senyals extracel·lulars, des de la superfície cel·lular cap a l'interior de la

INTRODUCCIÓ

cèl·lula, intervenint en processos crucials (com la proliferació cel·lular, diferenciació, migració i apoptosi). La desregulació de l'expressió d'aquest receptor pot desencadenar aberracions en la homeòstasis del procés cel·lular, resultant en la transformació maligne de les cèl·lules, tenint així un paper central en el creixement i progressió del càncer **(Teng, 2011)**.

S'ha observat que una fracció considerable de càncers de mama triple negatius i/o basal-like mostren desregulació de la via EGFR (entre un 40-70%), ja sigui per l'expressió immunohistoquímica d'EGFR, per l'elevació dels nivells d'ARN missatger (ARNm) d'EGFR i/o l'activació de la via EGFR, observada en estudis de microarrays d'expressió gènica, tots aquests correlacionant-se amb mal pronòstic i poca supervivència lliure de malaltia. Per aquest motiu, es proposa si les teràpies anti-EGFR (anticossos contra el receptor "cetuximab" o inhibidors de la tirosin cinasa "gefitinib" o "erlotinib") serien efectives en aquest subgrup de pacients amb TNBC, similar a la resposta observada en el càncer de pulmó no cèl·lula petita o metastàtic de còlon. Malgrat això, la resposta a teràpies anti-EGFR no depenen de l'expressió immunohistoquímica, sinó de la presència de la mutació activada (deleció exó 19, substitució L858R exó 21 o rarament, mutació exó 18), la qual prediu resposta al tractament amb "gefitinib" o "erlotinib" **(Jacot, 2011; Teng, 2011)**.

Malgrat s'ha observat que no existeix correlació entre l'expressió immunohistoquímica i la presència de mutació activada, en alguns articles de la literatura, es descriu la correlació entre la sobreexpressió immunohistoquímica d'EGFR i l'amplificació d'aquest, sense associar-se a presència de mutacions **(Bhargava, 2005)**.

Existeixen estudis discordants de troballa o no de mutacions del gen *EGFR* en càncer de mama triple negatiu, sobretot entre poblacions d'Àsia de l'est **(Teng, 2011)** i europees **(Jacot, 2011)**, on troben fins a un 11.4% de casos amb mutacions potencialment patogèniques (incloent deleccions o inversions en l'exó 19 i substitucions missense en l'exó 21) versus taxa nul·la de mutacions d'*EGFR*, respectivament.

Altres estudis publicats prèviament, semblen recolzar l'absència de mutacions d'*EGFR* en tumors de mama esporàdics i/o triples negatius. Comenten l'absència de mutacions d'*EGFR* en 11 tumors de mama esporàdics amb

INTRODUCCIÓ

amplificació d'*EGFR* (**Bhargava, 2005**); o absència de mutacions d'*EGFR* en 42 tumors de mama esporàdics (**Generali, 2007**); o absència de mutacions d'*EGFR* en 58 càncers de mama triple negatiu de pacients japoneses (**Toyama, 2008**).

Aquesta freqüència de mutacions activadores d'*EGFR* mostra variacions geogràfiques i ètniques, que suggereixen la possibilitat d'existir factors carcinogènics ambientals específics.

Malgrat sovint es troba immunohistoquímicament una sobreexpressió d'*EGFR*, en un 76% de casos de càncers de mama triple negatiu amb característiques basal-like, no s'observa correlació significativa entre l'expressió immunohistoquímica de la proteïna d'*EGFR* i la presència de mutacions en el gen *EGFR*. Comenten que l'amplificació del gen *EGFR* mai es detecta en pacients menors de 50 anys, per això, diuen que només es beneficiarien del tractament anti-*EGFR* una petita fracció de càncer de mama triple negatiu amb perfil basal-like majors de 50 anys (només 13% mostren el perfil molecular adequat de FISH *EGFR*+, IHQ *PTEN*+, *EGFR-downstream wt*) (**Martin, 2012**).

La troballa d'aberracions genètiques en la via dels receptors de tirosin-kinasa/*RAS*/*MAPK* són molt rares en els TNBC. Mencionant que no es troben mutacions en *EGFR*, *RAS* ni *BRAF*; només es detecta polisomia del cromosoma 7 (*EGFR* localitzat a regió 7p12) en un 8% de casos per FISH i que l'amplificació del gen *EGFR* acompanyada de forta expressió de membrana de la proteïna *EGFR* només s'observa en un dels casos de la sèrie de *Grobe et al* (**Grob, 2012**).

L'estudi de l'estat d'*EGFR* pot ser útil en TNBC, però la manca d'acord en els assaigs estandarditzats i la manca d'un "cutt off" de nivells d'expressió respecte el pronòstic, limiten la seva utilització (**Hudis, 2011**).

PIK3CA

PIK3CA "phosphatidylinositol 3'-kinase" forma part d'una subunitat catalítica de la cinasa que regula la via dels receptors de factors de creixement epidèrmic i es troba mutat en un gran ventall de tumors, inclosos còlon, ovari, mama, cervell, fetge i leucèmies. Se sap que el gen *PIK3CA* s'encarrega de codificar la

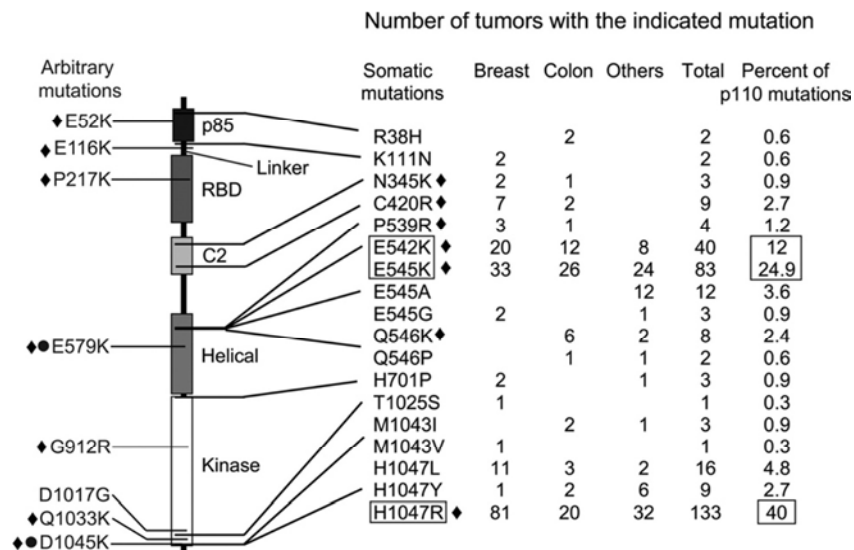
INTRODUCCIÓ

subunitat catalítica p110 α de la cinasa 3 fosfatidilinositol (PI3K), de manera que les mutacions activadores d'aquest gen resulten en un guany de la seva funció i transformació oncogènica, causant una sobre-regulació de la senyal de la via AKT. Sent així, la mutació un esdeveniment precoç en el càncer de mama i que sovint té un paper més important en la iniciació tumoral que en la progressiva invasió, podent marcar una possible diana terapèutica i ser un important factor pronòstic (**Baker, 2012**).

L'alteració en la via de senyalització de PI3K/AKT és la més recurrent en el càncer de mama, oscil·lant al voltant de 35%, 23% i entre 5%-13.2% en càncers de mama receptors hormonals positius, Her2 positius i triple negatius, respectivament (**Cossu-Rocca, 2015**). S'han descrit les mutacions del gen *PIK3CA* fins en un 10.2% de TNBC, després de l'esdeveniment clonal més freqüent de la mutació *TP53* en un 62% (**Lehmann₂, 2014**).

Al voltant del 80% de les mutacions somàtiques del gen *PIK3CA* succeeixen en tres "hotspot": dos situats en l'exó 9 en un domini hèlix (codons E542K i E545K) i una en l'exó 20 en un domini cinasa (codó H1047R) (Figura 22).

Figura 22: Localització dels "hotspot" del gen *PIK3CA* (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)



Encara que alguns estudis relacionen l'estat mutacional de *PIK3CA* amb marcadors de bon pronòstic i millora significativa de la supervivència en càncer de mama, altres diuen que no s'observa un efecte significatiu i altres diuen que les mutacions en l'exó 9 són independents de l'associació amb la recurrència o

INTRODUCCIÓ

mort (**Barbareschi, 2007**), mentre que les mutacions en l'exó 20 s'associen a millor pronòstic (**Cizkova, 2012**).

La presència d'un pseudogèn en el cromosoma 22, que té una seqüència homòloga en més del 95% amb l'exó 9 interfereix en la detecció de les mutacions en els dominis hèlix, especialment, en el triplet GAG del codó 545 pel triplet GCG del pseudogèn, i per la igualtat de seqüències en el codó 542 entre el gen i el pseudogèn. Es per això, que és necessari dissenyar dos *primers* (cebadors) de seqüenciació amb extrem 3' diferent en dos parells de bases per tal d'amplificar el gen o pseudogèn (**Baker, 2012**).

Es comenta l'existència d'una possible relació dels TNBC entre la mutació del gen *PIK3CA* i l'expressió de receptors d'andrògens (aproximadament el 10-20% TNBC expressen RA), ja que s'ha vist que la teràpia genètica o farmacològica dels receptors d'andrògens en les cèl·lules que l'expressen incrementa l'augment de l'activitat inhibidora dels inhibidors de PI3K, indicant així un millor pronòstic (l'expressió de RA s'ha descrita en un 25-35% de TNBC, indicant un millor pronòstic) (**Zhan, 2015**). Les mutacions de *PIK3CA* en els TNBC es troben més freqüentment en casos de RA+ (40%) versus RA- (4%), sobretot en el domini cinasa (exó 20). Per tot això, que es planteja si la combinació d'antagonistes dels receptors d'andrògens (com "bicalutmid") i inhibidors PI3K tenen un efecte additiu o sinèrgic en el creixement de les cèl·lules dels TNBC RA+ (**Lehmann₂, 2014**).

Mencionar que el receptor d'andrògens (RA) és un membre de la família dels receptors de les hormones esteroides, que s'expressa fins en un 70% dels càncers de mama, i podria estar implicar en el procés de la patogènesis. L'expressió de RA podria ser especialment interessant com a diana potencial en els TNBC, en els que no es pot plantejar cap tractament hormonal estàndard. És especialment rellevant l'aportació de *Gonzalez Angulo* en el que es descriu una major probabilitat d'expressió de RA en aquells TNBC amb *PIK3CA* mutat, respecte els casos *PIK3CA* wild-type, fet que podria suposar una diana potencial molt selectiva en un subgrup de pacients (**GEICAM, 2010**).

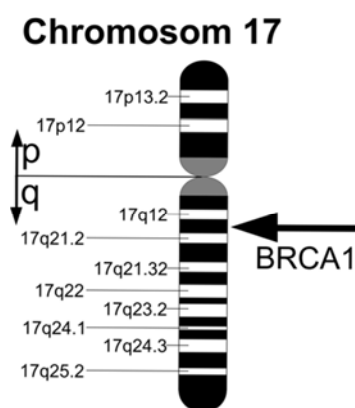
INTRODUCCIÓ

BRCA1

BRCA1 és un gen que es localitza al braç llarg (q) del cromosoma 17 a la posició 21 (Figura 23). Es tracta d'un gen supressor de tumors, de manera que l'expressió de la proteïna BRCA1 controla i regula el creixement i la divisió cel·lular.

BRCA1 juga un paper vital en la reparació de l'ADN per la recombinació homòloga, de manera que la manca de funció del BRCA1/2 en les cèl·lules no permet la reparació del trencament de l'ADN de doble cadena, augmentant així el risc de càncer (Yadav, 2015).

Figura 23: Imatge-esquema del cromosoma 17, on es troba situat el gen BRCA



Les mutacions en el gen *BRCA1* es troben en aproximadament un 45% de famílies amb alta incidència de càncer de mama i fins al 80% de famílies amb alta incidència de coexistència de càncer de mama i ovari (Bal, 2012).

No s'observa evidència de mutació del gen *BRCA1* en els càncers de mama esporàdics. Però s'ha demostrat que la desregulació dels nivells d'ARN missatger de *BRCA1* i la metilació de la seva regió promotora tenen un paper potencial en la progressió dels càncers de mama esporàdics, ja que actuen com a fenòmens precoços de la tumorigènesi, associant-se a la silenciament dels gens supressors de tumor. De manera, que els baixos nivells d'expressió de la proteïna BRCA1, deguts a mecanismes epigenètics de "down-regulation", com la metilació del promotor o la silenciament transcripcional, mostren una associació significativa amb l'adquisició de capacitat metastàtica dels càncers de mama esporàdics amb fenotip basal (Reis-Filho, 2008).

Per tant, la inactivació del gen *BRCA1* pot ser deguda, per una banda, a mutació somàtica i desequilibri al·lèlic, que no s'ha observat en càncers esporàdics; o per una altra banda, a un mecanisme d'inactivació epigenètica

INTRODUCCIÓ

del gen supressor de tumor a través d'una metilació aberrant addicional de regions riques en illes CpG (hipermetilació de les illes CpG de la regió promotora). Aquesta hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* s'associa a una inactivació del gen, que actua de forma similar als casos de *BRCA1* mutats en línia germinal.

Es per això, que es coneixen l'existència de similituds histològiques i fenotípiques entre el càncer de mama triple negatiu i càncer de mama hereditari, associat a mutacions germinals del gen *BRCA1*, creant-se així el concepte de "BRCAness" que s'acostuma a associar a manca d'expressió de receptors hormonals, Her2 negatiu, subtipus medul·lar i mucinós, amplificació de MYC i similituds globals en els perfils d'expressió gènica **(Ibragimova, 2011)**.

De manera, que es considera que la disfuncionalitat del gen *BRCA1* pot jugar un paper potencial en dos sentits en els càncers de mama triple negatius, per una banda com a diana terapèutica, i per altra, com a marcador pronòstic de resposta a determinades teràpies **(Sharma, 2014)**.

Degut a aquests fenòmens d'alteracions relacionades amb el gen *BRCA*, varis patrons de metilació de l'ADN s'han proposat com a potencials marcadors i possibles futures dianes terapèutiques pels assaigs clínics, entre ells la possibilitat d'utilització dels inhibidors de PARP1 (polimerasa-1 poliADP-ribosa) o quimioteràpies basades en agents que danyen l'ADN (com els platins), que s'han descrit que són sensibles en càncers de mama amb hipermetilació del *BRCA1* i en els tumors amb fenotip BRCAness, igual que passa en els casos de càncers de mama amb *BRCA1* mutats, on s'observa una major resposta tumoral **(Cai, 2013)**, ja que danya un dels braços de l'ADN que no es pot reparar per la recombinació homòloga degut a la presència d'una disfunció del gen *BRCA*, provocant així un efecte sinèrgic **(Yadav, 2015)**.

En la literatura s'han descrit diferents percentatges d'hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* en càncer de mama, alguns dels quals han intentat relacionar aquestes troballes amb altres característiques.

S'observa que la hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* és present en el 17,04 % de casos de càncer de mama esporàdics i, que aquests pacients mostren un estat clínic favorable amb tumors més petits, sense mutació en el

INTRODUCCIÓ

gen *TP53* i són de tipus lobel·lar, associant-se dèbilment a una millor supervivència **(Krasteva, 2012)**.

També s'ha descrit la presència d'hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* en un 24% de càncers de mama esporàdics, alguns dels quals coexpressant certa positivitats immunohistoquímica per a *BRCA1*, en un 90% dels càncers amb receptors d'estrògens negatius, en un 36% dels càncers amb expressió de marcadors basals i en un 35% dels càncers triple negatius estudiats **(Bal, 2012)**.

Es troba que carcinomes d'alt grau s'associen a pèrdua progressiva d'expressió de *BRCA1*; així com s'observa associació significativa entre l'expressió nuclear de *BRCA1* i proporció de carcinomes medul·lars, medul·lars atípics i carcinomes d'alt grau **(Lambie, 2003)**.

També, s'ha arribat a la conclusió que els casos TNBC tractats amb quimioteràpies habituals "antraciclins+/-taxans", en els quals es demostra hipermetilació del promotor del gen *BRCA1*, tenen pitjor resposta (aquests resultats permeten identificar la presència d'hipermetilació com un possible indicador de mal pronòstic a tractaments quimioteràpics estàndards). No es coneix un motiu real del pitjor pronòstic, però es plantegen potencials explicacions per les quals la inactivació epigenètica del *BRCA1* en els TNBC esporàdics es manifesta intrínsecament en tumors més agressius i invasius, ja que inclouen mecanismes d'increment del creixement, d'expansió de cèl·lules progenitores/stem, d'activació de l'expressió de gens pro-invasius i de la reducció de la sensibilitat a teràpies com la quimioteràpia estàndard. Preguntant així, ja que sabem que els càncers de mama amb mutació germinal del *BRCA1* s'associen a major sensibilitat a agents de platins, si és possible que els casos de càncer de mama esporàdics amb hipermetilació es beneficiarien millor de teràpies amb components de platins i/o inhibidors PARP **(Sharma, 2014)**.

ALTRES

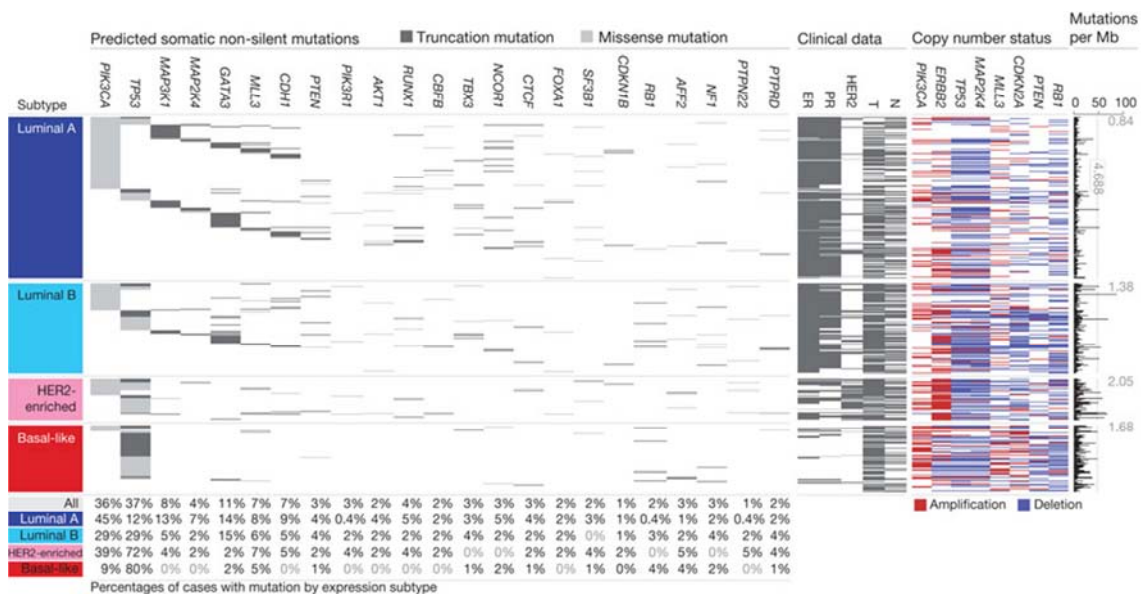
En la última dècada la introducció de tecnologies moleculars d'alt rendiment han permès explorar l'arquitectura genòmica dels càncers i ens estan mostrant

INTRODUCCIÓ

la malaltia amb una resolució d'imatge espectacular. Entre elles les tecnologies que mesuren l'expressió de múltiples gens (les tècniques de seqüenciació massiva) han impactat molt significativament en els treballadors de l'àmbit sanitari permeten així començar a entendre la heterogenicitat de la malaltia. De manera que la informació que aporta l'estudi de l'expressió gènica ja ha demostrat tenir utilitat clínica, i ja es disposen d'alguns test comercialitzats, els resultats dels quals, ajuden a prendre decisions terapèutiques i a conèixer el pronòstic de la malaltia.

Actualment, quan es parlen d'estudi mutacionals, no es poden oblidar les tècniques de seqüenciació massiva en càncer, com pot ser el de mama, que mostren una gran variabilitat en els resultats sense troballes significatives, en especial en el subtipus triple negatiu/basal-like, on s'observen un gran ventall de mutacions somàtiques, de les quals només unes poques són mutacions recurrents i amb freqüència significativa (s'observen mutacions en els gens *PIK3CA*, *TP53*, *GATA3* i *MLL3*) (Shah, 2012) (Figura 24).

Figura 24: Resultats de les tècniques de seqüenciació massiva en càncer de mama



Són excepcionals les troballes de mutacions en els gens *KRAS*, *NRAS* o *BRAF*. Destacant només la troballa de mutacions en el gen *TP53*, de fins un 31,4% en càncers de mama triple negatiu (Kim, 2013), del qual avui dia encara no se'n coneix tractament específic.

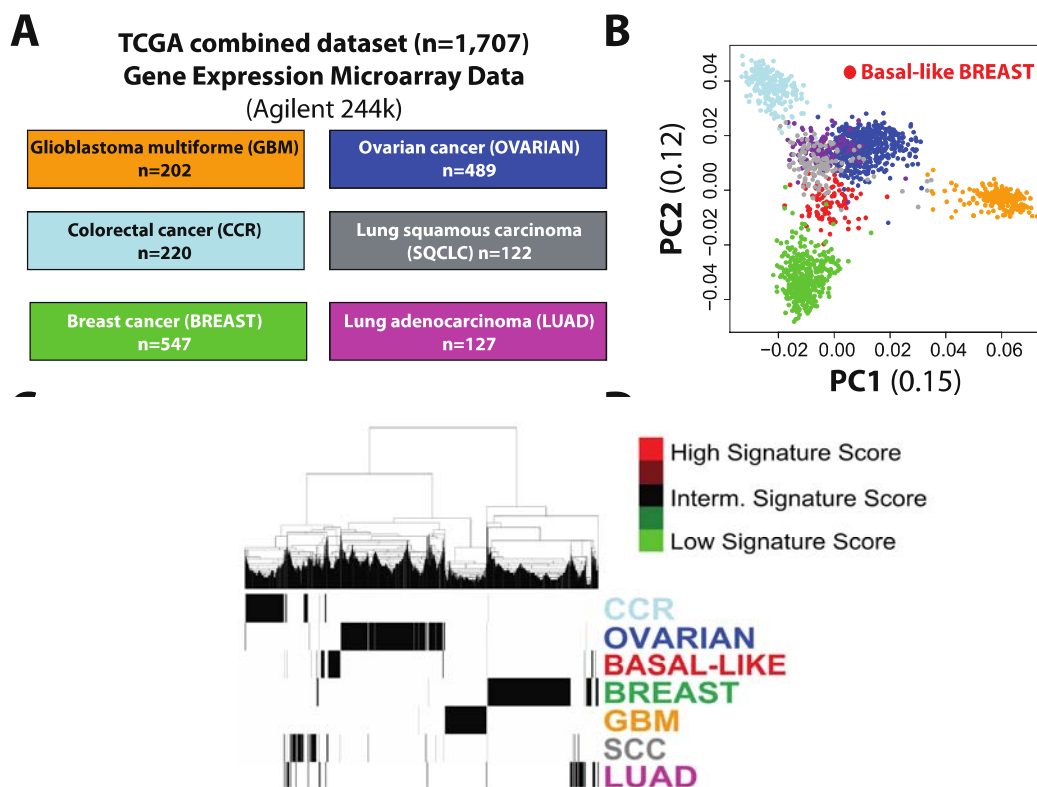
La comprensió molecular de les característiques del càncer de mama amb el projecte de l'atles genòmic del càncer (TCGA) ha confirmat que entre tots els

INTRODUCCIÓ

subtipus intrínsecs, el Basal-like és el més divers; predominant en noies joves, associant-se a mutacions de *BRCA1* i sent una malaltia molt agressiva.

Per tant, la pregunta de com es pot diferenciar el càncer de mama Basal-like de la resta de subtipus? Es pot explicar per dos estudis, per una banda el subtipus Basal-like a nivell molecular per PAM50 es considera més proper als càncers colorectals i d'ovari, i fins en més d'un 70% al carcinoma escamós de pulmó, que no pas als subtipus luminals de càncer de mama (Figura 25). Per altra banda, el càncer de mama Basal-like es una entitat única i diferent de la resta de subtipus de càncer de mama, per la seva gran heterogenicitat biològica.

Figura 25: Imatges d'estudis moleculars on es localitza el carcinoma de mama tipus basal més proper a càncers colorectals, d'ovari o escamosos de pulmó que luminals de mama



En estudis *in vivo* preclínic es comenta que en l'origen de la glàndula mamària existeixen dos tipus de cèl·lules molt diferents, una que es transforma i dona els tipus Basal-like i una altra que en transformar-se dona els subtipus no Basal-like (*Prat, 2013; Prat, 2015*).

Tal i com s'ha anat descrivint, els tumors de mama en humans tenen una gran diversitat en la història natural i les seves respostes a tractaments,

INTRODUCCIÓ

probablement influenciat per la gran diversitat biològica de les cèl·lules i els tumors.

Malgrat els grans avenços en el coneixement del càncer de mama en els darrers anys, s'ha de ser conscients que el maneig actual es troba entre dos móns molt dispersos: el món "antic", on es segueix classificant el càncer de mama en grups basats en característiques morfològiques de les cèl·lules malignes i els resultats de determinats estudis immunohistoquímics; i un món "nou" amb un sense fi de dades genòmiques que classifiquen aquesta malaltia de mil maneres. Ara bé, no es pot oblidar que encara queda molt de camí per endavant per esbrinar l'evolució de la malaltia en cada pacient i en especial en el càncer de mama triple negatiu.

INTRODUCCIÓ

HIPÒTESI

HIPÒTESI

HIPÒTESI

HIPÒTESI DE TREBALL

El càncer de mama denominat “tipus triple negatiu” comparteix alteracions patogèniques amb diferents oncogens, en concret EGFR i PIK3CA, i alteracions epigenètiques del gen BRCA1, susceptibles de ser detectades mitjançant tècniques de biologia molecular i que poden eventualment derivar en diferents estratègies terapèutiques en pacients amb aquest tipus de malaltia neoplàsica.

HIPÒTESI

OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIUS

PRINCIPAL

- Determinar el perfil mutacional d'*EGFR* i *PIK3CA* i l'estudi de metilació del promotor del gen *BRCA1* amb tècniques de piroseqüenciació, en una cohort retrospectiva de pacients amb càncer de mama tipus triple negatiu.

SECUNDARIS

- Relacionar els perfils mutacionals i d'hipermetilació amb variables histopatològiques convencionals.
- Relacionar els perfils mutacionals i d'hipermetilació amb biomarcadors immunohistoquímics de cèl·lula basal i receptors hormonals androgènics definits en aquest tipus de neoplàsia.
- Relacionar els resultats obtinguts amb variables clíniques i evolutives.

OBJECTIUS

METODOLOGIA

METODOLOGIA

METODOLOGIA

AMBIT DE L'ESTUDI

Secció de Patologia Molecular, integrada dins del servei d'Anatomia Patologia de la Corporació Sanitària Parc Tauli, Hospital Universitari, de Sabadell.

DISSENY DE L'ESTUDI

Estudi observacional, descriptiu i retrospectiu, des de gener del 2006 a desembre de 2011, que inclou 60 casos (blocs de parafina) pertanyents a 60 pacients, que compleixen criteris de càncer de mama tipus triple negatiu (TNBC), definit pels estudis immunohistoquímics d'absència d'expressió de receptors d'estrògens, receptors de progesterona i d'Her-2/neu.

PROCEDIMENT

El procediment de l'estudi consta de quatre grans parts, una basada en la recopilació de dades clíniques, una basada amb la revisió de les característiques histològiques i dues més basades en la realització d'estudis immunohistoquímics i moleculars complementaris.

RECOPIACIÓ DE DADES

La recopilació de dades consisteix en conèixer determinada informació de les 60 pacients de la cohort i consta de dues grans parts, la diagnòstica i la de seguiment.

La part diagnòstica consisteix en conèixer tota una sèrie de dades relacionades amb el moment del diagnòstic i del tractament a seguir de la neoplàsia. Inclou saber l'edat de la pacient en el moment del diagnòstic del càncer de mama, la mama afectada i el tipus de cirurgia, local i axil·lar, realitzada.

METODOLOGIA

La part del seguiment consisteix en la revisió continuada de la història clínica de les pacients de la cohort, per a conèixer l'evolució dels carcinomes, és a dir, la seva supervivència, possibles recidives/recaigudes, aparicions de metàstasis i possibles morts. Sense oblidar la revisió de possibles antecedents neoplàsics mamaris i el coneixement, en els casos en què s'hagi realitzat, del resultat de l'estudi genètic del gen *BRCA* de les pacients.

REVISIÓ DE LES CARACTERÍSTIQUES HISTOLÒGIQUES

La revisió histològica consisteix en la revisió de la descripció macroscòpica i microscòpica dels informes anatomopatològics dels 60 tumors, junt amb l'anàlisi microscòpic de les laminetes tumorals tenyides amb Hematoxilina-Eosina, per a conèixer les dades histològiques convencionals, com són el tipus histològic, el grau de diferenciació tumoral (Bloom and Richardson, després modificat per Elston and Ellis), la presència o l'absència de necrosi i en quina quantitat, la presència o l'absència d'imatges d'invasió angiolímfàtica i perineural, l'afectació ganglionar i l'estadiatge oncològic patològic (pTNM).

REALITZACIÓ D'ESTUDIS IMMUNOHISTOQUÍMICS

Els estudis immunohistoquímics realitzats són de receptors d'estrògens (RE), receptors de progesterona (RPG), receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (Her-2/neu), índex proliferatiu de Ki-67, Citoqueratina 5/6 (CK5/6), receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) i receptors d'andrògens (RA).

Per a dur a terme tots aquestes estudis s'han utilitzat blocs de parafina que contenen teixit tumoral fixat en formol al 10%, dels quals s'ha realitzat una primera secció de 4 micròmetres (μm) de gruix, que és tenyida amb Hematoxilina-Eosina per a conèixer la regió tumoral a valorar



Reactius dels estudis immunohistoquímics:

Anticossos monoclonals utilitzats (Taula 2)

Taula 2: Característiques dels anticossos (AC) immunohistoquímics utilitzats

| Anticòs | Casa comercial | Clona | Codi | Temps incubació d'AC primari |
|---------|------------------------------|---------|----------------|------------------------------|
| RE | DAKO | SP1 | IR084 | 15 minuts |
| RPG | DAKO | PRED | IR068 | 20 minuts |
| Her2 | DAKO | SK001 | Kit Herceptest | 30 minuts |
| Ki67 | Menarini NCL-Ki67- hM1 | MM1 | 35178 | 25 minuts |
| CK5/6 | DAKO | D5/16B4 | IR780 | 20 minuts |
| EGFR | LEICA | EGFR.25 | RTU-EGFR-384 | 15 minuts |
| RA | DAKO | AR441 | M3562 | 20 minuts |



Protocol dels estudis immunohistoquímics:

- a. Seleccionar el bloc de teixit que conté tumor per a valorar l'expressió immunohistoquímica dels diferents anticossos estudiats en les cèl·lules tumorals.
- b. Realitzar una secció de 4 µm de gruix del bloc de parafina sobre una lamineta pretractada amb sialidina, per a cada un dels anticossos a estudiar.
- c. Desparafinar el teixit per tècniques rutinàries: estufar a 65°C durant 30 minuts; després passar-ho per tres solucions de xilol, durant 5 minuts en cada una; posteriorment hidratar-ho en solucions d'alcohols decreixents (100%, 96%, 80% i 50%), durant 5 minuts en cada una; seguidament deixar-ho en un recipient amb aigua destil·lada durant 30 minuts; i per últim rentar amb tres banys de PBS, durant 5 minuts cada un.
- d. Desemmascament antigènic (per destruir les unions del formaldehid) incubant en citrat a pH 6.0 durant 3 minuts a 95-99°C.
- e. Refredament durant 20 minuts.
- f. Tractament amb pepsina.
- g. Incubar amb 3% H₂O₂ durant 5 minuts.

METODOLOGIA

- h. Tinció pròpiament d'immunohistoquímica:
 - a. Incubar amb l'anticòs primari durant el temps predeterminat, utilitzant l'equip "Autostainer de Dako" que detecta a través de la reacció de peroxidasa *EnVision™-Dual Link kit (Dako. Envision Plus Detection Kit; Carpinteria, CA. USA)*.
 - b. Contratenyir amb Hematoxilina.
 - c. Muntar amb el cobreobjectes.

L'estudi de l'anticòs d'EGFR s'ha dut a terme mitjançant la màquina "BondMAX de Leyca", on el procediment de tinció immunohistoquímica és diferent des de l'apart "c", encara que la base de la tècnica és la mateixa.

Un cop les laminetes estan desparafinades s'introdueixen a l'autotenyidor d'immunohistoquímica "BondMax" i comença el següent procés:

- a. Desparafinació amb solució *Bond Dewax* durant 30 minuts a 72°C.
- b. Rentat amb solució buffer *Bond Wash* durant 5 minuts a temperatura ambient.
- c. Recuperació antigènica amb solució *Bond Epitope Retrieval 1* a pH6 durant 20 minuts a 100°C.
- d. Bloqueig amb la peroxidasa endògena durant 5 minuts a temperatura ambient.
- e. Incubació amb l'anticòs monoclonal de ratolí EGFR durant 15 minuts a temperatura ambient.
- f. Incubació amb *Post-Primary* de conill anti-ratolí durant 8 minuts a temperatura ambient.
- g. Rentat amb solució buffer *Bond Wash* durant 6 minuts a temperatura ambient.
- h. Aplicació del polímer anti-conill durant 6 minuts a temperatura ambient.
- i. Rentat amb solució buffer *Bond Wash* durant 6 minuts a temperatura ambient.
- j. Rentats amb aigua destil·lada.
- k. Aplicació de la solució de diaminobenzidina amb substrat de cromogen durant 10 minuts a temperatura ambient.
- l. Rentats amb aigua destil·lada.

METODOLOGIA

- m. Contraintinció amb Hematoxilina durant 5 minuts a temperatura ambient.
- n. Rentat amb aigua destil·lada.
- o. Rentat amb solució buffer *Bond Wash*.
- p. Rentat amb aigua destil·lada.
- q. Retirar les laminetes de l'autotenyidor d'immunohistoquímica i es procedeix al muntatge amb deshidratació amb alcohol absolut durant 10 minuts, seguit de submersió amb xilol durant 10 minuts, aplicació de *DPX* i afegir el cobreobjectes.



Valoració dels resultat immunohistoquímics:

S'obté una lamineta que conté una secció de teixit amb cèl·lules tumorals tenyides de color blau (tinció negativa) i marró (tinció positiva). La interpretació d'aquest resultats es realitzada per un patòleg, on valora la presència/absència de tinció nuclear/citoplasmàtica/de membrana en el teixit tumoral, depenent de cada anticòs, sempre amb presència de control intern positiu en el teixit mamari peritumoral o en teixit extern present en la mateixa lamineta.

Es considera per a cada anticòs:

- Receptors hormonals d'estrògens i progesterona, s'interpreten seguint les recomanacions de les guies americanes (2010 ASCO/CAP guidelines) (**Hammond, 2010**), on es determina el percentatge de positivitat en 100 cèl·lules valorades en camps de gran augment:
 - o Negatiu: expressió nuclear menor o igual a un 1% de les cèl·lules tumorals.
 - o Positiu: expressió nuclear major a un 1% de les cèl·lules tumorals (concretant percentatge i intensitat).
- Her2/neu, s'interpreta seguint les recomanacions de les guies americanes (**Wolff, 2007**):
 - o Negatiu (score 0): absència de tinció de membrana o casi imperceptible.

METODOLOGIA

- Negatiu (score 1+): tinció de membrana dèbil i incompleta en menys d'un 10% de les cèl·lules tumorals.
 - Borderline (score 2+): tinció de membrana dèbil i completa entre un 10-30% de les cèl·lules tumorals.
 - Positiu (score 3+): tinció de membrana moderada-marcada i completa major d'un 30% de les cèl·lules tumorals.
- L'índex proliferatiu de Ki67 consisteix en valorar el contatge de nuclis positius en 100 cèl·lules tumorals observades en camps de gran augment (magnificacions de 400x), seguint la guia proposada al Consens Internacional d'Experts de St. Gallen 2015 (**Goldhirsch, 2015**) es considera:
- Baix: < 5% de les cèl·lules tumorals.
 - Mig: entre el 5 i < 14% de les cèl·lules tumorals.
 - Alt: \geq 14% de les cèl·lules tumorals.
- Citoqueratina 5/6 s'han tingut en compte dos resultats, com es descriu en (**Riccardi, 2015**):
- Divisió dicotòmica segons un cutt off de positivitat:
 - Negatiu: qualsevol positivitat en <5% de les cèl·lules neoplàsiques.
 - Positiu: qualsevol positivitat en \geq 5% de les cèl·lules neoplàsiques.
 - Valorant la positivitat citoplasmàtica en les cèl·lules neoplàsiques, dividint els resultats en quatre grups segons el percentatge i intensitat de cèl·lules tumorals positives
 - 0: absència total de tinció.
 - 1-negativa: tinció citoplasmàtica dèbil en < 10% de les cèl·lules neoplàsiques.
 - 2-moderada: tinció citoplasmàtica dèbil o moderada entre un 10-50 % de les cèl·lules neoplàsiques.
 - 3-marcada: tinció moderada o marcada en > 50% de les cèl·lules neoplàsiques.

METODOLOGIA

- Pel receptor del factor de creixement epidèrmic no existeixen criteris establerts per a la valoració dels resultats immunohistoquímics de la tinció d'EGFR en càncer de mama, de manera que hem valorat la immunoreactivitat de membrana en quatre grups similars als utilitzats en la valoració immunohistoquímica d'Her-2, tal i com descriuen alguns autors (**Arnes, 2009; Viale, 2009; Toyama, 2008; Bhargava, 2005**).
 - o 0 (negatiu): absència de tinció de membrana en les cèl·lules neoplàsiques.
 - o 1+ (negatiu): tinció de membrana incompleta i dèbil en les cèl·lules neoplàsiques.
 - o 2+ (borderline): tinció de membrana completa i dèbil en > 10% de les cèl·lules neoplàsiques.
 - o 3+ (positiu): tinció de membrana completa i moderada o intensa en > 10% de les cèl·lules neoplàsiques.

També mencionar que si els classifiquéssim com a variable dicotòmica, parlariem de:

- Positiva: positivitats citoplasmàtica major a un 1% de les cèl·lules neoplàsiques (inclou el grup 1, 2 i 3 – positius).
 - Negativa: positivitats citoplasmàtica menor o igual a un 1% de les cèl·lules neoplàsiques (inclou el grup 0-negatiu).
- En els receptors d'andrògens es valora l'expressió nuclear, independentment del nivell d'intensitat, segons un llinar (**Lehmann₂, 2014**):
 - o Negatiu: positivitats nuclear $\leq 30\%$ de les cèl·lules neoplàsiques.
 - o Positiu: positivitats nuclear $> 30\%$ de les cèl·lules neoplàsiques.

REALITZACIÓ D'ESTUDIS MOLECULARS

Els estudis moleculars realitzats són les mutacions a regions "hotspot" del gen *EGFR*, les mutacions a regions "hotspot" del gen *PIK3CA* i la hipermetilació de la regió promotora del gen *BRCA1*.

METODOLOGIA

L'estudi molecular s'ha dut a terme a través de la tècnica de piroseqüenciació que consisteix en un estudi quantitatiu de seqüenciació d'ADN a temps real. Es basa en la síntesi de la cadena d'ADN acoblada a una reacció quimioluminiscent. Indicant com a resultat el percentatge de mutació present en la mostra. Els avantatges principals d'aquesta tècnica són la millora de la sensibilitat, vers la seqüenciació de Sanger, i la possibilitat d'anàlisi de moltes variants, no només de mutacions puntuals (PCR específiques d'al·lels), com en el cas d'alguns estudis duts a terme mitjançant qPCR.

La piroseqüenciació és una seqüenciació per un mètode de síntesi que consisteix en una monitorització quantitativa en temps real dels nucleòtids incorporats a través d'una conversió enzimàtica de pirofosfats que es tradueix en un senyal bioluminomètric. Aquest mètode és majoritàriament de naturalesa quantitativa, però basat en curtes lectures i ràpides mesures. S'ha descrit com una de les tècniques més òptimes per a l'anàlisi de l'estat de metilació del promotor del gen *BRCA1* i/o altres gens **(Cai, 2013)**.

Per a realitzar les tècniques molecular és necessari l'extracció d'ADN de les mostres fixades en formol i incloses en parafina, saber el funcionament d'una PCR i en què consisteix la tècnica de piroseqüenciació utilitzada en la tesi.



PROTOCOL D'EXTRACCIÓ D'ADN

(utilitzant el Kit: *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, ref.:56404)

- Seleccionar la zona concreta de la mostra a estudiar
- Tallar macroscòpicament l'excés de parafina
- Tallar 5 seccions de 10 µm
- Col·locar-les immediatament en un tub eppendorf estèril de 1.5 ml
- Desparafinar amb dos rentats seguit amb xilol:
 - Afegir 1ml de xilol +
 - Vòrtex, durant 10 segons +
 - Centrífuga a 14.000rpm, durant 2 minuts
 - Eliminar el sobrenedant, sense tocar el pèl·let

METODOLOGIA

- Fer dos rentats amb etanol absolut, per eliminar l'excés de xilol:
 - Afegir 1ml d'etanol +
 - Vòrtex, durant 10 segons +
 - Centrífuga a 14.000rpm, durant 2 minuts
 - Eliminar el sobrenedant, sense tocar el pèl·let
- Deixar el tub obert (a 15-25°C o 37°C) fins que s'evapori tot l'etanol
- Resuspendre el pèl·let en 180µl *ATL* + 20µl proteïnasa K
- Vòrtex
- Incubar a 56°C, un mínim de 12h (tota la nit), per aconseguir una lisi completa
- Incubar a 90°C, durant 1h, fins aconseguir una mostra transparent
- Vòrtex + "spin" de centrífuga
- Afegir 200µl etanol + 200µl de buffer *AL*
- Vòrtex vigorós i "spin" de centrífuga
- Transferir a columna *QIAamp MinElute*, sense tocar les parets
- Centrífuga 1 minut a 8000rpm + canviar a *tube collection*
- Afegir 500µl de buffer *AW1* + centrífuga 1 minut a 8000rpm + canviar de tub
- Afegir 500µl de buffer *AW2* + centrífuga 1 minut a 14000rpm + canviar de tub
- Centrífuga 3 minuts a 14000rpm
- Canviar el tub per un eppendorf 1.5ml
- Afegir entre 20-100µl de buffer *ATE*, en el centre de la membrana (es recomana afegir aproximadament uns 30µl del buffer que es troba a temperatura ambient 20-23°C)
- Incubar 1-5 minuts a temperatura ambient + centrífuga 1 minut a 14000rpm

Un cop realitzada l'extracció d'ADN d'una mostra de parafina s'ha de valorar la concentració de mostra obtinguda a veure si és adequada. Aquesta valoració s'ha dut a terme a través d'un espectrofotòmetre d'absorció ultravioleta-visible, acceptant com a adequat el resultat de lectura de quantificació d'ADN amb una ratio d'absorbància 260/280 que es trobi entre un interval de 1.6-1.8. Ara be, les noves lectures realitzades en els casos que s'han hagut de fer una segona extracció d'ADN tumoral i l'extracció d'estroma normal s'ha dut a terme a través d'un fluorímetre. Els resultats obtinguts amb els dos mètodes no són

METODOLOGIA

equivalents de manera directe sinó a través d'una equivalència, degut a que el tipus de lectura és diferent i dóna valors menors a mateixa quantificació d'ADN, ja que l'espectrofotòmetre quantifica com a ADN una fracció d'ARN de la mostra.



PCR

- Descongelar els reactius fins a tenir-los a temperatura ambient.
- Prepara els *primers* (cebadors), centrifugant 1 minut a 4000rpm per concentrar els *primers* liofilitzats, re-suspendre amb buffer *TE* (*Tris-EDTA*, pH8) cada un dels primers amb les quantitats determinades pel fabricant per a poder obtenir concentracions de 100µM (solució mare); després fer un vòrtex i deixar a la nevera a 4°C durant 24h.
- A partir d'aquí preparar la solució de treball a 10µM.
- Preparar la MIX de reacció segons el següent protocol: *PyroMark PCR Master Mix* 12.5µl + *CoralLoad* 2.5µl + *Primer Forward* 1µl + *Primer Reverse* 1µl + Aigua (del Kit) 4µl = 20µl.
- Preparar el nombre de reaccions necessàries (nombre de mostres a estudi), més dues reaccions per a introduir controls, un del KIT (ADN no metilat no mutat) i un blanc (sense mostra).
- Preparar un tub (MIX) per a cada un dels primers.
- Preparar la PCR amb: 20µl Mix de PCR + 5µl ADN de cada mostra a analitzar = obtindrem un volum total de 25µl per mostra amb una concentració de *primer* en cada una de 0.4µM (la concentració idònia dels primers oscil·la entre 0.1-0.5µM). La concentració de treball de les mostres per posar 5µl ha de ser de 5ng/µl (quantitat total d'ADN introduït a la PCR, 25ng).
- Introduir les reaccions a la màquina de PCR, seleccionant el programa de "PCR piro" amb les següents fases:
 - 15 minuts a 95°C (activació de la *HotStart Polimerasa*).
 - 20 segons a 95°C (fase de desnaturalització ADN).
 - 30 segons a 53°C (fase d'hibridació *primers*).
 - 20 segons a 72°C (fase de replicació).
 - 10 minuts a 72°C (fase de replicació final).

METODOLOGIA

Els passos de desnaturalització-hibridació-replicació es repeteixen 35 cicles.

TÈCNICA DE PIROSEQÜENCIACIÓ

a) Procediment:

Partint del protocol de referència *therascreen KRAS/EGFR/BRAF Pyro Kit*, s'ha optimitzat per adaptar-lo al nostre laboratori, de la manera a continuació descrita.

- Posar els reactius a temperatura ambient 1 hora abans de començar la reacció.
- Encendre el termobloc a 80°C amb un dels suports per les plaques de *PyroMark* a sobre.
- Determinar la configuració de la piroseqüenciació d'aquest assaig (seleccionar i identificar quina mostra posarem a cadascun dels pouets de la placa de piroseqüenciació).
- Agitar suaument el eppendorf que conté "*Streptoavidina-Sefarosa*" fins a homogeneïtzar-lo (no utilitzar el vòrtex, la *safarosa* és sensible a agitacions agressives).
- Preparar la Mix per a la immobilització de l'ADN amb: 1µl *Streptoavidina-Sefarosa* + 40µl *Binding Buffer Pyromark* + 9µl d'aigua del Kit = 70µl.
- Preparar el nombre de reaccions necessàries segons el nombre de mostres a estudi.
- Vòrtex i centrífuga.
- Afegir 70µl de la MIX preparada amb el producte d'immobilització a la placa 3x8 pouets PCR (*thermofast 24*) a cada un dels pouets a estudi segons l'ordre-configurat en què es durà a terme la piroseqüenciació de cada assaig.
- Afegir 10µl de mostra PCR biotinilada (mostres a estudi obtingudes de la PCR) a cadascun dels pouets de la placa 3x8 pouets PCR, seleccionats segons la configuració determinada a la piroseqüenciació.
- Tancar hermèticament els pouets d'aquesta placa d'eppendorf amb la mostra de PCR.

METODOLOGIA

- Agitar aquesta placa a temperatura ambient durant un mínim de 15 minuts a 1500rpm en l'agitador.
 - Mentrestant, preparar l'estació de buit del *PyroMark Q24*, que consisteix en omplir els pouets corresponents per ordre amb etanol 70% (posició 2), solució de desnaturalització (posició 3), Washing Buffer (diluint) (posició 4) i les dues aigües osmotitzades (posició 6 i 7). Assegurar que el volum (aproximadament 40 ml) està en el nivell mig de cada suport i que el volum de Washing Buffer es major que el de la solució de desnaturalització (per netejar correctament la solució de desnaturalització que pot interferir en la reacció de piroseqüenciació).
- | | |
|---|------|
| 4 | Sond |
| 3 | 7 |
| 2 | 6 |
| 1 | 5 |
- Col·locar la placa de piroseqüenciació *PyroMark plate* amb el *primer* que realitzarà la reacció final, resuspès en 25 µl de buffer (posició 5).
 - Connectar la bomba i l'interruptor de buit.
 - Col·locar la placa 3x8 pouets PCR a la posició 1 i introduir amb cura els filtres de l'eina de buit dintre dels tubs de la placa 3x8, per a capturar les esferes de sefarosa.
 - Sempre pujar i baixar l'eina de sondes de filtra de manera vertical.
 - Transferir l'eina de buit al pouet amb etanol (posició 2) i sense parar d'agitar suaument, esperar 10 segons des de que comenci a sortir líquid per l'aspirador.
 - Transferir l'eina de buit al pouet següent amb solució de desnaturalització (posició 3) sense deixar d'agitar suaument, esperar 10 segons des de que comenci a sortir líquid per l'aspirador.
 - Transferir l'eina de buit al pouet següent amb *Washing Buffer* (posició 4) sense parar d'agitar suaument, esperar 15 segons des de que comenci a sortir líquid per l'aspirador.
 - Extreure l'eina de sondes de filtra i mantenir-la vertical més de 90°C, durant al menys 10 segons per assegurar el drenatge de tot el líquid.
 - Passar l'eina a *PyroMark plate* amb reacció d'immobilització (posició 5), desconectant l'interruptor del buit i agitant lateralment, sense pressionar, durant 5 segons. Aquest pas permet deixar anar el ADNss

METODOLOGIA

- (cadena única d'ADN) a cada posició on es realitzarà la piroseqüenciació en sí.
- Transferir l'eina al primer compartiment d'aigua osmòtica (posició 6) i agitar 10 segons.
 - Transferir l'eina al segon compartiment d'aigua osmòtica (posició 7), connectant l'interruptor del buit per a drenar tota l'aigua d'aquest pouet
 - Pujar i baixar més de 90°C l'eina durant 5 segons.
 - Desconnectar l'interruptor i la bomba al buit, i deixar l'eina a la seva posició inicial de "pàrquing".
 - Posar la placa de *PyroMark* (situada a la posició 5) en el termobloc a 80°C durant 2 minuts.
 - Extreure la placa i posar-la en l'altre suport a temperatura ambient durant uns 30 minuts.
 - Mentrestant, s'ha d'encendre el sistema de *PyroMark Q24*, carregar en el software el run amb l'experiment i la ruta (*Tools* → *Pre-Run information*) i carregar els cartutxos amb els reactius de la piroseqüenciació, ja que ja disposem de les dades (quantitats i localització de cada reactiu "enzims, substrat i els 4 nucleòtids: Adenina, Timina, Guanina i Citosina), que consisteix en:
 - Obrir la caixa dels tampons, reactius i enzims.
 - Els enzims i el substrat es poden mantenir en alíquotes congelades, però aquests no es poden descongelar/congelar més de 3 cops, de la mateixa manera que els reactius dissolts o descongelats s'han de tirar als 5 dies.
 - Els enzims i el substrat es descongelen en uns 10 minuts, no s'han d'agitar i s'ha d'assegurar que abans de posar-lo en els cartutxos no estan tèrbols (resuspendre correctament).
 - Col·locar els cartutxos amb etiqueta mirant la part frontal del piroseqüenciador i introduir els reactius segons la plantilla, assegurant no transferir bombolles.
 - Després introduir els cartutxos en el seu lloc de treball del sistema *PyroMark*, assegurant que la línia blanca frontal queda davant seu.

METODOLOGIA

- Obrir el bastidor per la placa *Pyromark plate* i col·locar-la en el seu lloc dins els sistema.
- Connectar l'USB amb l'assaig i pressionar OK en la opció "RUN".
- Buscar el número de l'assaig i seleccionar "SELECT" per a iniciar l'anàlisi.
- A l'acabar l'anàlisi confirmar que s'ha guardat i premer "CLOSE".
- Retirar l'USB.
- Obrir la tapa, treure i llençar la placa ja utilitzada, i extreure el cartutxos i netejar-lo segons les indicacions (amb 2-3 rentats dels pouets amb aigua osmotitzada).
- Revisar la sèrie en "software *PyroMark Q24 v2.0.6*".

b) En què consisteix:

La "sefarosa" és un polímer d'agarosa (és a dir, un medi rígid on tenim molècules d'agarosa amb alt *cross-linking* entre elles) on les mateixes molècules de sefarosa tenen immobilitzada la *streptoavidina*.

Per tal d'aconseguir que les molècules de sefarosa que contenen *streptoavidina* s'uneixin a les seqüències ADNds amplificat i marcat amb biotina, és necessari agitar-ho un mínim de 15 minuts a 14000rpm.

Un cop unides, es necessari transferir-ho ràpidament, en menys de 1 minut, a les sondes de filtre, perquè no es tornin a separar. Aquestes sondes estan connectades al buit i immobilitzen els productes de sefarosa que queden units a les puntes de les plaques amb pressió negativa.

Després es renten per a treure l'excés de producte no unit.

La solució de desnaturalització, tal i com el seu nom indica, s'encarrega de separar la doble cadena ADN unida, a través d'altres concentracions de buffers. De manera que només queda unida a la molècula de *streptoavidina-sefarosa* la cadena ADNss biotinilada.

Després es torna a rentar per a tornar a treure el producte no unit.

Tot seguit, al passar a la placa *PyroMark plate* que conté el primer de seqüenciació, es farà que l'ADN biotinilat es deixi anar en aquest medi líquid. Aquest pas es produeix perquè es desconnecta la bomba de buit en el moment en que els filtres arriben a la placa *PyroMark plate*, per deixar d'haver-hi pressió

METODOLOGIA

negativa i d'aquesta manera l'ADN unit a la molècula de "streptoavidina-sefarosa" es pugui deixar anar.

Després, abans de col·locar la placa al sistema de *PyroMark Q24*, és necessari deixar-ho 2 minuts a 80°C per tal de que la molècula de *streptoavidina-sefarosa* es separi de l'ADN biotinitat i després, es deixa 30 minuts a temperatura ambient per tal que el *primer* hibridi a la regió adequada de l'ADNss.

Tot seguit, ja es pot introduir la placa de piroseqüenciació al sistema de *PyroMarkQ24* (el qual ja conté l'enzim, el substrat i els nucleòtids, prèviament preparats segons les dades facilitades per la màquina), que replicarà l'ADN, a partir de la incorporació dels nucleòtids corresponents, i emetrà un patró de senyal luminescent que serveix per estudiar la seqüència.

Mutacions *EGFR*

Consisteix en l'estudi mutacional de les regions "hotspot" del gen *EGFR* descrites en la literatura i ja conegudes en el càncer de pulmó.



Reactius:

Kit theascreen EGFR Pyro PCR kit (QIAGEN).



Protocol:

1. Extracció d'ADN de la parafina.
2. PCR, per aconseguir amplificar la seqüència que es troba entre els dos primers (*forward i reverse*).
3. Piroseqüenciació, per aconseguir seqüenciar la regió on hi ha les mutacions per a valorar la seva presència/absència.

1.CERCA DE LES MUTACIONS "HOTSPOT" DEL GEN *EGFR*

- Mutacions puntuals en l'exó 18 (codons 719-723)
- Mutacions puntuals en l'exó 20 (codons 768-770 i 789-792)
- Mutacions puntuals en l'exó 21 (codons 858-863)
- Delecions i delecions-insercions en l'exó 19 (codons 746-750 i 752-759)

METODOLOGIA

2.CERCA DELS *PRIMERS*

La selecció d'aquestes regions ha sigut utilitzant directament el kit ja dissenyat i comercialitzat per a aquest estudi per piroseqüenciació amb referència 971480.

3.EXTRACCIÓ D'ADN (utilitzant el Kit: *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, ref.:56404)

descriu prèviament

4.PCR

descriu prèviament

5.PIROSEQÜENCIACIÓ

descriu prèviament



Valoració dels resultats:

Valorar la presència o l'absència de mutació en qualsevol de les regions estudiades. La presència de la mutació es determina segons el LOD (límit de detecció), el qual és específic de cada mutació i ve determinat a les especificacions del kit; en aquest cas es considera un cas mutat quan el valor de LOD és LOD+3 unitats (per exemple: si la LOD de p.E746_A750 acceptada com a mutació és de 6%, determinar que si en estudiar una mostra el valor obtingut és d'un 11%, la mostra estudiada té resultat positiu per aquesta mutació). En casos amb valor entre el LOD i LOD+3u, s'aconsella repetir la determinació analitzant simultàniament amb un control negatiu.

Mutacions *PIK3CA*

L'estudi mutacional del gen *PIK3CA* s'ha dut a terme a partir de les regions "hotspot" conegudes i descrites a la literatura situades en l'exó 9 i 20, corresponent a dominis hèlix alfa (E542K i E545K) i domini cinasa (H1047R), respectivament.

METODOLOGIA

Reactius:

Primers (seqüències de 5' a 3')

Exó 9:

Forward: (biotinilat)ATTTCTACACGAGATCCTCTCTCT

Reverse: CCATTTTAGCACTTACCTGTGAC

Seqüenciació 542: TTCTCCTGCTCAGTGAT

Seqüenciació 545: TAGAAAATCTTTCTCCTG

Exó 20:

Forward: (biotinilat)TGAGCAAGAGGCTTTGGAGTAT

Reverse: CCTGCTGAGAGTTATTAACAGTGC

Seqüenciació: TGTTGTCCAGCCACC

Un cop ja es tenen els *primers*, hem d'aconseguir 100µM de cada *primer*, de manera que la solució mare s'ha d'aliquotar en 10µM, solució de treball (obtenint així 0.4µM de cada *primer*, ja que es barreja 1µl de *primer Forward* o *Reverse* amb 25µl PCR).

Kit

- *Pyromark PCR Kit*

Protocol:

1. Buscar les mutacions "hotspot" descrites en la literatura (*COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations In Cancer*).
2. Dissenyar dels *primers* (*Forward, Reverse* i Seqüenciació amb *PyroMark Assay Design 2.0*).
3. Extracció de l'ADN de la parafina.
4. PCR, per aconseguir amplificar la seqüència que es troba entre els dos *primers* (*Forward* i *Reverse*)
5. Piroseqüenciació, per aconseguir seqüenciar la regió on hi ha les mutacions "hotspot" per a valorar la seva presència/absència.

1.CERCA DE LES MUTACIONS "HOTSPOT" DEL GEN *PIK3CA*

METODOLOGIA

A partir de la base de dades del *COSMIC* (**Cosmic, 2015**), s'ha buscat quines són les regions "hotspot" descrites en la literatura com a més freqüents en el gen *PIK3CA*, localitzades a l'exó 9 (del cromosoma 3q26.3) les regions hèlix alfa "E542K i E545K" i a l'exó 20 (últim del gen) la regió cinasa "H1047R" (**Cizkova, 2012; Nosh, 2008**).

Després, des de la base de dades *GeneBank* (base de gens del pubmed) **GenBank₂, 2015**) s'ha buscat el gen *PIK3CA* (*accession number NG_012113.1*), en la informació relacionada busquem "CCDS" (regió relacionada amb la codificació de proteïnes o seqüència codi consens) i el "FASTA" (codi de text que ens dona la seqüència total del gen). Una vegada es tenen les dues informacions es localitza la seqüència de nucleòtids que forma l'exó a estudiar per tal de poder buscar-hi la regió d'interès "hotspot".

Les regions "hotspot" són GAAATCACTGAGC en l'exó 9 (que inclou les dos regions E542 i E545) i CATCAT en l'exó 20 (que correspon a la regió H1047).

2. DISSENY DE PRIMERS

Un cop localitzada cada una de les regions a estudi dels dos exons, es selecciona una seqüència adjacent que al centre inclogui la regió a estudi i s'introdueix al *PyroMark Assay Design*, concretament en la secció de *Sequence Editor* on es programa el tipus d'assaig que volem fer, una quantificació al·lèlica (*Allele Quantification*). Després de buscar la regió a estudi, es marca com a "Set Target Region", i fem que el software dissenyi un assaig (*Assay Design Run*), de manera que el programa ens informa d'una sèrie de primers amb diferents scores (puntuacions) per a estudiar la regió seleccionada (a major score -màxim 100- és indicatiu de major precisió dels primers). Obtenim els primers Forward+Reverse i de Seqüenciació" amb un score de 92 i 98, respectivament per a l'exó 9 i 20.

Un cop realitzades les primers proves s'han obtingut resultats erronis en l'exó 9 i adequats en l'exó 20, de manera que al retornar a la literatura s'ha observat que existeix la presència d'un pseudogèn (situat a l'exó 22) que interfereix (amplificació simultània) amb l'exó 9, al tenir més del 95% de la seqüència homòloga, el qual ha obligat a dissenyar nous primers per a l'estudi d'aquest exó, amb dos primers de seqüenciació per tal de poder discriminar entre

METODOLOGIA

l'estudi dels dos codons (aminoàcids) de l'exó 9 sense que interfereixi amb el pseudogèn (**Baker, 2012**).

3.EXTRACCIÓ D'ADN (utilitzant el Kit: *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, ref.:56404)

descriu prèviament

4.PCR

descriu prèviament

5.PIROSEQÜENCIACIÓ

descriu prèviament



Valoració dels resultats:

Valorar la presència o l'absència de mutació en qualsevol de les regions estudiades. Al no tenir una validació d'un laboratori extern (com és en el cas dels estudis d'*EGFR*), no és possible determinar un LOD; de manera que per aquests estudis hem un aconseguit controls externs d'ADN mutat (*gentilesa del Dr. J. Hernández de l'Hospital de Vall Hebron*) amb mutacions dels exons 9 i 20 per confirmar la validesa dels nostres assaigs.

A part, en cada tanda de mostres analitzades s'analitza un control negatiu (ADN no mutat, comercial) i es consideren casos mutats aquells amb diferències respecte el control negatiu superiors a 10 unitats (per exemple: si el resultat d'una mostra és d'un 19% i el control negatiu és d'un 2%, es considera un cas mutat). Si es troben casos dubtosos, s'analitzen per duplicat.

Hipermetilació del promotor del gen *BRCA1*

L'estudi d'hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* s'ha dut a terme utilitzant *primers* específics de la regió promotora on hi ha les illes CpG (els quals s'han autodissenyats).

METODOLOGIA

Reactius:

Primers (seqüències de 5' a 3'):

Forward: GGTATTGGAGTGGGAGAGTGGATTTT

Reverse: (biotinilat)ACACTCAATACCCCCTTCCTAATC

Seqüenciació: GGGGGGTAGTTTGTGA

El *primer* es troba liofilitzat, de manera que en el moment de resuspendre'l s'aconsegueix una solució mare que està a concentració 100µM en cada *primer*. Aquesta solució mare s'ha d'aliquotar en 10µM (solució de treball) i la concentració amb la que treballarem serà de 0.4µM de cada *primer*, ja que es barreja 1µl de *primer Forward* o *Reverse* amb un contingut total de 25µl PCR.

Kits:

- *Epitect Plus DNA Bisulfite Kit*
- *Pyromark PCR Kit*

Protocol:

1. Buscar la regió del promotor del gen *BRCA1* on es produeix la hipermetilació.
2. Dissenyar els *primers* (*forward*, *reverse* i seqüenciació).
3. Extracció de l'ADN de la parafina.
4. Conversió de bisulfit, per poder treballar amb l'ADN convertit.
5. Netejar l'ADN convertit.
6. PCR, per aconseguir multiplicar la seqüència que es troba entre els dos *primers* (*forward* i *reverse*).
7. Piroseqüenciació, per aconseguir seqüenciar la regió promotora del gen on hi ha les illes CpG i valorar el seu estat de metilació.

1.CERCA DE LA REGIÓ PROMOTORA DEL GEN *BRCA1*

A partir de la base de dades del *GenBank* (base de gens del *Pubmed*) (**GenBank₁, 2014**) s'ha buscat el gen *BRCA1* (*accession number* L78833.1), centrant-nos en la seqüència propera a l'inici de la transcripció, on hi ha el promotor. Dintre d'aquesta seqüència i des del mateix *GenBank* analitzem les

METODOLOGIA

illes CpG, i segons la nostra cerca i la descrita per altres grups que han treballat amb la metilació de *BRCA1* (**Ibragimova, 2011**) ens centrem en las bases situades entre aquestes dues regions "43125900-43124500 (*Sequence View*)".

2.DISSENY DE PRIMERS

Aquesta regió seleccionada del gen, on hi ha les illes CpG, s'ha copiat dins el programa de disseny de primers per a estudiar a través de la tècnica de piroseqüenciació "*PyroMark Assay Design*", s'ha creat la seqüència convertida, s'han seleccionat GGTYGYGAGG GAAGYGTTGA GGATTAGGAA GGGGGTATTG AGTGT i s'han buscat el set de primers (un per a PCR *Forward*, un per a PCR *Reverse* i un per Seqüenciar) per a poder dur a terme l'anàlisi.

3.EXTRACCIÓ D'ADN (utilitzant el Kit: *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, ref.:56404)
descriu prèviament

4.CONVERSIÓ DE BISULFIT

Primer de tot, abans de començar la conversió s'ha de quantificar l'ADN de la mostra per saber que disposem de la quantitat suficient per a poder dur a terme l'estudi (aconseguint valors entre 120-200ng/μl).

Una vegada comprovat, s'utilitza el Kit "*EpiTect® Plus DNA Bisulfite Kit*" per a dur a terme el procés de conversió de bisulfit. Aquest kit conté:

- **Store MinElute® DNA Spin Columns*
- **Buffer BW (Wash Buffer, que es prepara afegint etanol)*
- **Buffer BL (Loading Buffer, que es prepara amb el carrier DNA i s'ha de mantenir a nevera)*
- **Buffer EB (Elution Buffer)*
- **Buffer BD (Desulfonation Buffer, que es prepara amb etanol)*
- **DNA Protect Buffer*

Abans de començar la reacció, s'ha de preparar el reactiu del *Bisulfite Mix*, que consisteix en dissoldre les alíquotes de *Bisulfite Mix* en 800μl de *RNAse free-*

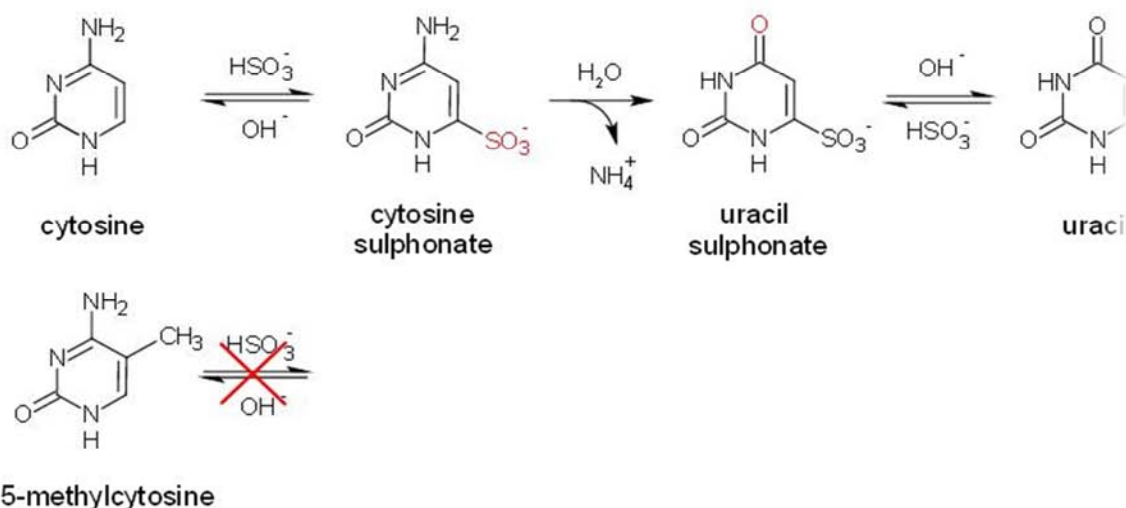
METODOLOGIA

water, vòrtex fins a dissoldre-ho totalment (això pot trigar fins a 5 minuts i a vegades, pot ser necessari escalfar la solució a 60°C), aliquotar en 200µl i congelar fins al moment de l'ús.

Per a començar la reacció és necessari introduir els següents components amb l'ordre respectiu, per tal de que es pugui dur a terme la reacció: 40µl ADN a estudi + 85µl *Bisulfite Mix* + 15µl *DNA Protect Buffer* (al afegir el *DNA Protect Buffer*, s'ha de barrejar bé i veure com la reacció vira de color verd del buffer a blau: pH bàsic). Aquesta reacció està molt saturada i necessita d'unes condicions altes de concentració de sals i pH adequat per realitzar-se.

En la reacció de conversió de bisulfit el que aconseguirem és una modificació química de la seqüència (Figura 26).

Figura 26: Reacció química de conversió de bisulfit



És a dir, en aquesta reacció aconseguirem convertir totes les citosines en uracils, restant com a citosines en el cas que estiguin metilades (la citosina metilada impedeix la conversió).

Després de preparar la reacció, s'han de posar els tubs amb els reactius al termociclador, seleccionant el programa "*BisulfiteFFPE*". La reacció dura unes 5h i en acabar manté la mostra a 20°C de temperatura, de manera, que quan a acabat es pot mantenir algunes hores a la nevera fins a continuar amb l'estudi. Aquesta reacció és molt agressiva i, a més de convertir les C en U, degrada l'ADN, per això és bàsic optimitzar la quantitat d'ADN inicial abans de realitzar tot el procés.

METODOLOGIA

En funció de la concentració de l'ADN obtingut de cada mostra, s'ha seleccionat una quantitat determinada de volum de mostra per a dur a terme la conversió de bisulfit, amb un màxim de 40µl. En aquells casos en els quals s'ha posat menys de 40µl s'ha d'ajustar amb *RNAse free-water* fins arribar als 40µl (Taula 3).

Taula 3: Volum de mostra utilitzada pels estudis d'hipermetilació, segons la concentració de mostra de cada ADN a estudi

| Concentració ADN mostra | Volum mostra a estudi |
|-------------------------|-----------------------|
| < 60 | 40 µl |
| 60-75 | 30 µl |
| 75-100 | 25 µl |
| 100-150 | 20 µl |
| 150-175 | 15 µl |
| 175-225 | 10 µl |
| > 225 | 8 µl |

5.NETEJA DE L'ADN CONVERTIT

- A temperar els reactius (*Buffer BL*, *Buffer BW*, *Buffer BD* i *Buffer EB*).
- "Spin" de centrifuga i passar el producte en un eppendorf estèril de 1.5mL.
- Afegir 350µl de *Buffer BL* (amb el *carrier DNA* afegit de 3.5µl i aliquotat).
- Vòrtex i "spin" de centrifuga.
- Afegir 250µl d'etanol absolut, vòrtex 15 segons i "spin" de centrifuga.
- Transferir producte (aproximadament 800µl) a columna *MinElute*.
- Centrifugar 1 minut al màxim (14000rpm) i descartar el tub col·lector.
- Afegir 500µl *Buffer BW*.
- Centrifugar 1 minut al màxim (14000rpm) i descartar el tub col·lector.
- Afegir 500µl *Buffer BD* (vigilar que tinigui una mínima exposició a l'aire, perquè s'acidifica) i incubar a temperatura ambient durant 15 minuts.
- Centrifugar 1 minut al màxim (14000rpm) i descartar el tub col·lector.
- Afegir 500µl *Buffer BW*, centrifugar 1 minut al màxim i descartar el tub col·lector.
- Repetir novament el pas anterior, d'afegir 500µl *Buffer BW*, centrifugar 1 minut al màxim i descartar el tub col·lector.

METODOLOGIA

- Afegir 250µl d'etanol absolut, centrífuga 1 minut al màxim i descartar el tub col·lector.
- Posar tubs d'ependorf estèrils 2mL (*QIAcube*), centrifugar 1 minut al màxim i incubar les columnes en el termoblocs durant 5 minuts a 60°C (recordar mantenir taps oberts).
- Posar les columnes en tubs d'ependorf estèrils 1.5mL i afegir 10-15µl de Buffer *EB*.
- Incubar durant 3-5 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar 1 minut a 12000rpm.

6.PCR

descriu prèviament

7.PIROSEQÜENCIACIÓ

descriu prèviament



Valoració dels resultats:

S'han considerat com a casos metilats, aquells resultats de piroseqüenciació amb presència d'un llindar promig de metilació major a 10-15, sempre que s'hagi obtingut una conversió total de bisulfit i una desviació estàndard acceptable. Ja que a la literatura no està descrit un llindar concret a partir del qual es considera un cas metilat.

RESULTATS

RESULTATS

RESULTATS

RESULTATS

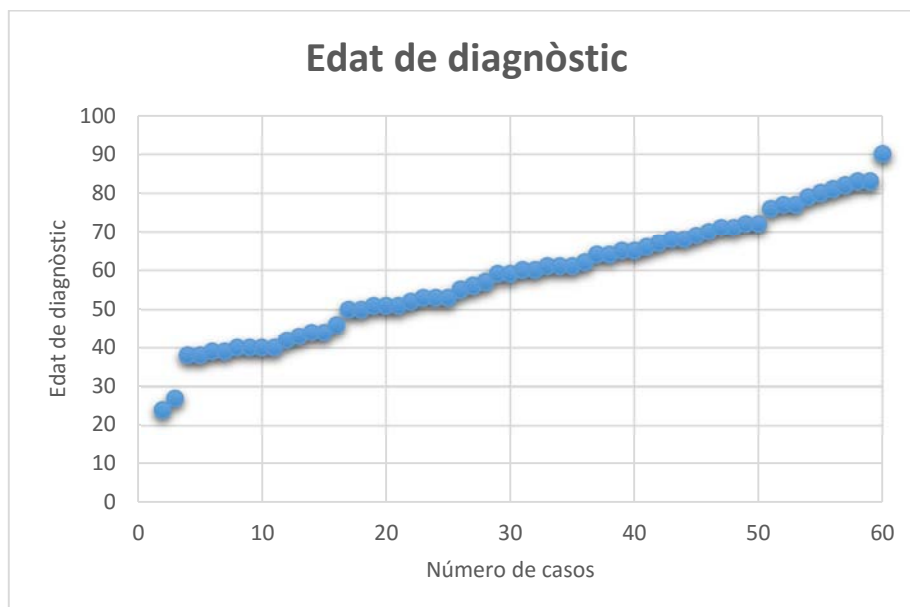
S'ha estudiat un total de 60 mostres de càncer de mama tipus "triple negatiu", diagnosticades al servei d'Anatomia Patològica de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Hospital Universitari, de Sabadell, entre el 2006 i 2011.

RESULTATS DADES CLÍNiques I QUIRÚRGiques

Les mostres corresponen a blocs de parafina de peces de resecció tumoral (tumorectomies o mastectomies) en la majoria dels casos 81,67% (49 casos, 37 tumorectomies i 12 mastectomies), mentre que una petita part 18,33%, corresponen a material de biòpsia amb agulla gruixuda (11 casos). Mencionar que el material utilitzat per a dur a terme tots els estudis realitzats han sigut carcinomes no han rebut cap tipus de tractament neoadjuvant o previ.

L'edat mitja de diagnòstic de les pacients és de 59,2 anys, amb un interval que oscil·la entre 27 i 93 anys de vida (Gràfic 2). D'aquestes un 28,33% de les pacients (17/60) s'han diagnosticat en una edat menor o igual a 50 anys; en aquestes l'edat mitja és de 40,24 anys. D'aquestes pacients un 10% s'han diagnosticat abans dels 40 anys i un 18,33% s'han diagnosticat entre 40 i 50 anys, ambdós inclòs.

Gràfic 2: Edats de diagnòstic de totes les pacients de la cohort



RESULTATS

La neoplàsia és de mama dreta en un 46,67% (28/60) i de mama esquerra en un 53,33% (32/60). Mentre que la cirurgia local realitzada ha estat en un 75% de tumorectomies (45/60), en un 23,33% de mastectomies (14/60) i en 1 cas es desconeix. En relació al maneig axil·lar en un 13,33% (8/60) no s'ha estudiat histològicament l'estat axil·lar, en un 43,33% (29/60) s'ha estudiat el gangli sentinella i en un 38,33% (23/60) s'ha fet limfadenectomia, només mencionar que una d'aquestes limfadenectomies s'ha dut a terme després d'un gangli sentinella positiu (sent aquest gangli l'únic metastàtic de tot el buidament) (Taula 4).

Taula 4: Relació entre cirurgia local de la mama i maneig axil·lar

| | Gangli sentinella | Limfadenectomia | No estudi histològic axil·lar |
|---------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|
| BAG | 0 | 0 | 1 |
| Tumorectomia | 28 | 12 | 5 |
| Mastectomia | 1 | 11 | 2 |

Del 86,67% (52/60) de casos amb estudi histològic ganglionar axil·lar, un 75% (39/52) són negatius, un 17,3% (9/52) tenen entre 1 i 3 ganglis metastàtics (pN1) i un 7,7% (4/52) tenen metàstasis a 4 o més ganglis (pN2). S'han estudiat un total de 530 ganglis axil·lars, oscil·lant entre 1 i 35 ganglis axil·lars estudiats per pacient (Taula 5).

Taula 5: Resultat de l'estudi ganglionar axil·lar

| Ganglis axil·lars | Nº casos | Interval gg aïllats | Nº gg metastàtics |
|---------------------|----------|---------------------|---|
| No estudiats | 8 | | |
| Negatius | 39 | Entre 1-34 | |
| Positius 1-3 | 9 | Entre 2-28 | 1gg – 6 casos 2gg – 2 casos 3gg – 1 cas |
| Positius ≥ 4 | 4 | Entre 12-35 | 5, 7, 8 i 17 gg |

Nº: número; gg: ganglis

RESULTATS

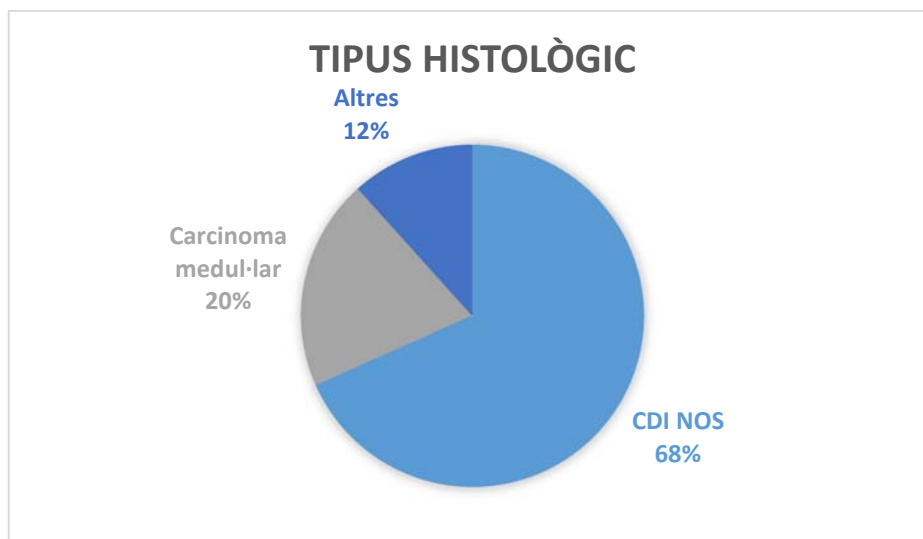
RESULTATS DADES HISTOLÒGIQUES

Els resultats anatomopatològics valorats han estat el tipus histològic, el grau histològic, la mida tumoral, la necrosi, la presència d'imatges d'invasió angiolimfàtica i perineural, i l'estadiatge oncològic patològic TNM.

Cal mencionar que dos dels casos de la sèrie (3,33%) són bifocals i un (1,67%) és multifocal, dels quals únicament s'ha utilitzat el tumor de major mida per a valorar tots els paràmetres estudiats.

La majoria dels casos són carcinomes ductals infiltrants de tipus no específic (CDI NOS) en un 68,33% (41/60) (Imatge 1), seguit de carcinomes medul·lars (inclouen els CDI amb trets medul·lars, els carcinomes medul·lars i els carcinomes medul·lars atípics) en un 20% (12/60) (Imatge 2) i els altres subtipus en un 11,67% (7/60) (Imatge 3 i 4), que inclouen 2 carcinomes metaplàstics, 1 carcinoma anaplàstic, 1 carcinoma adenoide quístic de tipus basal, 1 carcinoma micropapil·lar, 1 carcinoma lobel·lar infiltrant i 1 carcinoma intraductal (Gràfic 3). Un 28,81% (17/59) de tots els tumors tenen component in situ associat.

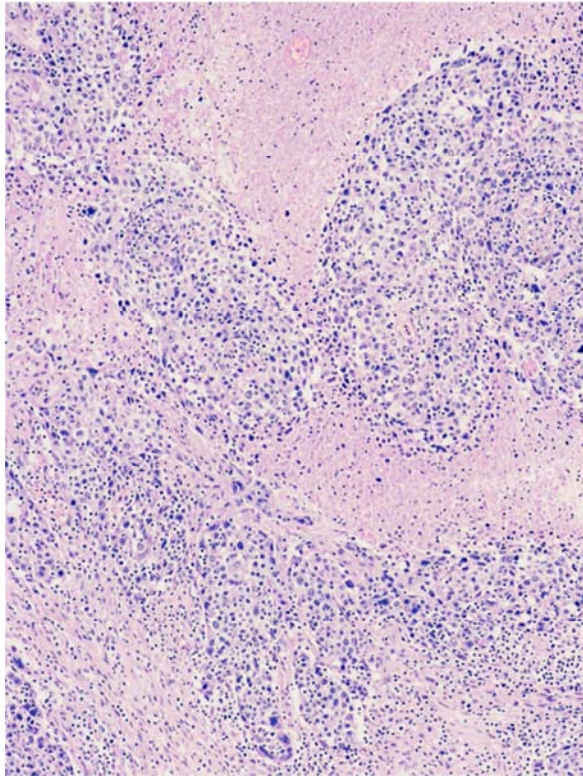
Gràfic 3: Divisió dels subtipus histològics presents en la sèrie



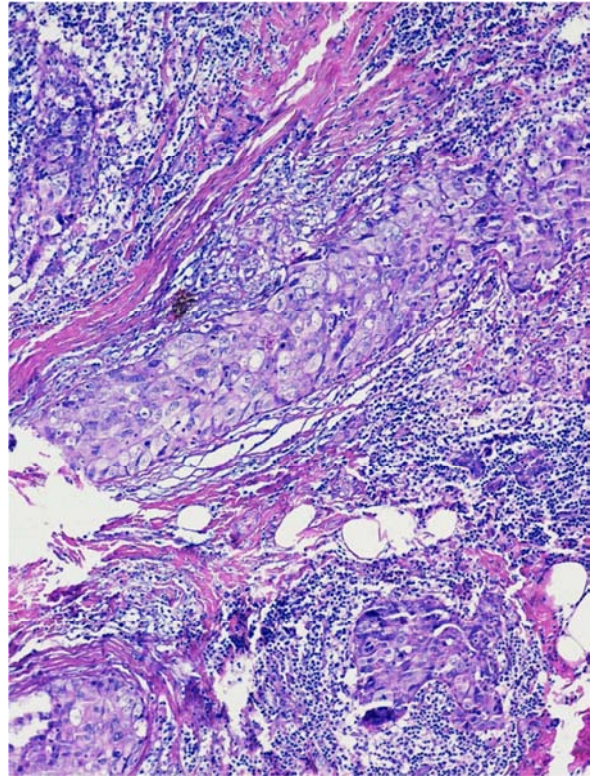
La majoria són tumors pobrament diferents (III-d'alt grau histològic) en un 85% (51/60), només un 10% (6/60) són moderadament diferenciats (II-de grau mig) i un 3,33% (2/60) són ben diferenciats (I-de baix grau) (Taula 6 i Imatge 5). El cas restant es tracta d'un carcinoma intraductal amb atípia nuclear moderada (1,67%).

RESULTATS

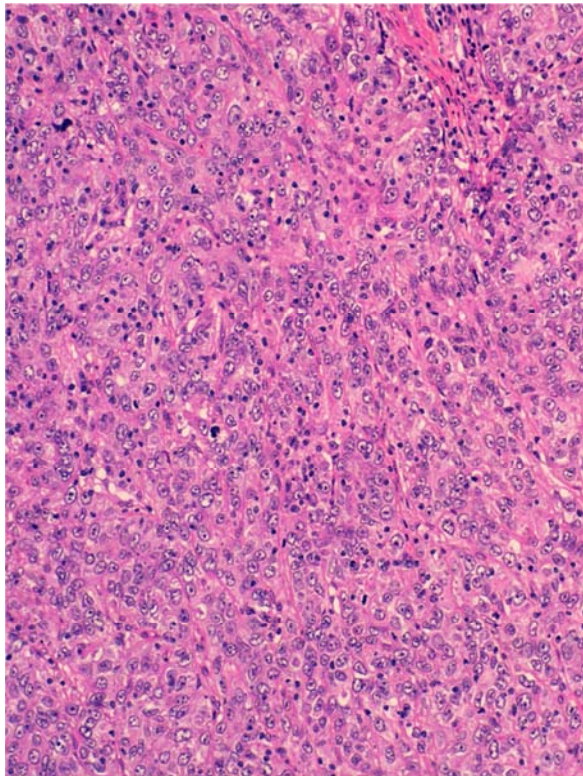
Imatge 1: Imatges histològiques dels tipus més freqüents de carcinomes presents en la cohort



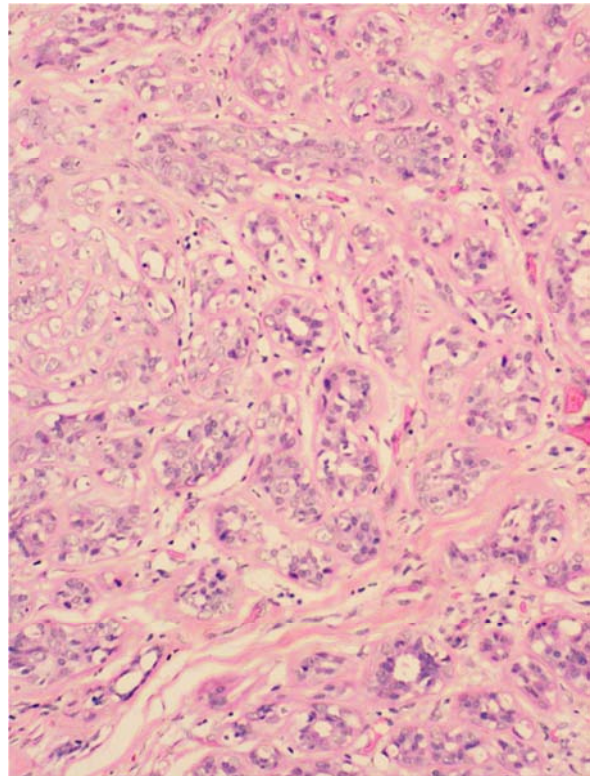
CDI NOS, a 10x, hematoxilina-eosina



CDI NOS, 20x, hematoxilina-eosina



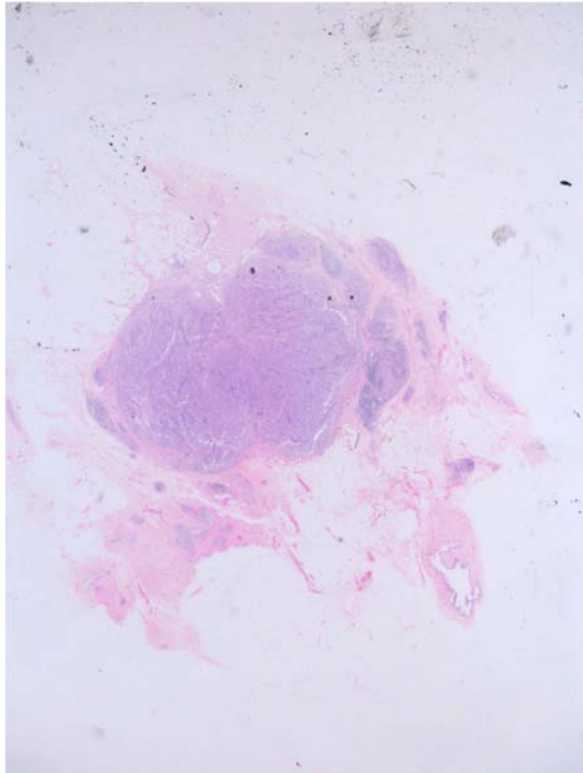
CDI NOS, a 20x, hematoxilina-eosina



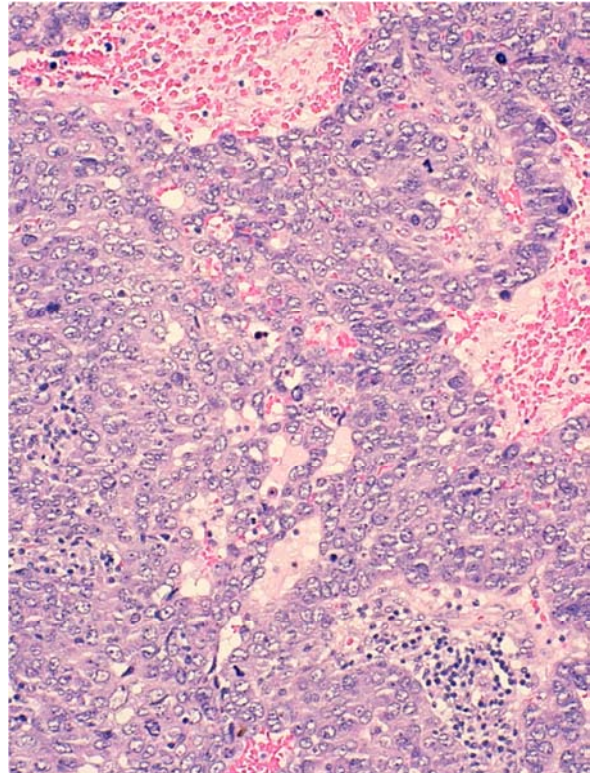
CDI NOS, a 20x, hematoxilina-eosina

RESULTATS

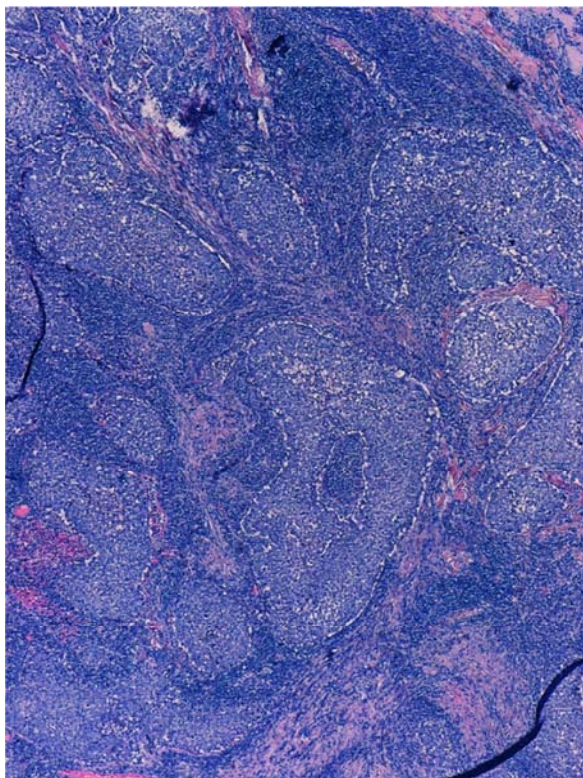
Imatge 2: Imatges histològiques de carcinomes medul·lars de la cohort



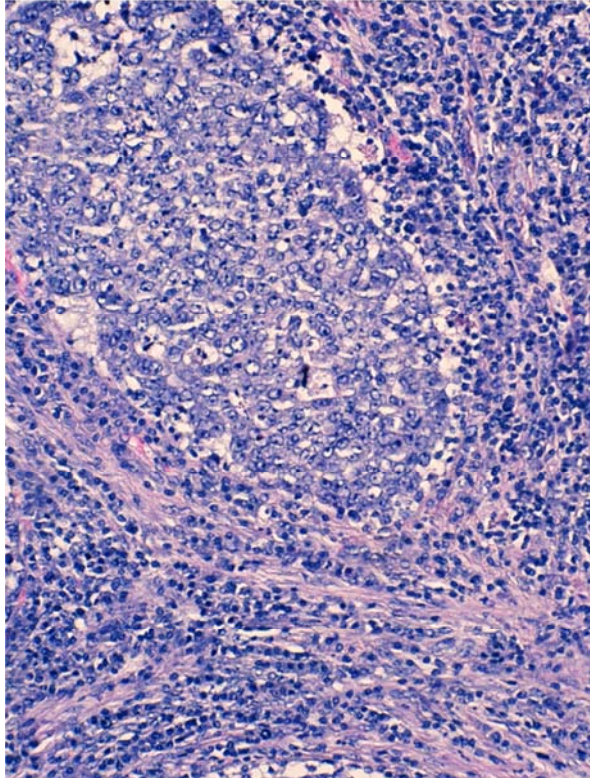
Carcinoma medul·lar,
macromicro, hematoxilina-eosina



Carcinoma medul·lar,
a 40x, hematoxilina-eosina



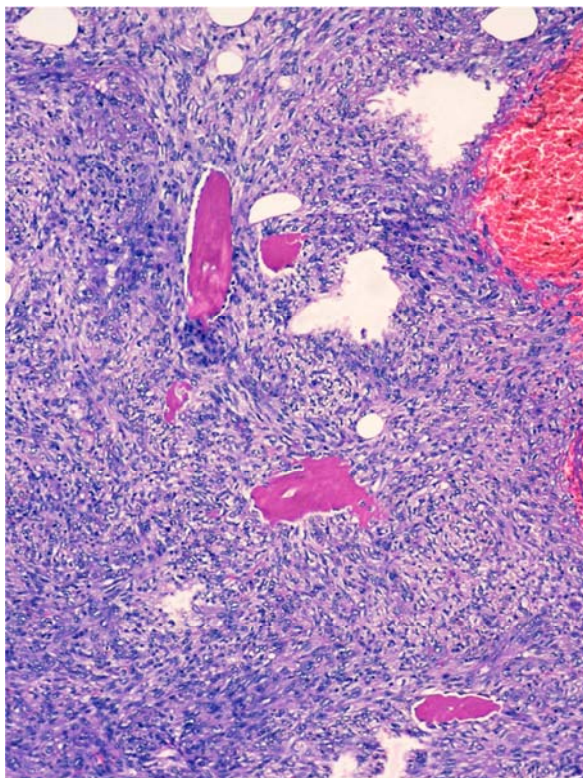
Carcinoma amb trets medul·lars, a 4x,
hematoxilina-eosina



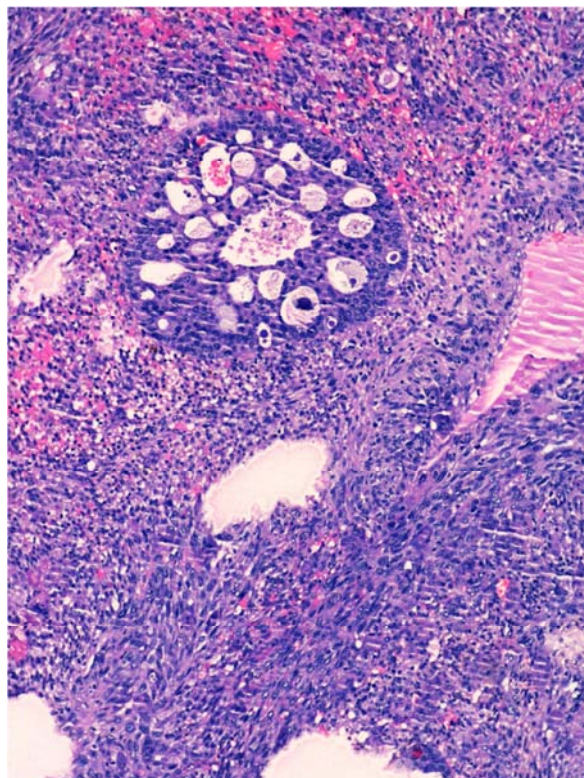
Carcinoma medul·lar,
a 20x, hematoxilina-eosina

RESULTATS

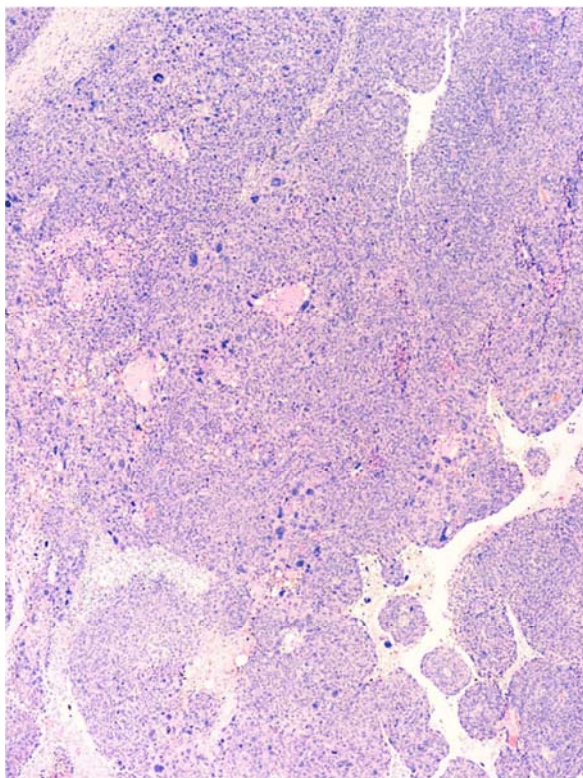
Imatge 3: Imatges histològiques dels subtipus de carcinomes especials observats en la cohort



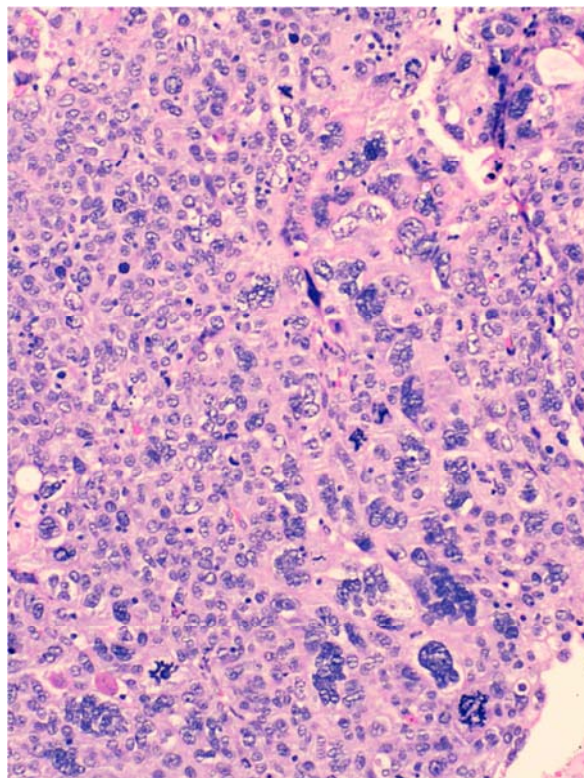
Carcinoma metaplàstic sarcomatoide amb ossificació, a 10x, hematoxilina-eosina



Carcinoma metaplàstic sarcomatoide, a 10x, hematoxilina-eosina



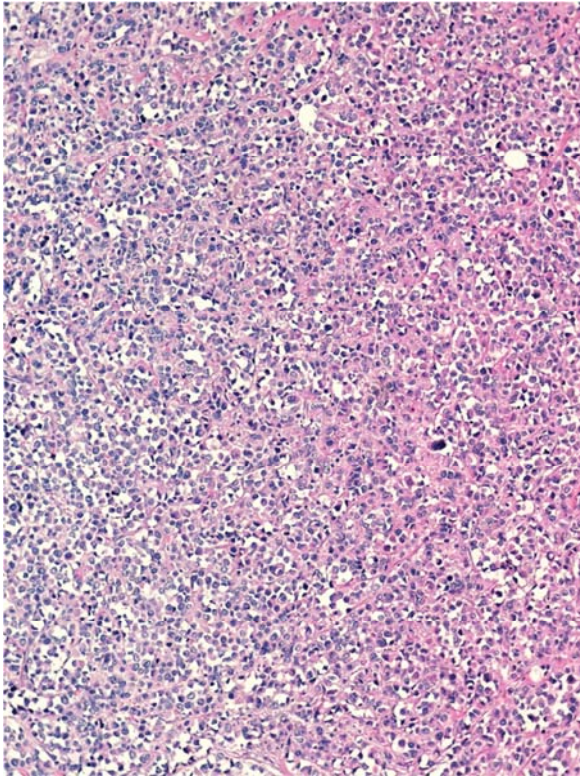
Carcinoma anaplàstic, a 10x, hematoxilina-eosina



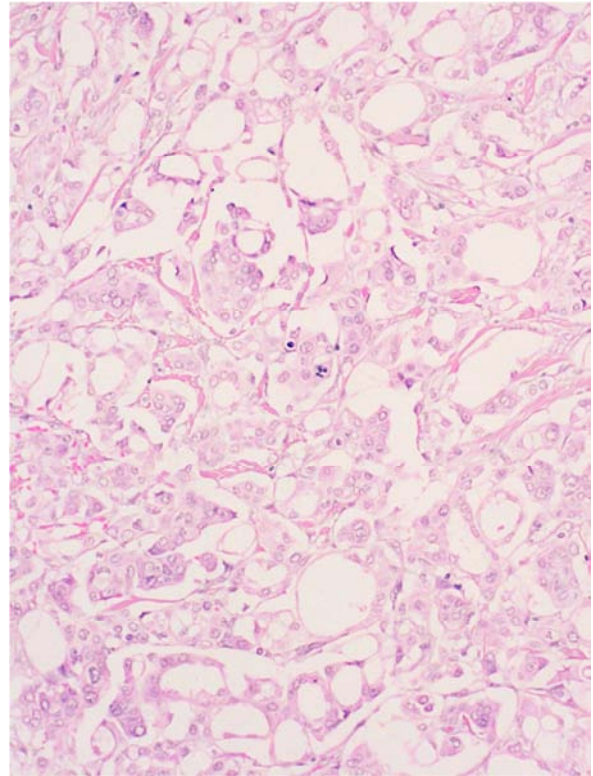
Carcinoma anaplàstic a 20x, hematoxilina-eosina

RESULTATS

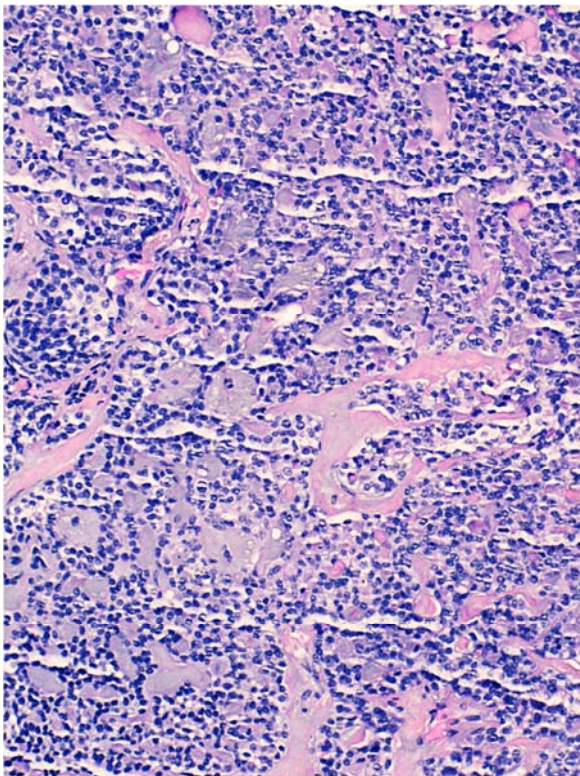
Imatge 4: Imatges histològiques dels subtipus de carcinomes especials observats en la cohort



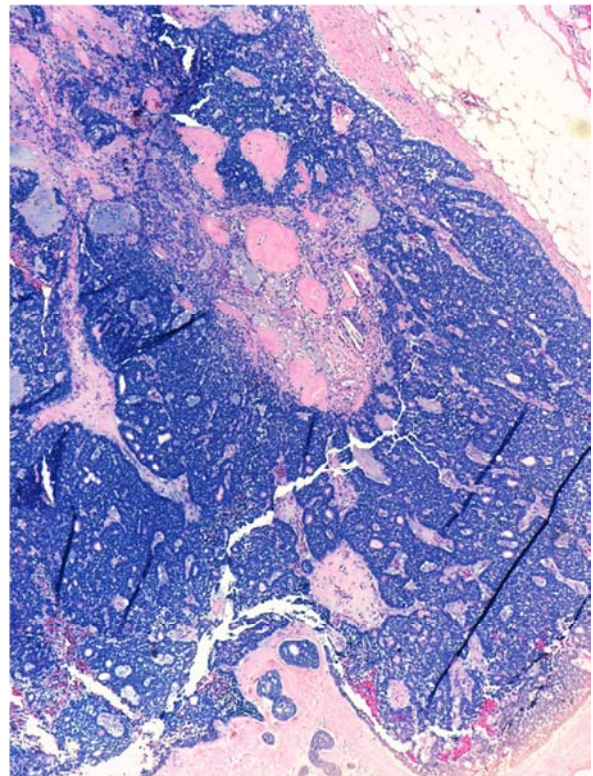
Carcinoma lobel·lar infiltrant
a 10x, hematoxilina-eosina



Carcinoma micropapil·lar
a 20x, hematoxilina-eosina



Carcinoma adenoide quístic basaloide
a 20x, hematoxilina-eosina



Carcinoma in situ papil·lar
a 10x, hematoxilina-eosina

RESULTATS

Taula 6: Relació entre grau i tipus histològic

| Grau/Tipus histològic | CDI NOS | Carcinoma medul·lar | Altres (no in situ) |
|-----------------------|---------|---------------------|---------------------|
| I | 1 | 0 | 0 |
| II | 4 | 0 | 3 |
| III | 36 | 12 | 3 |

Els tumors podien o no acompanyar-se de necrosi, valorada només en el component infiltrant, i aquesta podia estar present en diferents proporcions. Trobant aproximadament en la meitat dels casos presència i en l'altra absència de necrosi, observant-se extensa necrosi en un 18,33% (11/60), moderada necrosi en un 18,33% (11/60), mínima necrosi en un 10% (6/60) i absència en un 53,33% (32/60) (Taula 7 i Imatge 6).

Taula 7: Relació entre tipus histològic i presència de necrosi

| Tipus histològic /Necrosi | CDI NOS | Carcinoma medul·lar | Altres |
|---------------------------|---------|---------------------|--------|
| No | 26 | 1 | 5 |
| Mínima | 4 | 2 | 0 |
| Moderada | 3 | 6 | 2 |
| Extensa | 8 | 3 | 0 |

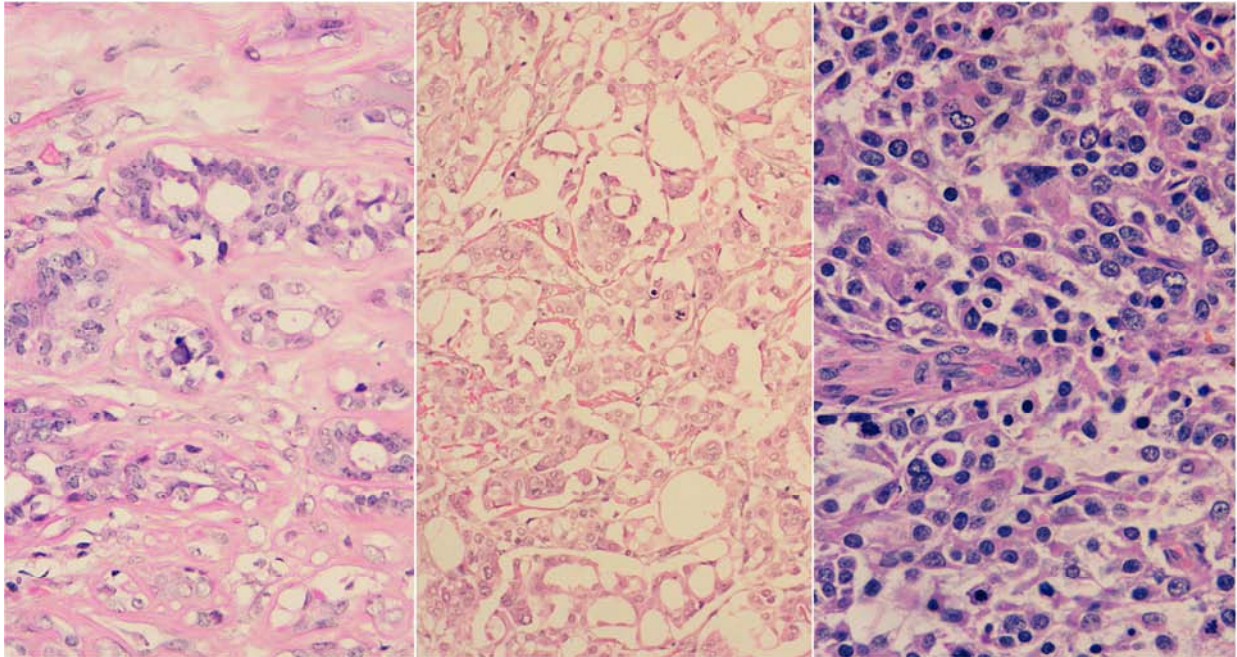
La troballa d'imatges d'invasió vascular i/o perineural ha sigut molt infreqüent i només en 1 cas s'han observat els dos tipus d'invasió. Només s'han observat imatges d'invasió angiolímfàtica en un 13,56% (8/59) (Taula 8) i perineurals en un 5,1% (3/59) (Taula 9), tenint en compte que en un cas no es té present perquè la valoració histològica s'ha realitzat en una mostra de biòpsia on es troba limitada.

Taula 8: Relació entre presència o no d'imatges d'invasió angiolímfàtica i els diferents tipus histològic i graus histològics

| Invasió Angiolimfàtica | Tipus histològic | | | Grau histològic | | |
|------------------------|------------------|---------------------|--------|-----------------|----|-----|
| | CDI NOS | Carcinoma medul·lar | Altres | I | II | III |
| SI | 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 7 |
| NO | 32 | 12 | 7 | 0 | 7 | 43 |

RESULTATS

Imatge 5: Imatges histològiques dels diferents graus histològics observats en la sèrie

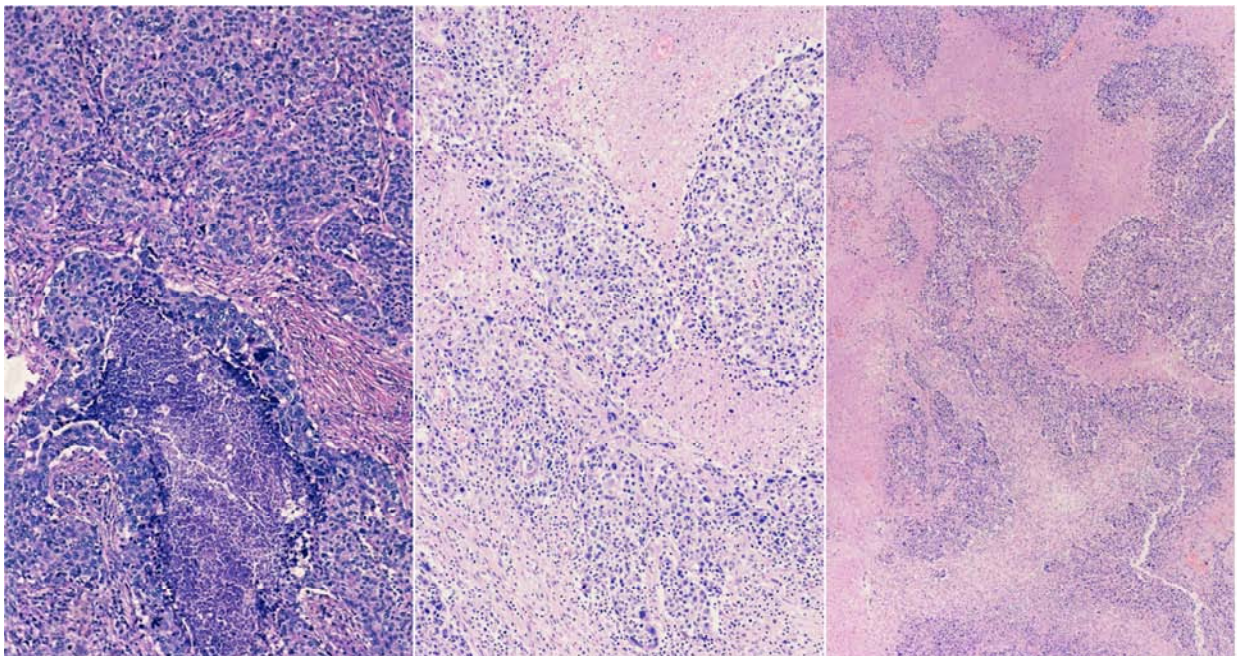


Grau histològic I
(ben diferenciat),
a 40x, hematoxilina-eosina

Grau histològic II
(moderadament diferenciat),
a 20x, hematoxilina-eosina

Grau histològic III
(pobrament diferenciat),
a 40x, hematoxilina-eosina

Imatge 6: Imatges histològiques dels diferents graus de necrosi observats en la sèrie



Mínima necrosi, a 10x,
hematoxilina-eosina

Moderada necrosi, 10x,
hematoxilina-eosina

Extensa necrosi, a 4x,
hematoxilina-eosina

RESULTATS

Taula 9: Relació entre presència o no d'imatges d'invasió perineural i els diferents tipus histològic i graus histològics

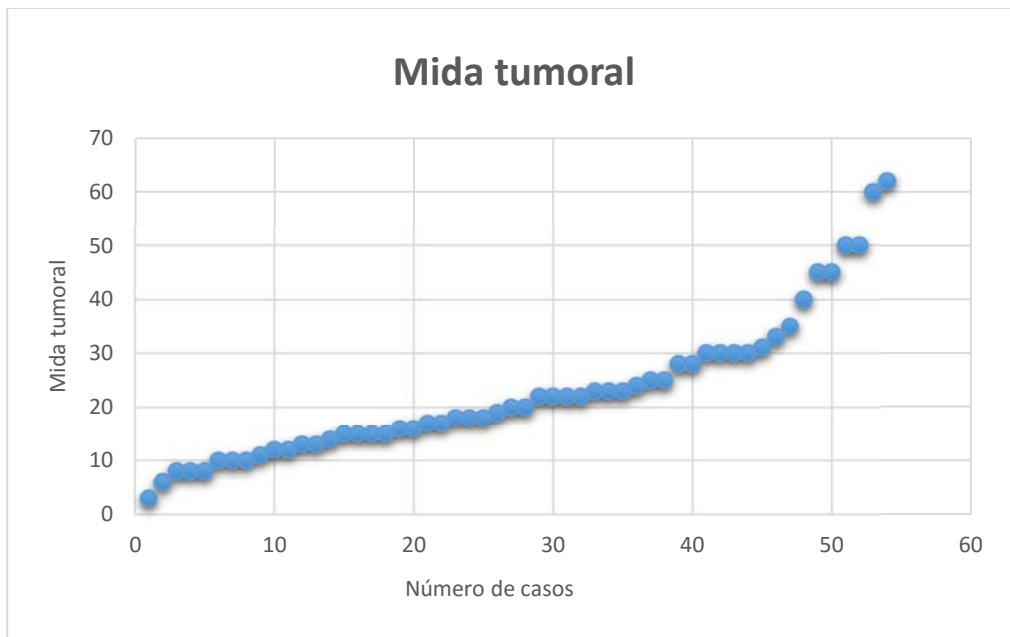
| Invasió Perineural | Tipus histològic | | | Grau histològic | | |
|--------------------|------------------|---------------------|--------|-----------------|----|-----|
| | CDI NOS | Carcinoma medul·lar | Altres | I | II | III |
| SI | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| NO | 38 | 11 | 7 | 1 | 7 | 47 |

La valoració de presència o no d'imatges d'invasió angiolímfàtica i perineural en relació al tipus histològic, s'ha realitzat sobre 59 casos, degut a que en un es desconeix al només disposar de material de biòpsia.

La valoració de presència o no d'imatges d'invasió angiolímfàtica i perineural en relació al grau histològic, s'ha realitzat sobre 58 casos, degut a que en un es desconeix al només disposar de material de biòpsia i l'altre es tracta d'un carcinoma in situ (en el qual no es valora el grau histològic, sinó nuclear).

La mida mitja tumoral, sense contar els 5 casos postquimioteràpia (un 8,33%) i 1 cas no operat (3,33%), és de 22,68 mm, amb un interval d'entre 3 i 62 mm, valorat entre 54 pacients de la cohort (Gràfic 4). D'aquestes pacients, un 51,85% (28/54) són tumors menors o iguals a 20 mm i un 48,15% (26/54) són tumors majors a 20 mm.

Gràfic 4: Mida tumoral de tots els casos de la cohort, a excepció dels 5 casos postquimioteràpia i d'un cas no operat que només disposem de la BAG



El resum global dels paràmetres clinicopatològics trobats en tota la cohort de les pacients estudiades amb càncer de mama triple negatiu es troba resumit a la Taula 10. Així com, el desglossament de les característiques histopatològiques

RESULTATS

observades en cada un de les pacients estudiades de la cohort es mostra en la Taula 11.

Taula 10: Característiques clinicopatològiques dels càncers de mama triple negatius de la sèrie (N=60)

| Paràmetres clinicopatològics | Nºcasos | % casos |
|-------------------------------------|----------------------|----------------|
| Edat | ≤50 anys | 17 28,33% |
| | >50 anys | 43 71,67% |
| Mama | Dreta | 28 46,67% |
| | Esquerra | 32 53,3% |
| Cirurgia local | Tumorectomia | 45 75% |
| | Mastectomia | 14 23,33% |
| | Es desconeix (BAG) | 1 1,67% |
| Maneig axil·lar | Gangli sentinella | 29 48,33% |
| | Buidament | 23 38,33% |
| | No estudiat | 8 13,33% |
| Mida tumoral | ≤20 mm | 28 46,67% |
| | Entre 20 i 50mm | 24 40% |
| | >50 mm | 3 5% |
| | Post-QT | 5 8,33% |
| Tipus histològic | NOS | 41 68,33% |
| | Medul·lar | 12 20% |
| | Altres | 7 11,67% |
| Grau histològic | I | 2 3,33% |
| | II | 6 10% |
| | III | 51 85% |
| Necrosi | Present | 28 46,67% |
| | Absent | 32 53,33% |
| Invasió angiolimfàtica | Present | 8 13,33% |
| | Absent | 52 86,67% |
| Invasió perineural | Present | 3 5% |
| | Absent | 57 95% |
| Metàstasis ganglionar | No estudiats | 8 13,33% |
| | Negatius | 39 65% |
| | Positius 1-3 ganglis | 9 15% |
| | Positius ≥ 4 ganglis | 4 6,67% |

RESULTATS

Taula 11: Resultats histològics desglossats per tots els casos de la sèrie (N=60)

| Edat diagnòstic | Mama | Tipus tumoral | Grau histològic | Mida tumoral | Necrosi | Angiolimfàtica | Perineural |
|-----------------|------|----------------------------|-----------------|--------------|---------|----------------|------------|
| 59 | ME | Car adenoide quístic | II | 20 | NO | NEG | NEG |
| 24 | ME | CDI | II | 33 | EXT | NEG | NEG |
| 43 | MD | CDI | III | 40 | MIN | NEG | NEG |
| 67 | MD | CDI | III | 15 | NO | NEG | NEG |
| 61 | MD | CDI amb trets medul-lars | III | 30 | NO | NEG | NEG |
| 40 | MD | Car medul-lar atípic | III | 17 | MIN | NEG | NEG |
| 65 | MD | CD IN SITU papil-lar | nuclear 2 | 10 | NO | NEG | NEG |
| 80 | ME | CDI + CID | III | 6 | NO | NEG | NEG |
| 39 | MD | CDI | III | 15 | NO | NEG | NEG |
| 39 | MD | Car medul-lar atípic | III | 23 | EXT | NEG | NEG |
| 76 | ME | CDI | III | 45 | NO | POS | NEG |
| 93 | ME | CDI | III | 60 | NO | POS | POS |
| 83 | ME | Car metaplàstic + CID | III | 35 | NO | NEG | NEG |
| 61 | ME | CDI + CID | III | 23 | EXT | NEG | NEG |
| 60 | ME | Car medul-lar atípic | III | 17 | MOD | NEG | NEG |
| 64 | MD | CDI | III | 12 | NO | NEG | NEG |
| 53 | MD | CDI | III | 22 | EXT | POS | NEG |
| 52 | ME | CDI + CID | III | 14 | NO | NEG | NEG |
| 51 | MD | CDI | III | 8 | NO | NEG | NEG |
| 68 | MD | CDI | III | POST-QT | EXT | NEG | NEG |
| 79 | MD | CDI | III | 50 | EXT | NEG | NEG |
| 56 | ME | CDI | III | 10 | NO | NEG | NEG |
| 60 | ME | CDI | II | 8 | NO | NEG | NEG |
| 82 | MD | CDI amb tets medul-lar | III | 30 | MOD | NEG | NEG |
| 38 | ME | CDI | III | 25 | MOD | NEG | NEG |
| 50 | ME | Car anaplàstic | III | 15 | NO | NEG | NEG |
| 57 | ME | Car medul-lar | III | 22 | MIN | NEG | NEG |
| 42 | ME | CDI medul-lar | III | 16 | EXT | NEG | POS |
| 62 | MD | CDI | III | 30 | NO | NEG | NEG |
| 38 | ME | Car medul-lar atípic | III | 20 | MOD | NEG | NEG |
| 50 | ME | CDI | III | 18 | NO | NEG | NEG |
| 81 | ME | CDI | III | 13 | NO | NEG | NEG |
| 71 | MD | CDI | III | BAG | NO | BAG | BAG |
| 44 | ME | Car metaplàstic | III | 28 | MOD | NEG | NEG |
| 71 | MD | CDI | III | 22 | EXT | POS | NEG |
| 53 | MD | CDI | III | 23 | MIN | NEG | NEG |
| 61 | MD | CDI | III | 24 | NO | NEG | NEG |
| 55 | MD | CDI | III | 12 | NO | NEG | NEG |
| 68 | MD | CDI | III | 8 | NO | NEG | NEG |
| 59 | MD | CDI | III | POST-QT | NO | NEG | NEG |
| 77 | ME | CDI | III | 25 | NO | POS | NEG |
| 72 | ME | CDI micropapil-lar | II | 30 | NO | NEG | NEG |
| 64 | ME | Car lobel-lar infiltrant | II | 3 | MOD | NEG | NEG |
| 51 | ME | CDI + CID | III | 22 | NO | POS | NEG |
| 44 | ME | CDI + CID | II | 11 | NO | NEG | NEG |
| 40 | MD | CDI + CID | III | 50 | NO | POS | NEG |
| 53 | ME | CDI | III | 18 | MIN | NEG | NEG |
| 40 | MD | Car medul-lar atípic + CID | III | 31 | MOD | NEG | NEG |
| 83 | ME | Car medul-lar | III | 45 | MOD | NEG | NEG |
| 65 | MD | CDI + CID | III | 15 | NO | NEG | POS |
| 70 | ME | Car medul-lar + CID | III | 19 | EXT | NEG | NEG |
| 66 | ME | CDI + CID | I | POST-QT | NO | POS | NEG |
| 27 | MD | Car medul-lar | III | 16 | MOD | NEG | NEG |
| 51 | MD | CDI + CID | II | 18 | NO | NEG | NEG |
| 90 | ME | CDI + CID | III | 28 | MOD | NEG | NEG |
| 77 | MD | CDI + CID | III | 10 | MIN | NEG | NEG |
| 40 | ME | CDI + CID | III | POST-QT | EXT | NEG | NEG |
| 69 | MD | CDI + CID | III | 13 | NO | NEG | NEG |
| 46 | ME | CDI | III | POST-QT | MOD | NEG | NEG |
| 72 | ME | CDI + CID | III | 62 | EXT | NEG | NEG |

ME: mama esquerra; MD: mama dreta; CDI: carcinoma ductal infiltrant; CID: carcinoma intraductal; Car: carcinoma; BAG: biòpsia amb agulla gruixuda; POST-QT: post-quimioteràpia; MIN: mínima; MOD: moderada; EXT: extensa; NEG: negatiu/absència; POS: positiu/presència.

RESULTATS

Sent l'estadiatge tumoral TNM casi en un terç per cent de la cohort entre un pT1c i pT2, que corresponen a un 30% (18/60) i 40% (24/60), respectivament, seguit d'un pT1b en 13,33% (8/60). De la resta, la meitat són casos únics i l'altre meitat són post-quimioteràpia amb diferents estadis (Taula 12).

Taula 12: Relació del casos amb l'estadiatge oncològic patològic a nivell tumoral (pTNM)

| Estadi | Nºcasos | Percentatge |
|--------|---------|-------------|
| pTis | 1 | 1,67% |
| pT1a | 1 | 1,67% |
| pT1b | 8 | 13,33% |
| pT1c | 18 | 30% |
| pT2 | 24 | 40% |
| pT3 | 1 | 1,67% |
| cT4b* | 1 | 1,67% |
| pT4d | 1 | 1,67% |
| ypT1b | 1 | 1,67% |
| ypT1c | 1 | 1,67% |
| ypT2 | 2 | 3,33% |
| ypT3 | 1 | 1,67% |

*"c" es l'estadiatge clínic, ja que es tracta d'un cas que no es disposa de la peça quirúrgica per a valorar la mida tumoral histològicament.

RESULTATS

RESULTATS DEL SEGUIMENT/SUPERVIVÈNCIA

Dels 57 casos que es coneix el seu seguiment realitzat des del moment del diagnòstic fins a data d'1 de gener de 2016 (hi ha un 5% de casos que no s'inclouen, que corresponen a 2 pacients en les que es desconeix l'evolució clínica i 1 pacient on el seguiment que es té de 84 mesos, corresponent a seguiment fins al desembre 2014 lliure de malaltia) s'ha observat que la supervivència mitja de les pacients de la cohort és de 72,62 mesos, amb un interval de 10 a 117 mesos.

S'ha observat que un 28% (16/57) de les pacients han mort durant el període de seguiment, de les quals una mica més de la meitat (56,25%) han mort pel carcinoma de mama (Taula 13) i la resta (43,75%) per altres causes (Taula 14). Del total de la cohort s'observa que un 15,79% (9/57) han mort per recurrència o/i recidiva o/i disseminació del carcinoma de mama, amb una supervivència mitja en aquestes pacients de 40,11 mesos, amb un interval de 10 a 61 mesos. Mentre que un 12,28% (7/57) han mort per altres causes diferents a la neoplàsia de mama. Hi ha una pacient de la cohort (1,75%, 1/57) amb recaiguda del carcinoma de mama amb metàstasis òssies, sense mort després de 92 mesos de seguiment, tenint varis factors de riscos com metàstasis ganglionars al diagnòstic (17/30 ganglis estudiats) i imatges d'invasió angiolímfàtica.

Tenint present que tots els casos de mort per carcinoma de mama triple negatiu són carcinomes ductals infiltrants de tipus no específic (CDI NOS) amb grau histològic III, s'han observat que 5 (55,56%) dels 9 casos tenien un o més factors de mal pronòstic, 3 d'ells tenien ganglis positius (2 d'ells 4 o més ganglis), 4 d'aquests també tenien imatges d'invasió angiolímfàtica i 1 d'aquests tenia imatges d'invasió perineural.

RESULTATS

Taula 13: Característiques clíniques i histològiques dels casos que han mort per càncer de mama

| Anys al diagnòstic | Invasió angio-limfàtica | Invasió perineural | Ganglis axil·lars | Mesos de vida | Mort per càncer mama |
|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|---------------|---|
| 40 | SI | NO | 1/15 | 54 | Progressió + metàstasis pulmó |
| 50 | NO | NO | 0/18 | 64 | Metàstasis SNC |
| 61 | NO | NO | 0/19 | 46 | Progressió + metàstasis SNC |
| 66 | SI | NO | 17/30 | 92-viu | Metàstasis òssies |
| 68 | NO | NO | 0/1 | 36 | Metàstasis òssies, pulmonars, ganglionars i suprarenals |
| 71 | NO | NO | cN1a | 19 | Metàstasis hepàtiques |
| 72 | NO | NO | 5/20 | 23 | Metàstasis pulmó i SNC |
| 76 | SI | NO | 8/35 | 48 | Progressió local a paret toràcica |
| 77 | SI | NO | 0/2 | 61 | Metàstasis pulmó |
| 93 | SI | SI | NS | 10 | Progressió local |

CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; AL: imatges d'invasió angiolimfàtica; PN: imatges d'invasió perineural; SNC: sistema nerviós central

Taula 14: Característiques histològiques i clíniques dels casos que han mort per altres causes

| Anys al diagnòstic | Tipus histològic | Grau histològic | Mesos de vida |
|--------------------|-----------------------|-----------------|---------------|
| 79 | CDI NOS | III | 68 |
| 80 | CDI NOS | III | 63 |
| 81 | CDI NOS | III | 97 |
| 82 | CDI trets medul·lars | III | 94 |
| 83 | Carcinoma metaplàstic | III | 61 |
| 83 | Carcinoma medul·lar | III | 61 |
| 90 | CDI NOS | III | 13 |

Es coneix l'existència d'una segona neoplàsia, entesa com a qualsevol altre carcinoma de mama diferent a l'estudiat actualment, en un 12,28% (7/57) dels casos, que consisteixen amb un 5,26% (3/57) neoplàsies prèvies a la de l'estudi i un 12,28% (7/57) neoplàsies sincròniques o posteriors a la de l'estudi. Pel que fa a les neoplàsies prèvies de càncer de mama 1 cas també té un perfil immunohistoquímic triple negatiu diagnosticat 8 anys abans, 1 cas té un perfil immunohistoquímic luminal diagnosticat 12 anys abans i en 1 altre cas,

RESULTATS

diagnosticat 15 anys abans, no es va estudiar el perfil (Taula 15). Mentre que, pel que fa a les neoplàsies sincròniques o posteriors tenim 2 casos amb perfil triple negatiu diagnosticades 4 anys després; 3 casos amb perfil luminal diagnosticades dues de manera sincrònica i una 7 anys després; 1 cas amb perfil Her2 positiu diagnosticat 8 anys després; i 1 cas en que no s'ha estudiat el perfil (probablement per ser un carcinoma in situ) diagnosticat de manera sincrònica (Taula 16).

Taula 15: Característiques de la relació dels casos amb neoplàsies prèvia

| Carcinoma de la cohort | | | | | Neoplàsia prèvia | | | | |
|------------------------|----------|-------------|------------|------|------------------|----------|---------------------|------------|------|
| Edat Diag | Any diag | Tumor | Perfil IHQ | Mama | Temps | Any diag | Tumor | Perfil IHQ | Mama |
| 80 | 2008 | CDI NOS III | TNBC | ME | 8 anys | 2000 | Carcinoma medul·lar | TNBC | ME |
| 61 | 2010 | CDI NOS III | TNBC | MD | 15 anys | 1995 | CDI NOS II | NS | ME |
| 64 | 2011 | CLI NOS II | TNBC | ME | 12 anys | 1999 | CDI NOS I | Luminal | ME |

Diag: diagnòstic; IHQ: immunohistoquímica, CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; TNBC: triple negatiu; NS: no estudiat; ME: mama esquerra

Taula 16: Característiques de la relació dels casos amb neoplàsies sincròniques o posteriors

| Carcinoma de la cohort | | | | | Neoplàsia sincrònica o posterior | | | | |
|------------------------|----------|----------------------------|------------|------|----------------------------------|----------|----------------------------|------------|------|
| Edat diag | Any Diag | Tumor | Perfil IHQ | Mama | Temps | Any diag | Tumor | Perfil IHQ | Mama |
| 57 | 2006 | Carcinoma medul·lar | TNBC | ME | Sincrònic | 2006 | Carcinoma micropapil·lar | Luminal | MD |
| 62 | 2006 | CDI NOS III | TNBC | ME | 7 anys | 2013 | CID amb microinfiltrant | Luminal | ME |
| 65 | 2007 | CDI NOS II | TNBC | MD | 8 anys | 2015 | CDI NOS II | Her2 | ME |
| 40 | 2008 | Carcinoma medul·lar atípic | TNBC | MD | Sincrònic | 2008 | CDI NOS II | Luminal | ME |
| 43 | 2009 | CDI NOS III | TNBC | MD | 4 anys | 2013 | Carcinoma trets medul·lars | TNBC | ME |
| 53 | 2010 | CDI NOS III | TNBC | MD | 4 anys | 2014 | CDI NOS mucoproducció III | TNBC | MD |
| 72 | 2011 | CDI NOS III | TNBC | ME | Sincrònic | 2011 | CID | NS | MD |

Diag: diagnòstic; IHQ: immunohistoquímica, CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; TNBC: triple negatiu; NS: no estudiat; ME: mama esquerra; MD: mama dreta.

Només en un 21,67% (13/60) de la cohort s'ha realitzat estudi en línia germinal del gen *BRCA*, obtenint en un 38,46% (5/13) la presència d'una mutació patogènica (Taula 17), en un 61,54% (8/13) l'absència de mutació patogènica coneguda (no informatius) (Taula 18).

RESULTATS

Taula 17: Algunes característiques dels casos amb mutacions patogèniques del gen BRCA

| Edat diag | Tumor | Estudi BRCA línia germinal | Mesos SPV | Estat actual |
|-----------|---------|---|-----------|---|
| 24 | CDI NOS | VARIANT SIGNIFICAT INCERT BRCA1f 156 vsi | 86 | Viu |
| 39 | CDI NOS | BRCA1 F 35 (mutació nonsense) | 89 | Viu |
| 61 | CDI NOS | BRCA1 (mutació frameshift) | 46 | Mort per metàstasis |
| 51 | CDI NOS | BRCA1 (gran deleció) | 61 | Viu (antecedent neo contralat, 15anys abans) |
| 69 | CDI NOS | BRCA2 F900 (mutació frameshift) | 53 | Viu |

Diag: diagnòstic; SPV: supervivència; CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; neo: neoplàsia; contralat: contralateral

Taula 18: Algunes característiques dels casos amb estudi de BRCA amb absència de mutació patogènica coneguda (no informatiu)

| Edat diag | Tumor | Estudi BRCA línia germinal | Mesos SPV | Estat actual |
|-----------|----------------------|----------------------------|-----------|--|
| 43 | CDI NOS | No informatiu | 78 | Viu (segona neo contralat, 4 anys després) |
| 39 | Car medul-lar atípic | No informatiu | 90 | Viu |
| 64 | CDI NOS | No informatiu | 64 | Viu |
| 56 | CDI NOS | No informatiu | 117 | Viu |
| 53 | CDI NOS | No informatiu | 106 | Viu |
| 51 | CDI NOS | No informatiu | 102 | Viu |
| 40 | Car medul-lar atípic | No informatiu | 98 | Viu |
| 66 | CDI NOS | No informatiu | 92 | Viu (recaiguda als 4anys) |

Diag: diagnòstic; SPV: supervivència; Car: carcinoma; CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; neo: neoplàsia; contralat: contralateral

RESULTATS

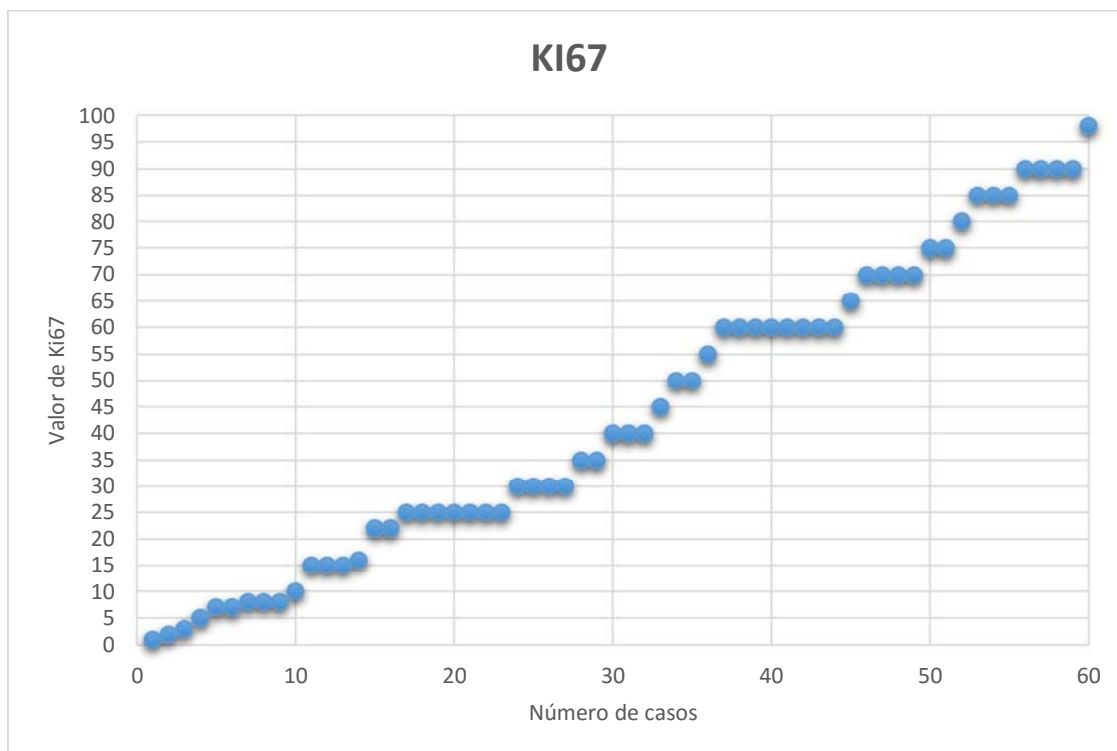
RESULTATS DELS ESTUDIS IMMUNOHISTOQUÍMICS

Partint de que en el 100% dels casos tenen un resultat “negatiu” en l'estudi immunohistoquímic de receptors d'estrògens, de receptors de progesterona i d'Her2, el requisit necessari per formar part de la cohort. Només mencionar que un 3,33% (2/60) tenen una expressió nuclear dèbil menor de l'1% per a receptors d'estrògens i que un 11,67% (7/60) tenen un Her2 negatiu amb “score” 1+.

Els resultats quantitatius observats dels diferents estudis immunohistoquímics realitzats es descriue en la següent Taula (Taula 19).

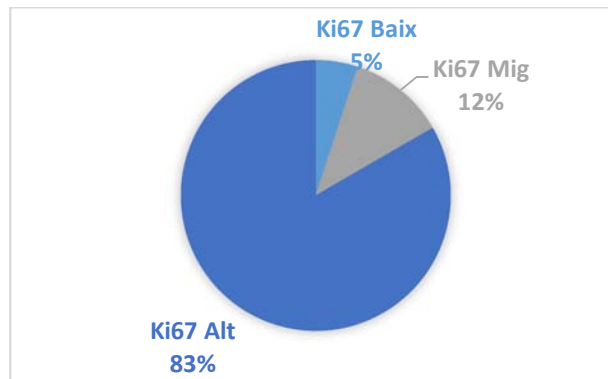
- L'índex proliferatiu de Ki67 s'ha valorat de forma quantitativa individual (Gràfic 5), però s'ha classificat en tres grups: baix (<5%) en un 5% (3/60), mig (5-14%) en un 11,67% (7/60) i alt ($\geq 14\%$) en un 83,33% (50/60) (Gràfic 6 i Imatge 7).

Gràfic 5: Resultats de la valoració quantitativa individual del resultat immunohistoquímic de l'índex proliferatiu Ki67 de tots els casos de la cohort



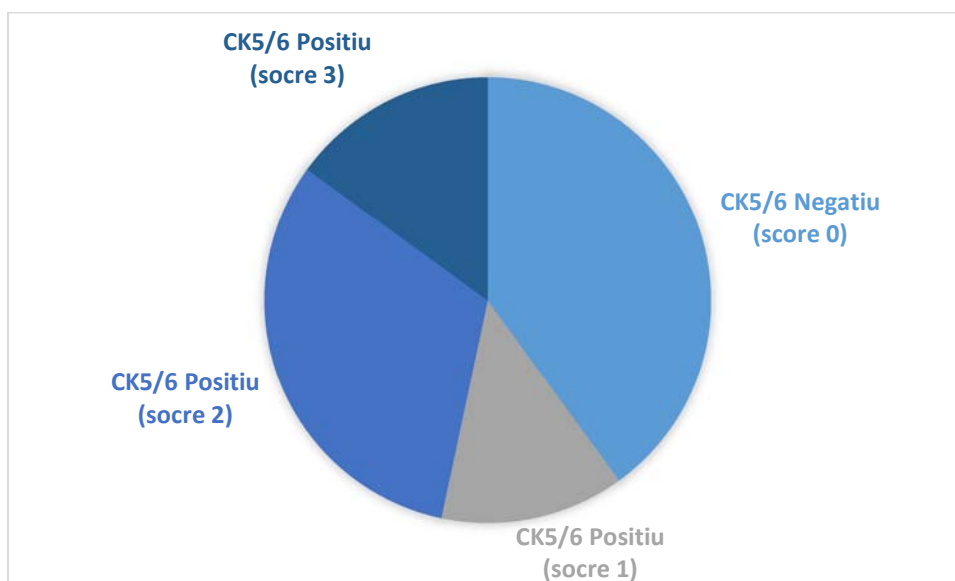
RESULTATS

Gràfic 6: Classificació en grups del resultat immunohistoquímic de l'índex proliferatiu Ki67



- La CK5/6 (citoqueratina 5/6) s'ha classificat de dues maneres; per una banda s'ha dividit segons variable dicotòmica, negativa (<5%) en un 45% (27/60) i positiva ($\geq 5\%$) en un 55% (33/60). Per altra banda, s'ha dividit segons variable qualitativa i quantitativa tenint en compte el gradient d'intensitat i el percentatge de cèl·lules neoplàsiques positives: 0 (negatiu) en un 40% (24/60), 1 (positivitat citoplasmàtica dèbil <10%) en un 13,33 (8/60), 2 (positivitat citoplasmàtica dèbil-moderada entre 10-50%) en un 31,67% (19/60) i 3 (positivitat citoplasmàtica moderada-marcada >50%) en un 15% (9/60) (Gràfic 7 i Imatge 8).

Gràfic 7: Classificació en grups del resultat immunohistoquímic de CK5/6 segons variable qualitativa i quantitativa

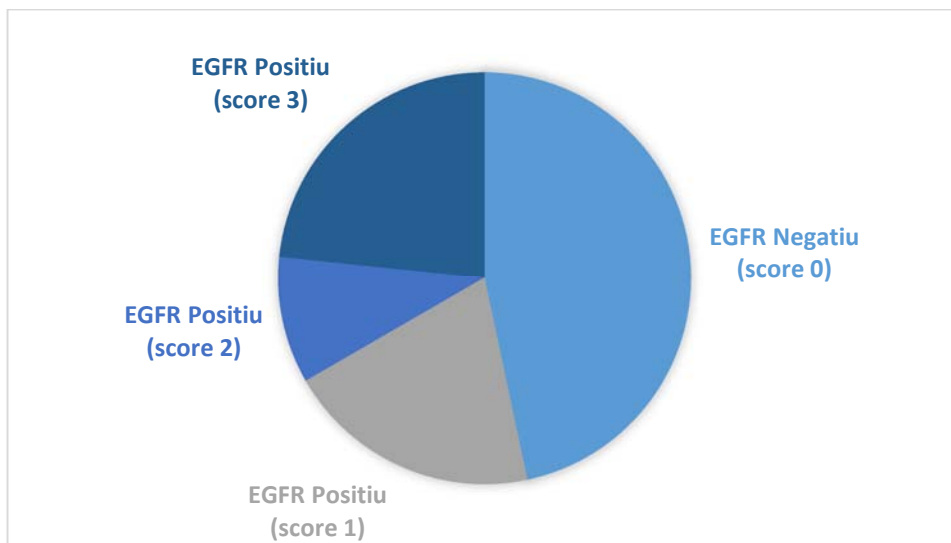


- El resultat immunohistoquímic d'EGFR també s'ha classificat de dues maneres. Per una banda, segons variable quantitativa i qualitativa s'ha dividit

RESULTATS

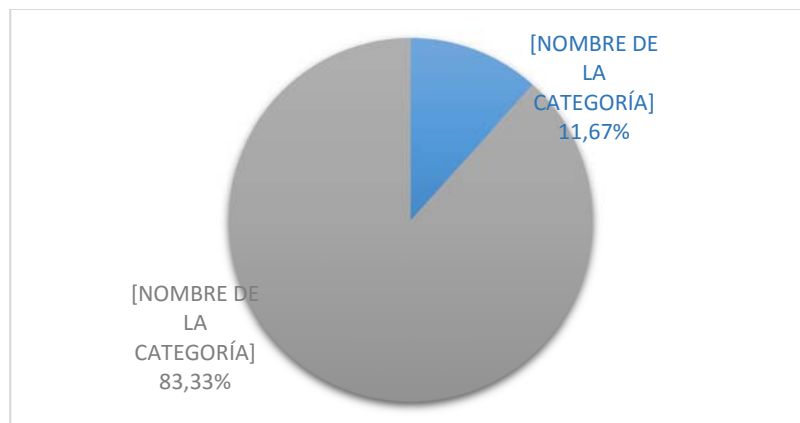
en: 0 (negatiu) en un 46,67% (28/60), 1 (positivitat parcial de membrana) en un 20% (12/60), 2 (positivitat completa i dèbil de membrana >10%) en un 10% (6/60) i 3 (positivitat completa i intensa de membrana >10%) en un 23,33% (14/60). Per altra banda, segons variable dicotòmica s'ha considera com a positiva (la presència de positivitat citoplasmàtica major a 1%), la qual englobaria tots aquells casos amb resultat 1, 2 i 3, sent en un 53.33% (32/60) i negativa (la presència de positivitat citoplasmàtica menor o igual a 1%), que seria el grup 0-negatiu, en un 46,67% (Gràfic 8 i Imatge 9).

Gràfic 8: Classificació en grups del resultat immunohistoquímic d'EGFR segons variable qualitativa i quantitativa



- Els RA (receptors d'andrògens) s'ha dividit de forma dicotòmica en negatius (< 30%) en un 83,33% (53/60) i positius (≥30%) en un 11,67% (7/60) (Gràfic 9 i Imatge 10).

Gràfic 9: Classificació dels resultats immunohistoquímic de Receptors d'Andrògens



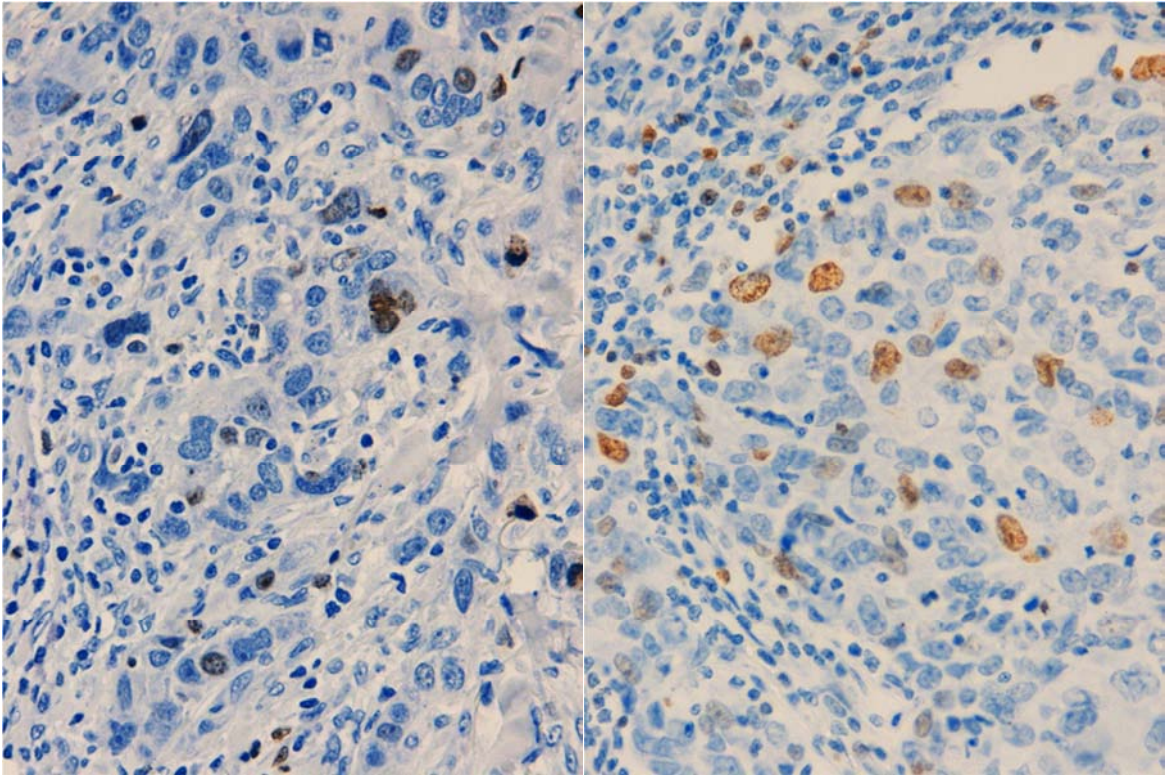
RESULTATS

Taula 19: Resultats globals dels paràmetres immunohistoquímics de tots els casos de la sèrie (N=60)

| Estudi IHQ | Resultat | Nº casos | % casos |
|------------|----------|----------|---------|
| Ki67 | Baix | 3 | 5% |
| | Mig | 7 | 11,67% |
| | Alt | 50 | 83,33% |
| Ck5/6 | Positiu | 33 | 55% |
| | Negatiu | 27 | 45% |
| EGFR | 0 | 28 | 46,67% |
| | 1 | 12 | 20% |
| | 2 | 6 | 10% |
| | 3 | 14 | 23,33% |
| RA | Positiu | 7 | 11,67% |
| | Negatiu | 53 | 83,33% |

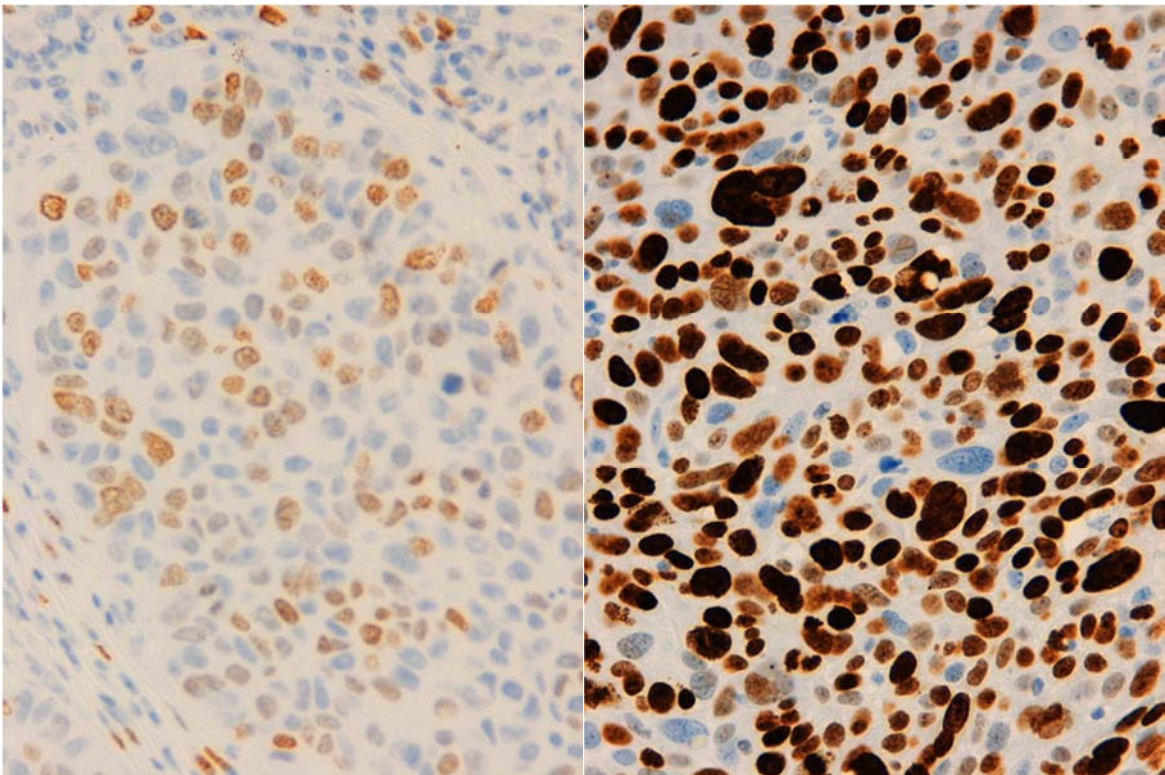
RESULTATS

Imatge 7: Imatges de tincions immunohistoquímiques dels diferents valors d'índex proliferatiu Ki67 observats en la sèrie



Ki67 baix (3%), a 40x

Ki67 mig (8%), a 40x

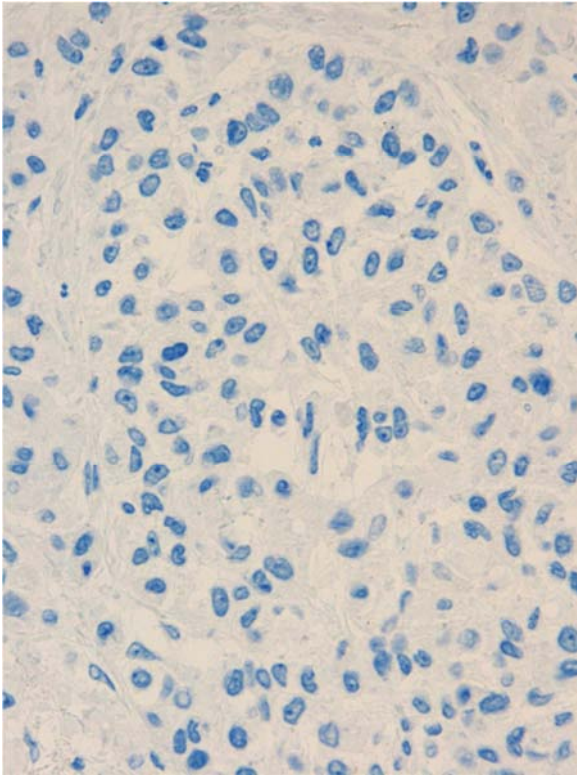


Ki67 alt (30%), a 40x

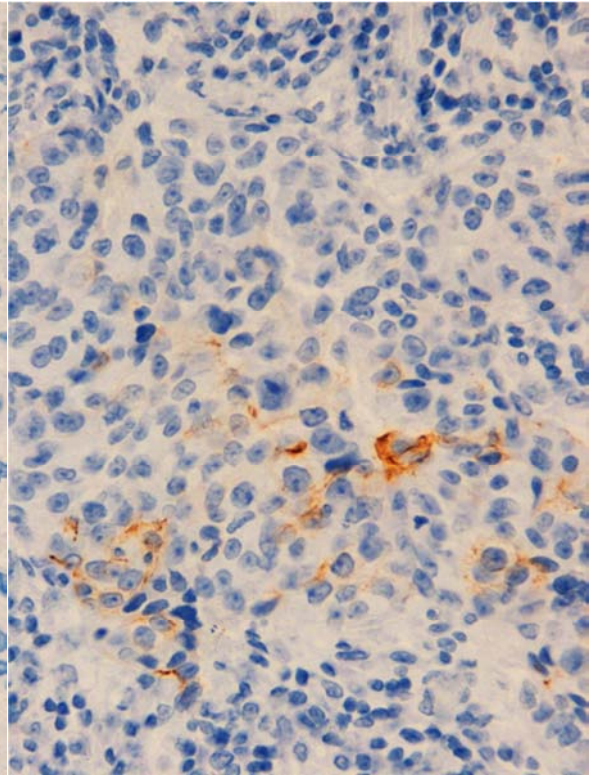
Ki67 alt (90%), a 40x

RESULTATS

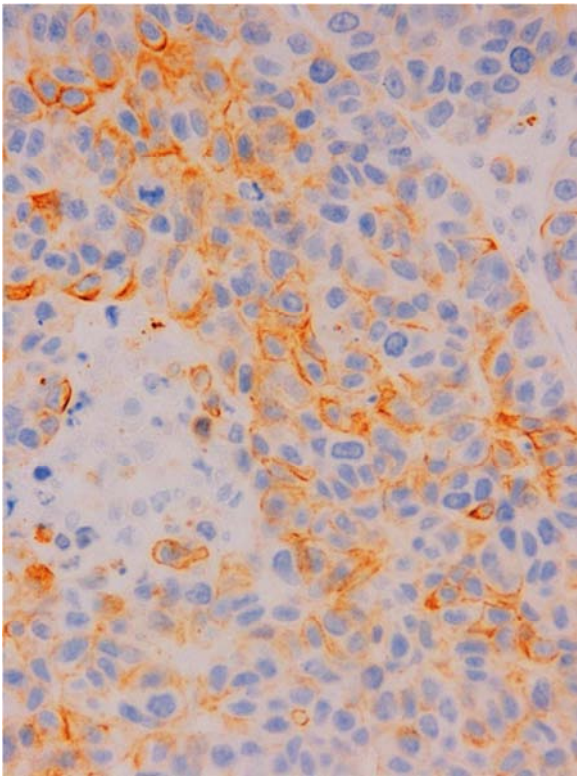
Imatge 8: Imatges de tincions immunohistoquímiques de les diferents valoracions de CK5/6 observades en la sèrie



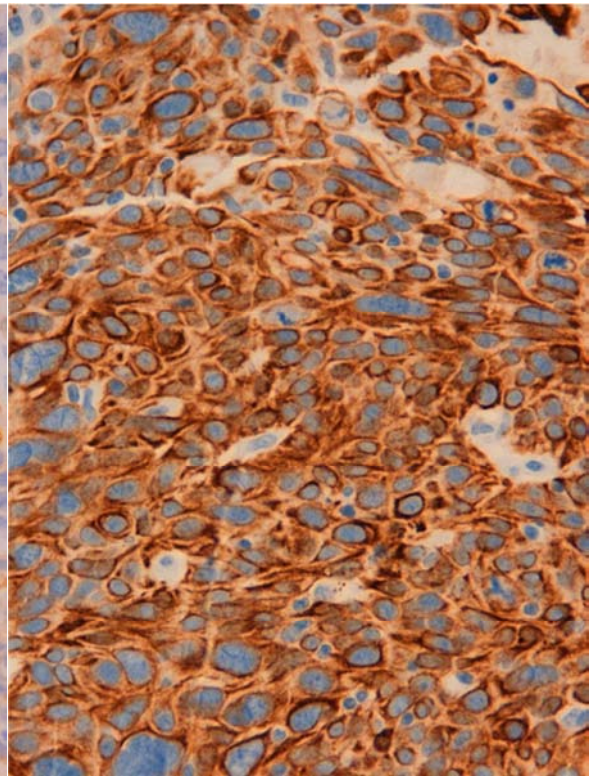
CK5/6 negativa (0), a 40x



CK5/6 positiva (1), a 40x



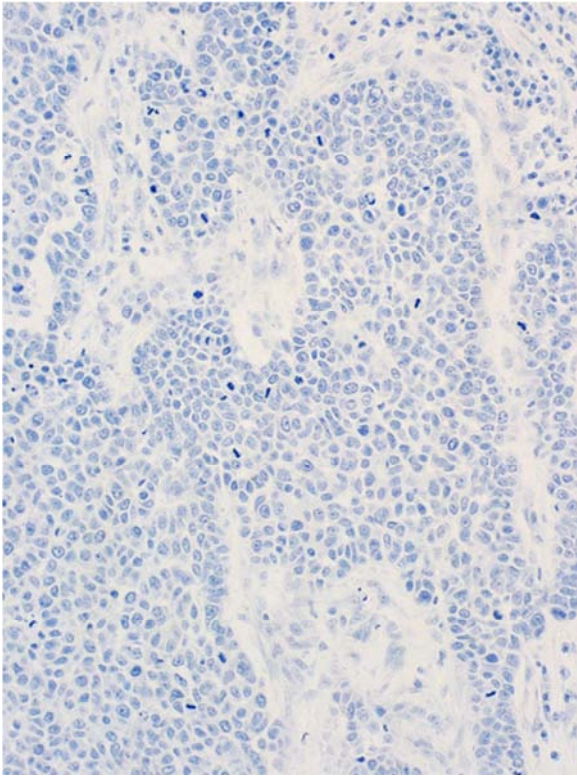
CK5/6 positiva (2), a 40x



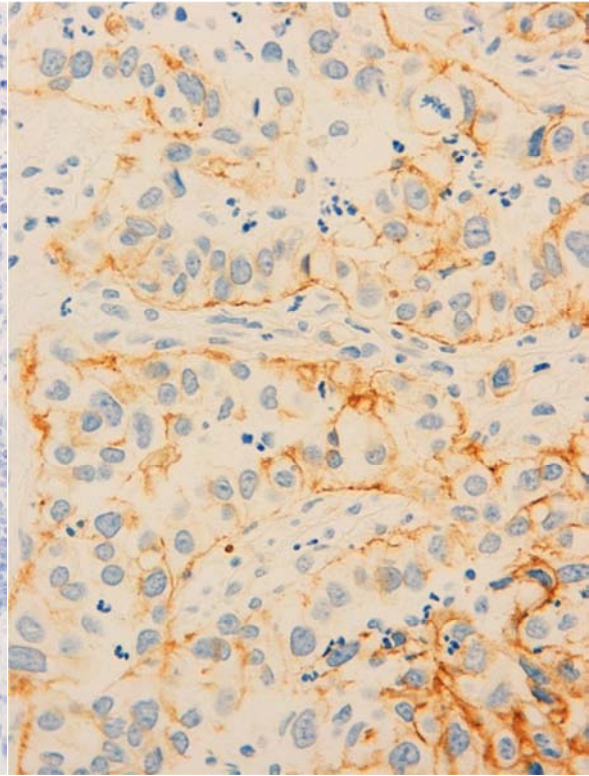
CK5/6 positiva (3), a 40x

RESULTATS

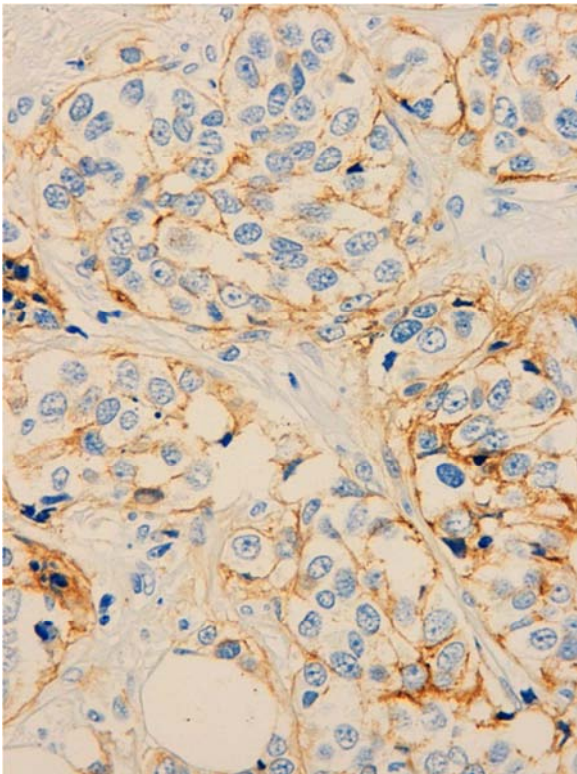
Imatge 9: Imatges de tincions immunohistoquímiques de les diferents valoracions d'EGFR observades en la sèrie



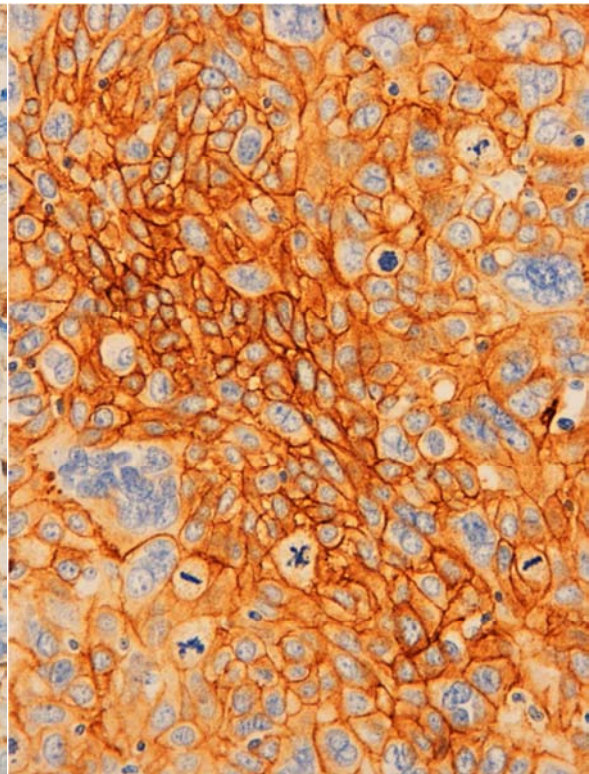
EGFR negativa (0), a 20x



EGFR positiva (1), a 40x



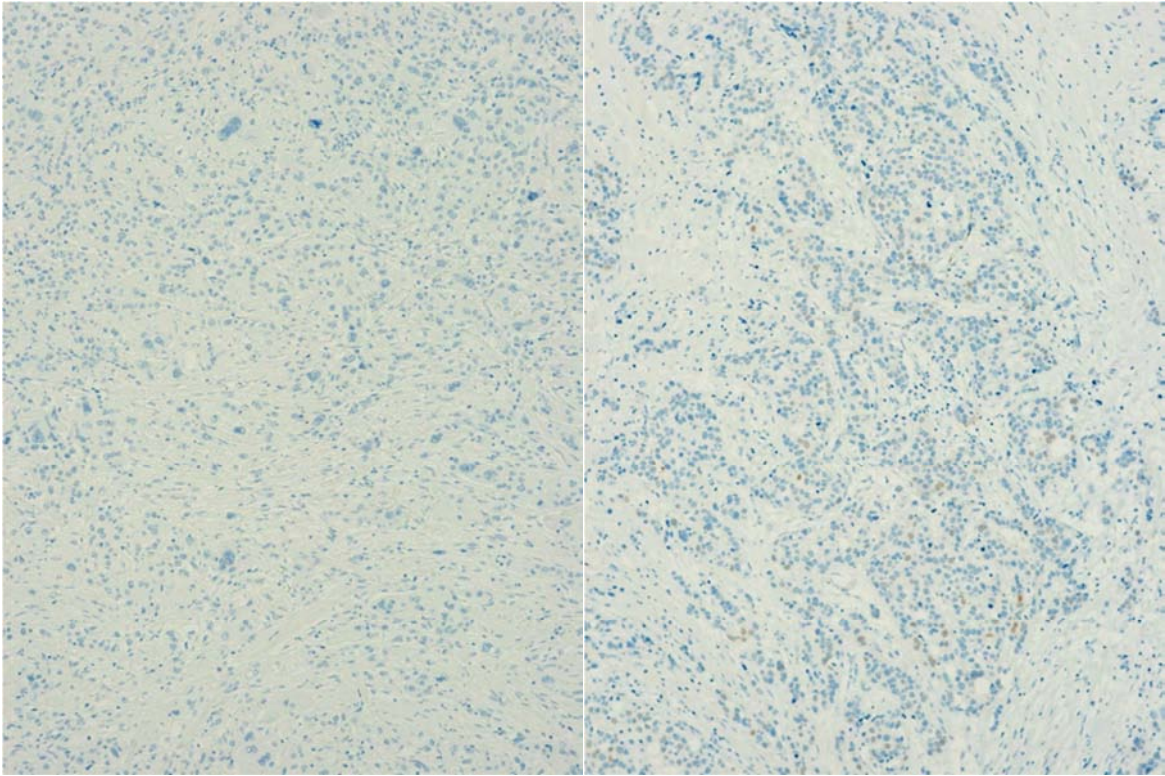
EGFR positiva (2), a 40 x



EGFR positiva (3), a 40 x

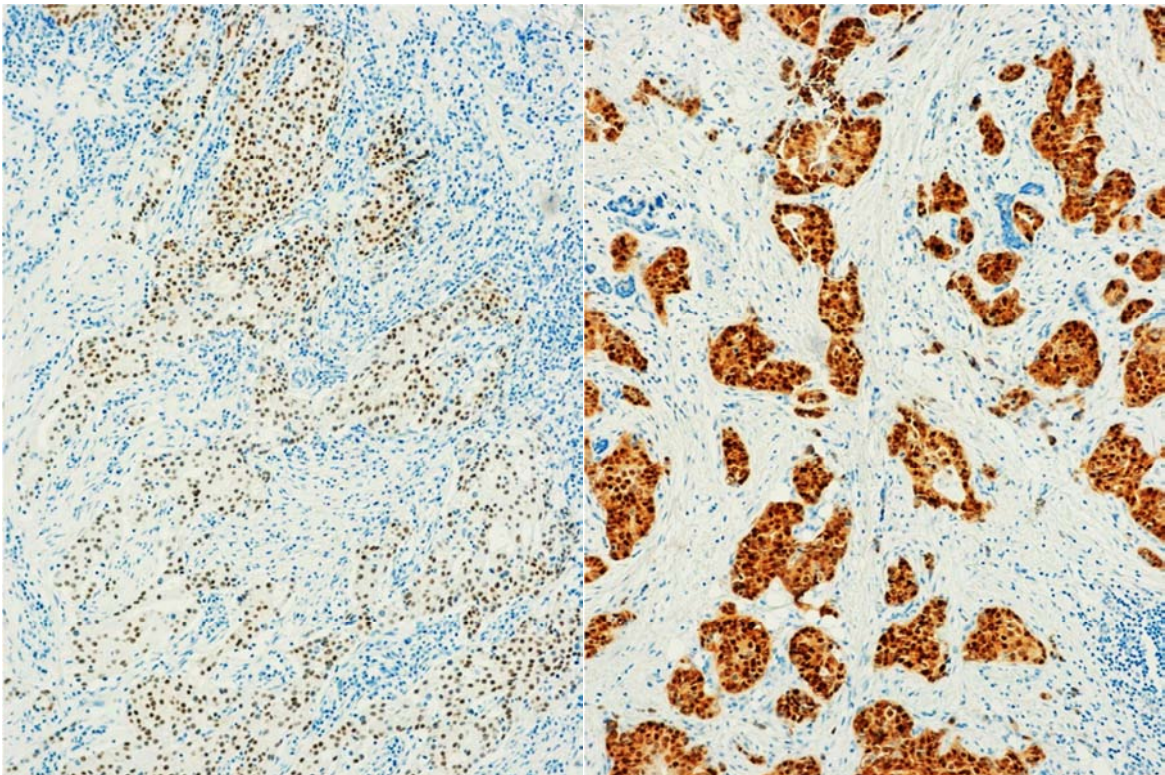
RESULTATS

Imatge 10: Imatges de tincions immunohistoquímiques de les diferents valoracions de RA observades en la sèrie



RA negatiu (0%), a 10x

RA negatiu (dèbils 5%), a 10x



RA positiu (moderada 75%), a 10x

RA positiu (intens 98%), a 10x

RESULTATS

En relacionar els diferents estudis immunohistoquímics entre ells s'observen els següents resultats (Taula 20, 21 i 22, i Gràfic 10):

Taula 20: Relació de casos entre resultats de Ki67 amb CK5/6 i EGFR i RA

| Ki67 | Baix | Mig | Alt |
|--------|------|-----|-----|
| CK5/6+ | 2 | 2 | 29 |
| CK5/6- | 1 | 5 | 21 |
| EGFR 0 | 2 | 3 | 23 |
| EGFR 1 | 0 | 1 | 11 |
| EGFR 2 | 0 | 3 | 3 |
| EGFR 3 | 1 | 0 | 13 |
| RA+ | 1 | 1 | 5 |
| RA- | 2 | 6 | 45 |

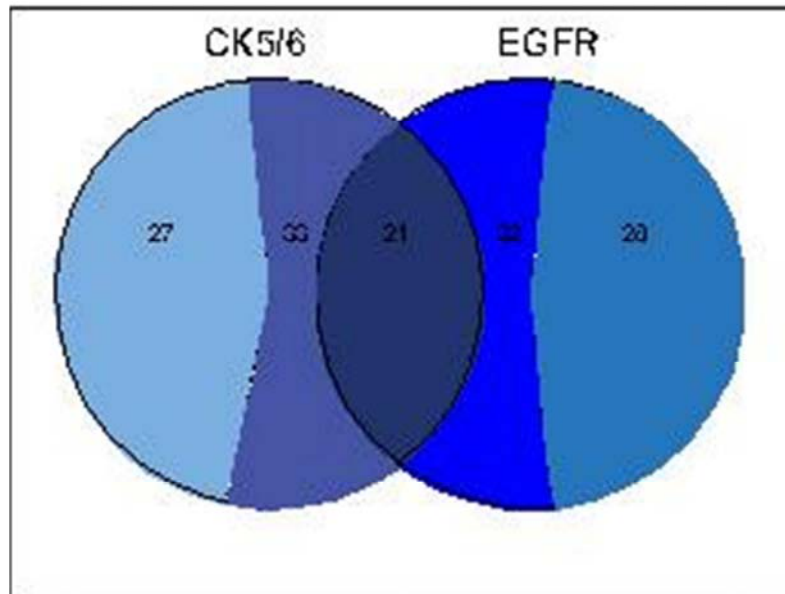
Taula 21: Relació de casos entre resultats de CK5/6 amb EGFR i RA

| | CK5+ | CK5- |
|--------|------|------|
| EGFR 0 | 12 | 16 |
| EGFR 1 | 5 | 7 |
| EGFR 2 | 5 | 1 |
| EGFR 3 | 11 | 3 |
| RA+ | 1 | 6 |
| RA- | 32 | 21 |

Taula 22: Relació de casos entre resultats de RA amb EGFR

| | EGFR 0 | EGFR 1 | EGFR 2 | EGFR 3 |
|------|--------|--------|--------|--------|
| RA + | 3 | 1 | 1 | 2 |
| RA - | 25 | 11 | 5 | 12 |

Gràfic 10: Correlació dels casos segons expressió dicotòmica de CK5/6 i EGFR

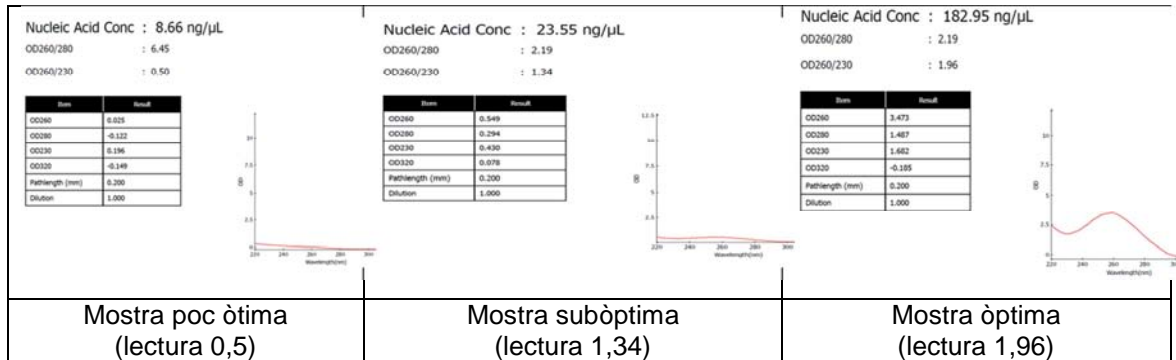


RESULTATS

RESULTATS DELS ESTUDIS MOLECULARS

La quantificació d'ADN extreta dels blocs tumorals de les pacients s'ha realitzat a través de lectures amb l'espectrofotòmetre, obtenint un valor mig de 99,61ng/μL, oscil·lant entre 326,84ng/μL i 8,66ng/μL. (Imatge 11).

Imatge 11: Exemple de lectura obtinguda amb l'espectrofotòmetre, que mostra la corba de quantitat d'ADN d'una mostra de la cohort



En un 15% (9/60) dels casos s'ha hagut de realitzar una segona extracció de mostra tumoral per a realitzar alguna de les parts de l'estudi molecular, degut a l'esgotament de la mostra de la primera extracció. Mencionar que en aquests casos la quantificació de l'ADN s'ha realitzat a través d'un fluorímetre, obtenint un valor mig de 5,54ng/μL, oscil·lant entre menys de 1ng/μL i 109,26ng/μL, sent la quantificació d'ADN més específica que les realitzades amb l'espectrofotòmetre. Això vol dir, que les mateixes mostres llegides amb fluorímetre obtindran valors més baixos que les realitzades amb espectrofotòmetre, ja que tal i com hem dit abans, se sap que aquesta última quantifica com a ADN també una part de la fracció d'ARN present en la mostra.

Així mateix, la valoració de la quantitat d'ADN extret dels estomes no tumorals estudiats disponibles dels casos amb tumors metilats és de 18,33% (11/60) del total de la sèries, que correspon a un 85% dels casos metilats (11/13, hi ha hagut dos casos metilats en que no s'ha pogut estudiar l'estroma no tumoral, degut a que el material correpon a biòpsies amb agulla gruixuda (BAG) és totalment tumorals i les peces són postquimioteràpia) per tal de valorar la possible presència d'hipermetilació, també s'ha realitzat amb el fluorímetre, obtenint un valor mig de 8,33ng/μL, oscil·lant ente < 1 ng/μL i 206ng/μL.

RESULTATS

Mencionar que alguna d'aquestes quantificacions pot ser menor a les obtinguts en general en les mostres tumorals, probablement degut a que la quantitat d'epiteli ductal no neoplàsic és escàs en varies de les mostres, degut a trobar-nos davant un parènquima mamari de predomini adipós amb poc component epitelial.

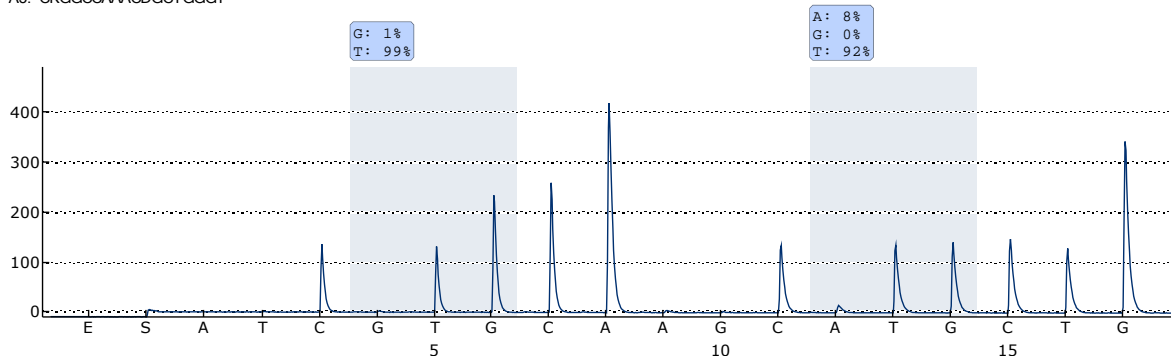
MUTACIÓ *EGFR*

En la nostra cohort, no s'ha trobat cap mutació activadora del gen *EGFR* en els exons estudiats. Mencionar que en dos casos es va trobar un possible percentatge de mutació molt proper al llindar de LOD+3% unitats ("Limit Of Detection" - límit de detecció per a considerar un cas mutat), els resultats dels quals es van comprovar visualment amb el pirograma on no s'observava una duplicació de la dispensació dels aminoàcids alterats per a poder-los considerar casos mutats; a la vegada que es va repetir l'estudi en aquests dos casos, obtenint resultats *wild-type* (Imatge 12).

Imatge 12: Pirogrames de resultat de l'estudi mutacional d'EGFR per piroseqüenciació

Un dels casos amb mutacions molt propers al llindar de detecció (LOD+3) en exó 21, que en repetir-lo es va confirmar l'estat *wild-type* de la mostra.

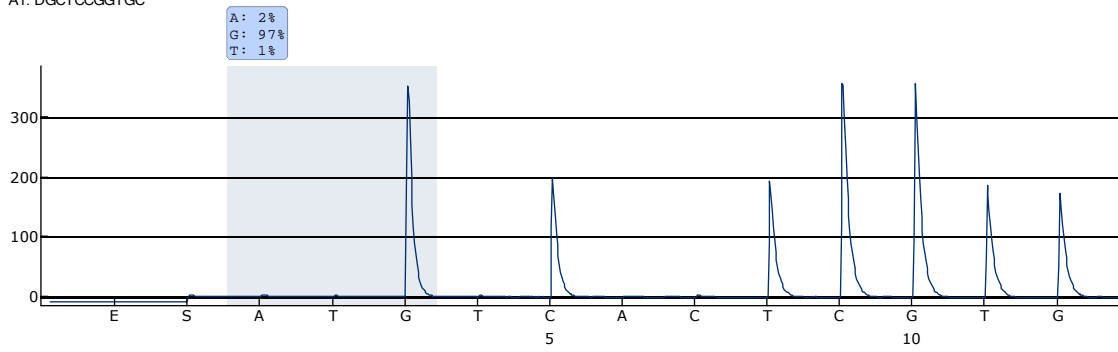
A5: CKGGCCAAACDGCTGGGT



RESULTATS

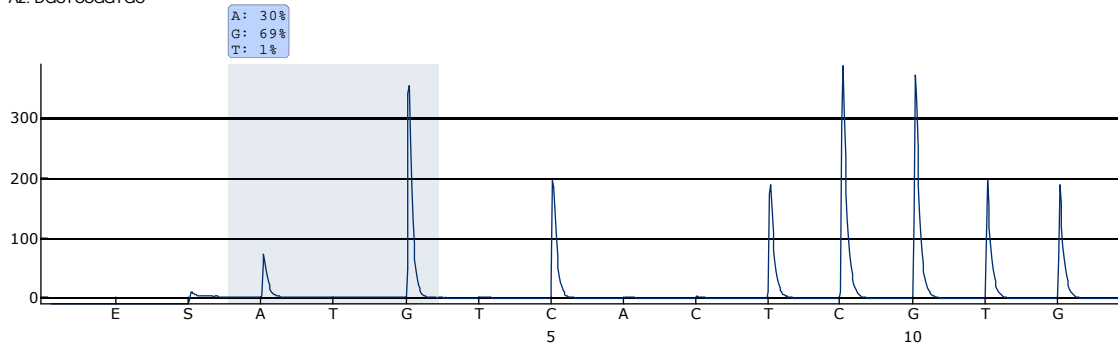
Cas amb absència de mutacions en exó 18 codó 719-723

A1: DGCTCCGGTGC



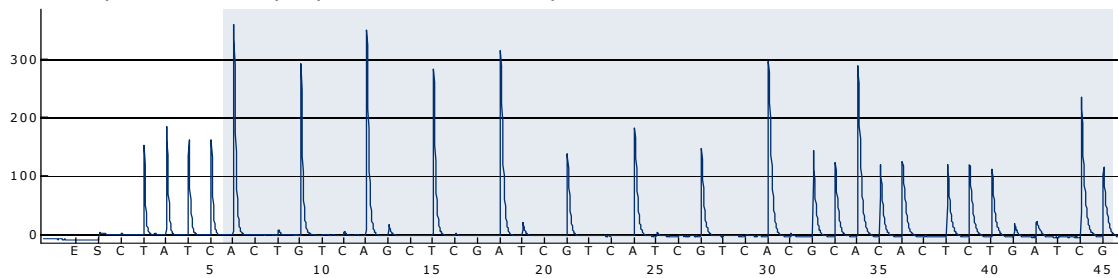
Cas. no pertanyent a la sèrie, amb presència de mutació en exó 18 codó 719 amb canvi de triplet GGC a AGC

A2: DGCTCCGGTGC



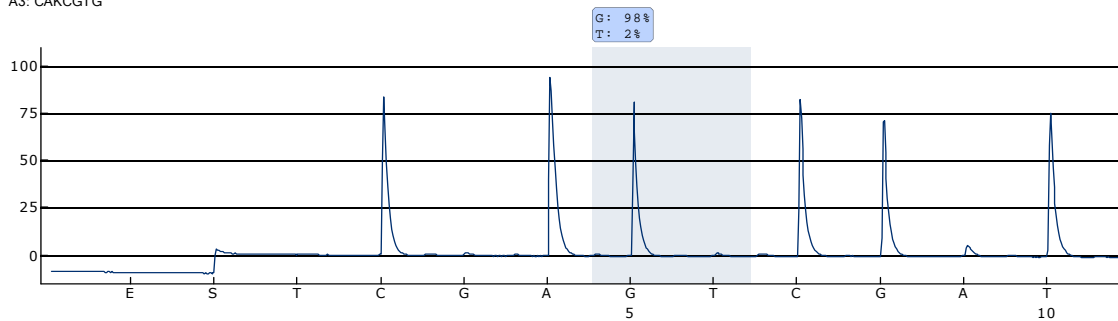
Cas amb absència de mutacions en exó 19 codó 746-759

A2: TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AAC[A[TCTCCGAAAGCCAACAAGGAATC]CTCGAT



Cas amb absència de mutacions en exó 20 codó 768-770

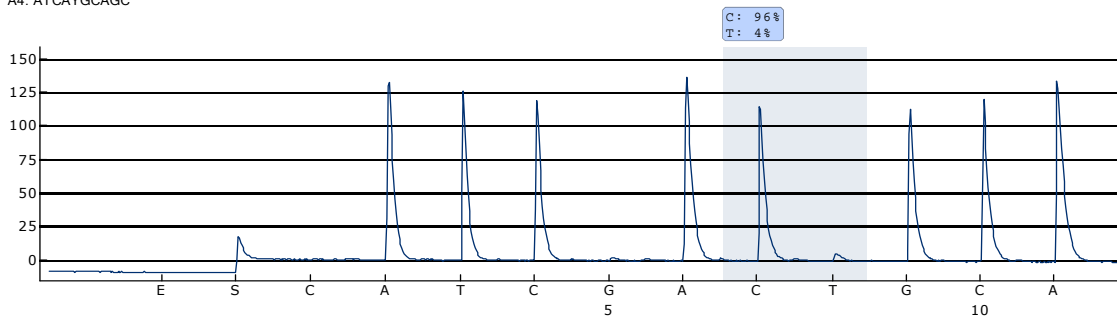
A3: CAKCGTG



RESULTATS

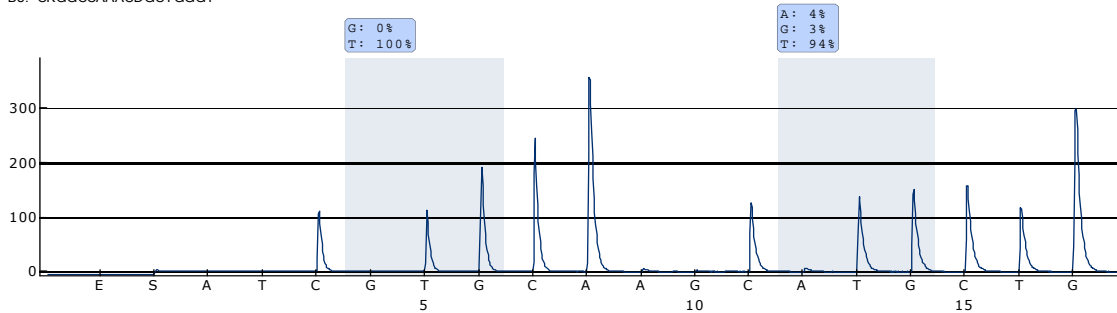
Cas amb absència de mutacions en exó 20 codó 789-792

A4: ATCAYGCAGC



Cas amb absència de mutacions en exó 21 codó 858-863

B8: CKGGCCAAACDGCTGGGT



MUTACIÓ *PIK3CA*

La mutació del gen *PIK3CA* en algun dels tres exons estudiats s'ha observat en un 10% (6/60) dels casos de la cohort, d'aquests un 66.67% (4/6) es troben en el domini cinasa de l'exó 20 i un 33.33% (2/6) es troben en els dominis hèlix de l'exó 9, un en la regió 542 i un en la regió 545. Les mutacions trobades es descriuen en la següent taula, juntament amb els respectius percentatges de quantitat de mostra/ADN tumoral mutat (Taula 24 i Imatge 14).

Taula 23: Mutacions del gen *PIK3CA* presents amb percentatge de mostra tumoral mutada

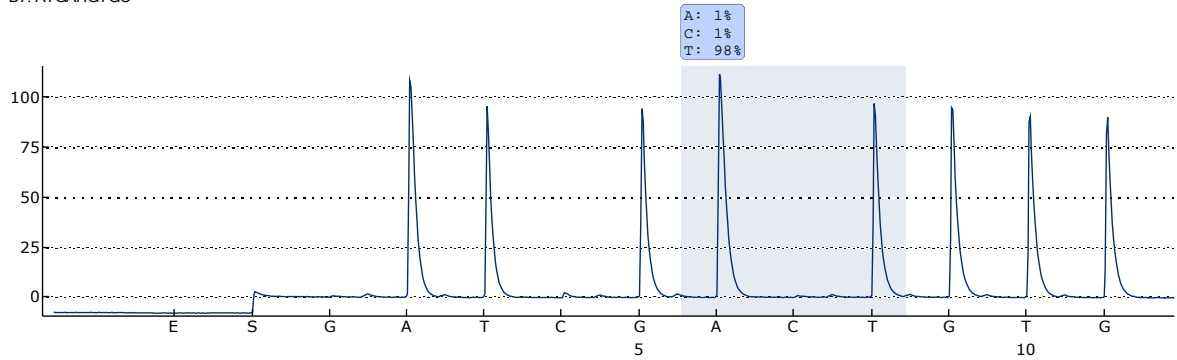
| Exó | Codó | Regió | Canvi | % mostra mutada |
|-----------|----------|--------|-------|-----------------|
| Exó 20 | p.H1047L | c.3140 | A > T | 43% |
| Exó 20 | p.H1047R | c.3140 | A > G | 26% |
| Exó 20 | p.H1047R | c.3140 | A > G | 36% |
| Exó 20 | p.H1047R | c.3140 | A > G | 56% |
| Exó 9 545 | p.E545K | c.1633 | G > A | 32% C-T |
| Exó 9 542 | p.E542K | c.1624 | G > A | 15% C-T |

RESULTATS

Imatge 13: Pirogrames de resultats mutats de PIK3CA de la cohort per piroseqüenciació, així com un cas wild-type de cada una de les mutacions

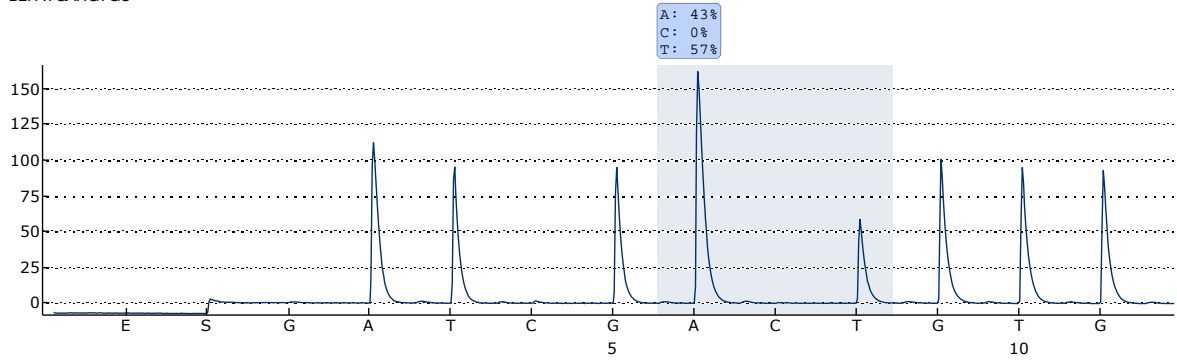
Exó 20 WT

B7: ATGAHGTGC



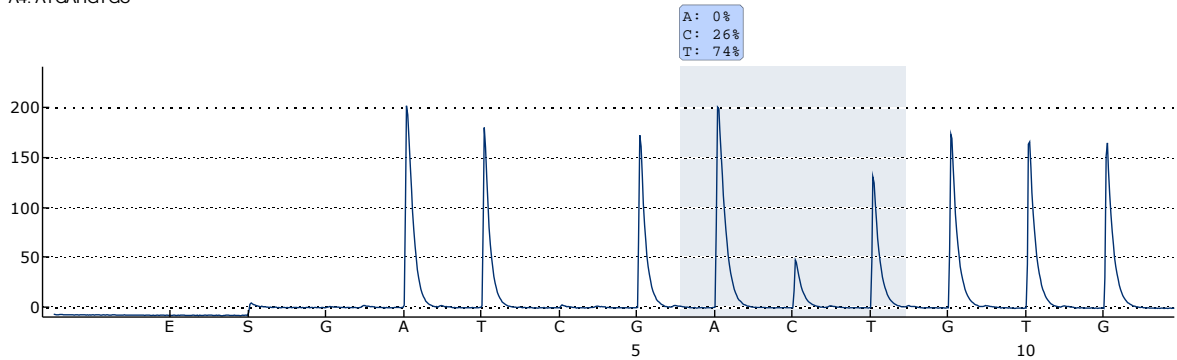
Exó 20 mutat en un 43% de la mostra

B2: ATGAHGTGC



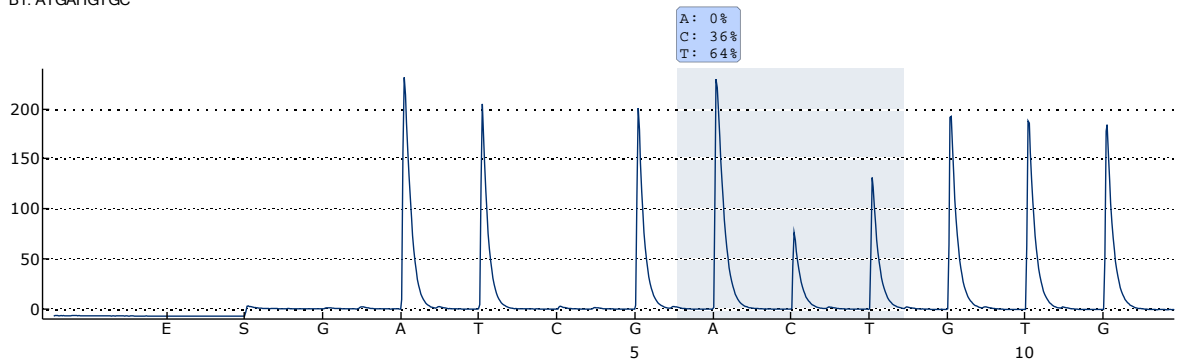
Exó 20 mutat en un 26% de la mostra

A4: ATGAHGTGC



Exó 20 mutat en un 36% de la mostra

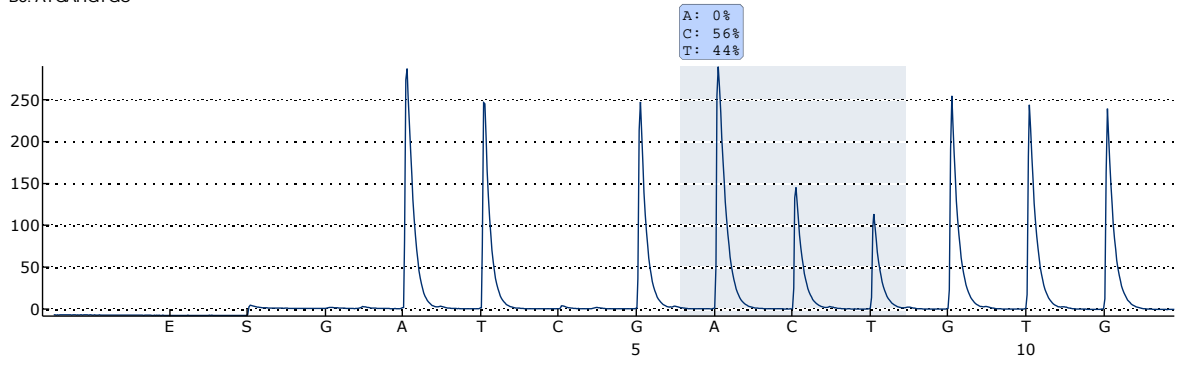
B1: ATGAHGTGC



RESULTATS

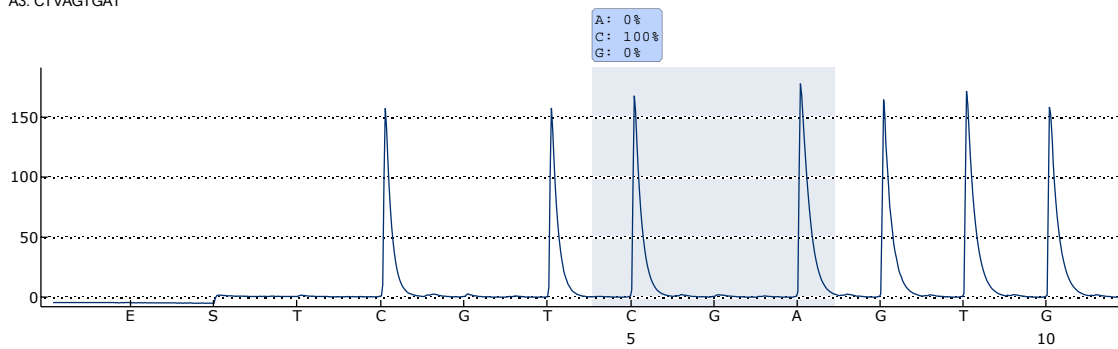
Exó 20 mutat en un 56% de la mostra

B3: ATGAHGTGC



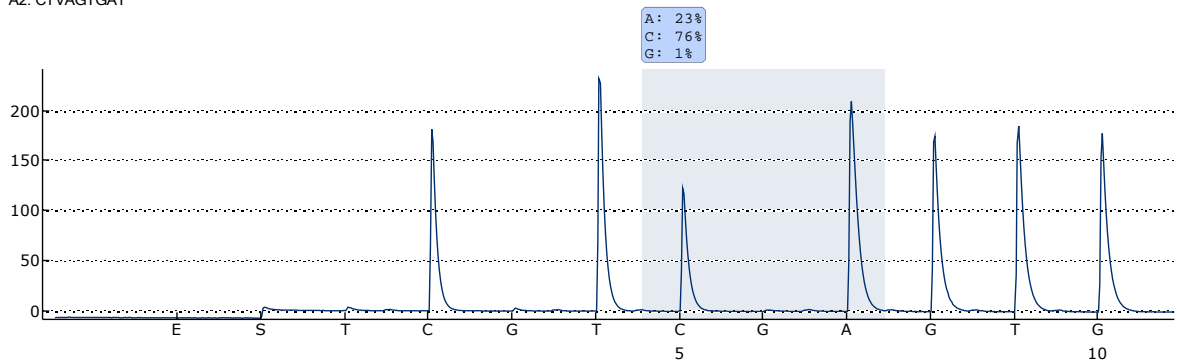
Exó 9 codó 545 WT

A3: CTVAGTGAT



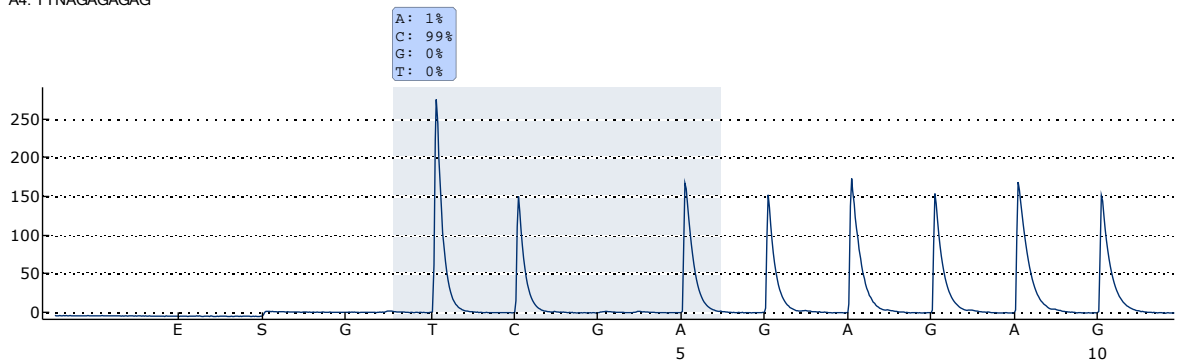
Exó 9 codó 545 mutat en un 23% de la mostra

A2: CTVAGTGAT



Exó 9 codó 542 WT

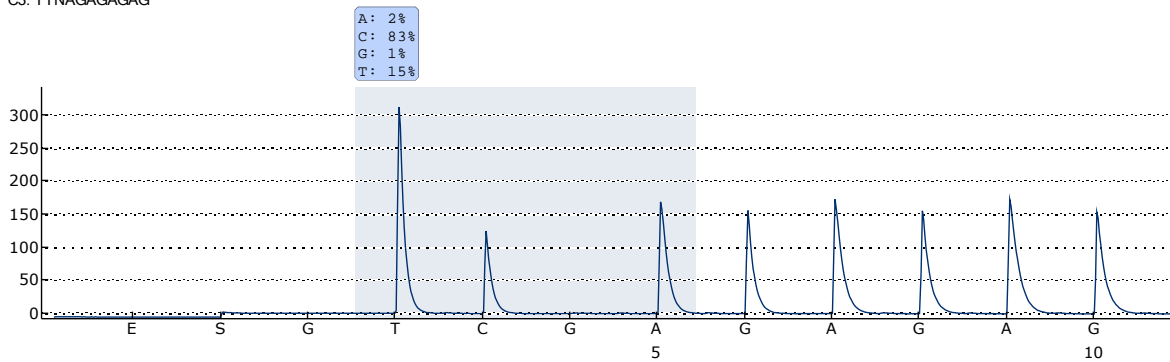
A4: TTNAGAGAGAG



RESULTATS

Exó 9 542 mutat en un 15% de la mostra

C3: TTNAGAGAGAG



HIPERMETILACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN *BRCA1*

S'ha observat hipermetilació de la regió promotora del gen *BRCA1* en un 21,67% (13/60) dels casos amb un grau d'hipermetilació mig de 38,67%, oscil·lant entre 58,11% i 20,67%, amb una desviació estàndard mitja de 2,7, oscil·lant entre 1,09 i 5,39 en els casos hipermetilats (Taula 23 i Imatge 13). Mentre que un 78,33% (47/60) dels casos no han mostrat hipermetilació amb un valor mig de 3,31%, oscil·lant entre 9,18% i 1,09%, amb una desviació estàndard mitja de 0,89, oscil·lant entre 0,32 i 2,88 en els casos no metilats.

Taula 24: Grau d'hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* present en els casos metilats amb les seves desviacions estàndards obtingudes

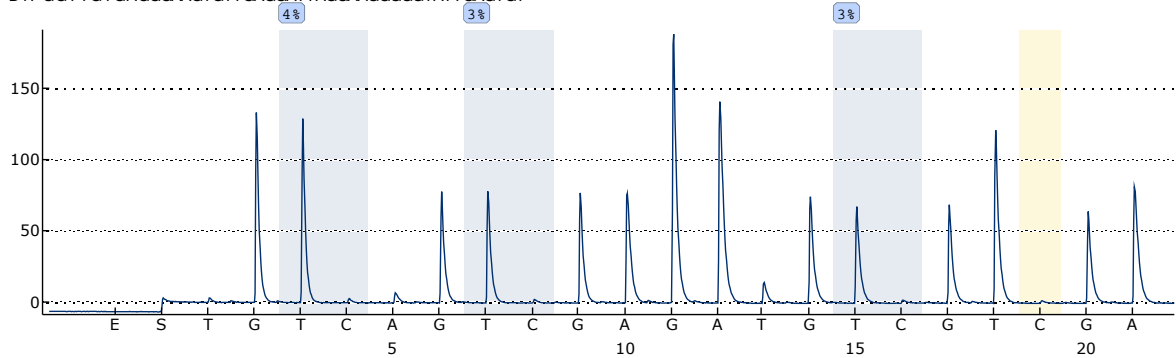
| Grau d'hipermetilació | Desviació estàndard |
|-----------------------|---------------------|
| 42,71% | 2,13 |
| 58,11% | 2,84 |
| 33,59% | 5,1 |
| 29,41% | 1,61 |
| 45,14% | 3,2 |
| 24,38% | 1,89 |
| 36,61% | 1,9 |
| 43,79% | 3,8 |
| 20,67% | 1,09 |
| 43,29% | 1,78 |
| 29,39% | 1,78 |
| 44,06% | 5,39 |
| 42,14% | 2,72 |

RESULTATS

Imatge 14: Pirogrames d'alguns resultats metilats de l'estudi d'hipermetilació del promotor del gen BRCA1 per piroseqüenciació

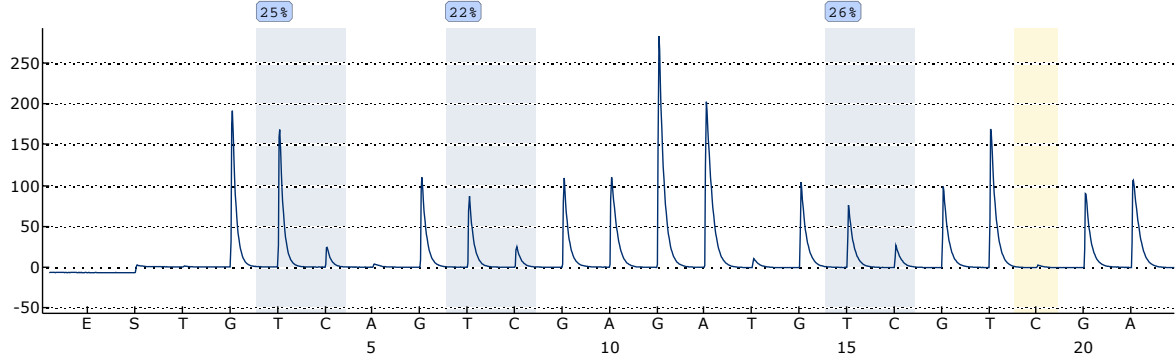
Cas no metilació

B1: GGT YGYGAGGGAAGYGTGAGGATTAGGAAGGGGGTATTGAGTGT



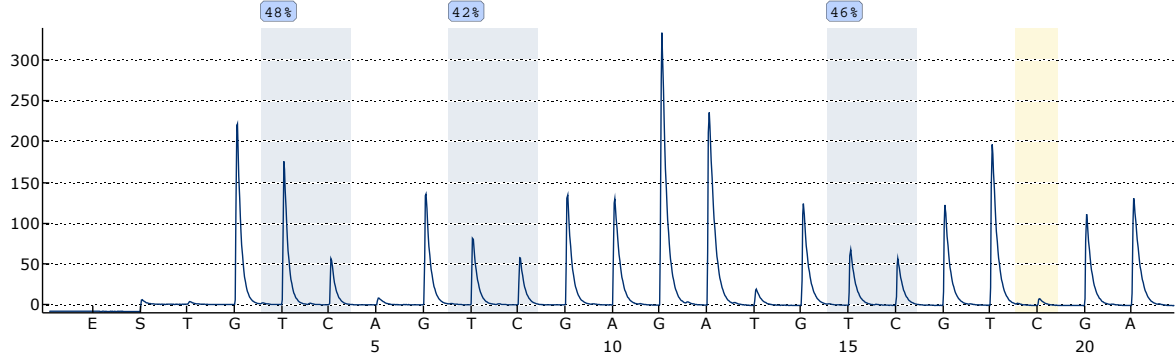
Cas amb metilació del 24,38%

B1: GGT YGYGAGGGAAGYGTGAGGATTAGGAAGGGGGTATTGAGTGT



Cas amb metilació del 45,14%

A1: GGT YGYGAGGGAAGYGTGAGGATTAGGAAGGGGGTATTGAGTGT



Pel que fa a l'estudi d'hipermetilació en estroma no tumoral (11 casos) (Taula 24) s'ha observat que la majoria de casos (91%) no es troben metilats, amb un valor mig de 8,55%, oscil·lant entre 5,64% i 13,24%; amb una desviació estàndard mitja de 0,96, oscil·lant entre 0,19 i 2,21 en aquests casos. Només un cas (9%) ha mostrat hipermetilació de l'estroma amb un grau de 54,38%, amb una desviació estàndard acceptable de 3,8. Mencionar que aquest cas

RESULTATS

amb hipemetilació de l'estroma ha tingut una conversió de bisulfit mínimament incompleta, que posa de manifest un grau major a l'observat en el tumor (de 43,29%), degut a que la diferència observada és només d'unes 10 unitats el cas es segueix considerant metilat perquè si s'ajustes la conversió al grau de metilació obtingut estaria al voltant de 40-45. Taula comparativa dels estromes tumorals estudiats dels casos metilats (Taula 25).

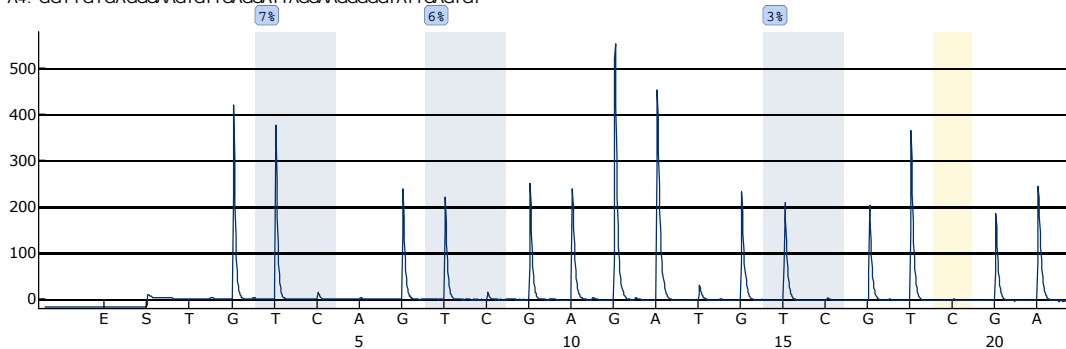
Taula 25: Resultats del grau d'hipermetilació del promotor del gen BRCA1 present en els seus estromes estudiats dels casos metilats amb les seves desviacions estàndards obtingudes

| Grau d'hipermetilació | Desviació estàndard |
|-----------------------|---------------------|
| 12,5% | 0,68 |
| 7,21% | 0,51 |
| 5,64% | 2,07 |
| 7,84% | 0,53 |
| 8,92% | 0,76 |
| 6,05% | 0,86 |
| 54,38% | 3,8 |
| 8,85% | 0,19 |
| 7,5% | 0,93 |
| 13,24% | 0,9 |
| 7,73% | 2,21 |

Imatge 15: Pirogrames d'alguns del estudis d'hipermetilació del promotor del gen BRCA1 en estromes dels casos metilats

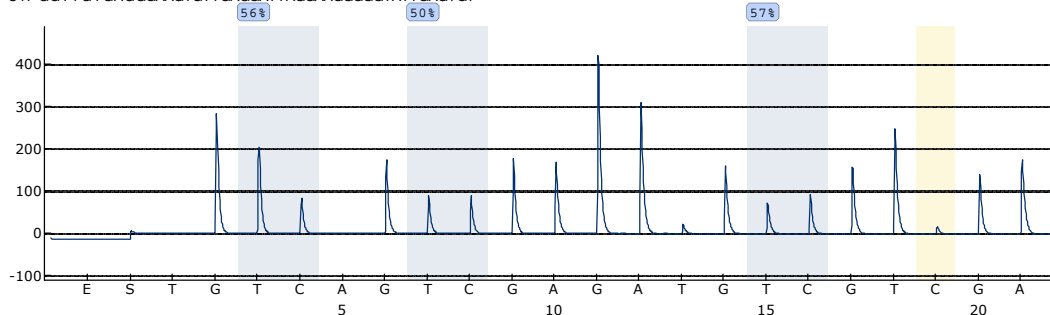
Estroma no metilat (grau d'hipermetilació de 5,64%)

A4: GGTYGYGAGGGAAGYGTGAGGATTAGGAAGGGGGTATTGAGTGT



Estroma metilat d'un 54,38%

C1: GGTYGYGAGGGAAGYGTGAGGATTAGGAAGGGGGTATTGAGTGT



RESULTATS

Taula 26: Resultats del grau d'hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* present en els tumors en comparació amb els resultats obtinguts en els seus estromes estudiats

| Teixit tumoral | Estroma no tumoral |
|----------------|--------------------|
| 42,71% | 12,5% |
| 58,11% | 7,21% |
| 33,59% | 5,64% |
| 29,41% | No estudiat |
| 45,14% | 7,84% |
| 24,38% | 8,92% |
| 36,61% | 6,05% |
| 43,79% | 54,38% |
| 20,67% | No estudiat |
| 43,29% | 8,85% |
| 29,39% | 7,5% |
| 44,06% | 13,24% |
| 42,14% | 7,73% |

Els resultats globals de la presència de les diferents alteracions moleculars que s'han trobat en la nostra cohort de pacients amb càncer de mama triple negatiu es mostren en la Taula 26. Mencionar que només s'ha trobat un cas en que coexisteixen dues de les alteracions moleculars estudiades, que correspon a una hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* amb una mutació del gen *PIK3CA* de l'exó 20 (Taula 27).

Taula 27: Paràmetres moleculars dels càncers de mama triple negatius de la sèrie (N=60)

| Estudi molecular | Resultat | Nº casos | % casos |
|-------------------------------|----------------|----------|---------|
| <i>EGFR</i> | Mutat | 0 | 0% |
| | Wild-type | 60 | 100% |
| Metilació <i>BRCA1</i> | Hipermetilació | 13 | 21,67% |
| | No metilació | 47 | 78,33% |
| <i>PIK3CA</i> | Mutat | 6 | 10% |
| | Wild-type | 54 | 90% |

RESULTATS

Taula 28: Relació dels resultats moleculars en tots els casos de la sèrie (N=60)

| MUTACIÓ EGFR | MUTACIÓ PIK3CA | METILACIÓ BRCA % |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------|
| WT | WT | NEG 5,57 |
| WT | WT | POS 42,71 |
| WT | WT | NEG 6,66 |
| WT | WT | NEG 1,21 |
| WT | WT | NEG 2,62 |
| WT | WT | NEG 3,02 |
| WT | WT | NEG 4,59 |
| WT | WT | NEG 6,1 |
| WT | WT | POS 58,11 |
| WT | WT | NEG 2,71 |
| WT | WT | POS 33,59 |
| WT | WT | NEG 3,93 |
| WT | Exó 20 p.H1047L c.3140 A>T 43% | NEG 3,34 |
| WT | WT | NEG 2,15 |
| WT | WT | NEG 6,26 |
| WT | WT | NEG 2,26 |
| WT | WT | NEG 2,37 |
| WT | WT | NEG 2,77 |
| WT | WT | NEG 2,69 |
| WT | WT | POS 29,41 |
| WT | WT | NEG 3,54 |
| WT | WT | NEG 2,07 |
| WT | WT | POS 45,14 |
| WT | WT | NEG 2,29 |
| WT | WT | NEG 1,39 |
| p.G719A (18%, exó 18) – WT | WT | NEG 2,2 |
| WT | WT | NEG 3,68 |
| WT | WT | NEG 1,61 |
| WT | Exó 20 p.H1047R c.3140 A>G 26% | NEG 1,41 |
| WT | WT | POS 24,38 |
| WT | WT | NEG 3,88 |
| WT | WT | NEG 2,67 |
| WT | Exó 9 p.E524Kc.1624 G>A 15% C – T | NEG 2,24 |
| WT | Exó 20 p.H1047R c.3140 A>G 36% | POS 36,61 |
| WT | WT | NEG 3,21 |
| WT | Exó 20 p.H1047R c.3140 A>G 56% | NEG 2,27 |
| WT | WT | NEG 3,52 |
| WT | WT | POS 43,79 |
| WT | WT | NEG 4,7 |
| WT | WT | POS 23,1 |
| WT | WT | NEG 3,14 |
| WT | WT | NEG 3,51 |
| WT | WT | NEG 3,08 |
| WT | Exó 9 p.E545K c.1633 G>A 32% C-T | NEG 3,49 |
| WT | WT | NEG 3,42 |
| WT | WT | NEG 3,22 |
| WT | WT | NEG 9,18 |
| WT | WT | NEG 3,08 |
| WT | WT | NEG 3,36 |
| WT | WT | NEG 2,44 |
| WT | WT | POS 43,29 |
| p.L858R (8%, exó 21) – WT | WT | NEG 1,09 |
| WT | WT | POS 29,39 |
| WT | WT | NEG 3,25 |
| WT | WT | POS 44,06 |
| WT | WT | NEG 2,63 |
| WT | WT | NEG 4,74 |
| WT | WT | NEG 3,4 |
| WT | WT | NEG 3,68 |
| WT | WT | POS 42,14 |

WT: "Wilde tipa" o absència de mutació; NEG: negatiu o absència d'hipermetilació; POS: positiu o presència d'hipermetilació.

RESULTATS

CORRELACIÓ DE TOTS ELS RESULTATS

En correlacionar els diversos resultats obtinguts en les diferents tècniques immunohistoquímiques i moleculars realitzades es poden observar varies coexpressions que tot seguit especificuem.

En relacionar els casos amb mala evolució pel càncer de mama, és a dir, que hagin mort o desenvolupat metàstasis per a càncer de mama, amb els resultats immunohistoquímics de marcadors basals estudiats (CK5/6 i EGFR) i la possible presència de mutacions del gen *BRCA1* (Taula 28), s'observa que un 90% (9/10) mostren positivitat per un o els dos marcadors basals i que només en dos d'aquests casos es va estudiar la possible presència de mutació patogènica de *BRCA1*, observant-la mutació en un d'ells (els 8 casos restants amb mala evolució clínica no tenien l'estudi realitzat). Mencionar que, de la resta de casos un 68% (34/50) també van mostrar expressió d'un o els dos marcadors basals, sense associar-se a mala evolució clínica.

Taula 29: Relació d'algunes dades dels pacients morts per càncer de mama i els resultats dels estudis immunohistoquímics de CK5/6 i EGFR

| Tumor CDI NOS | Data diag | Data mort | SPV (mesos) | CK5/6 | EGFR | BRCA mutat |
|---------------|-----------|-----------------|-------------|-------|------|--------------|
| Grau III | Jul-07 | Jul-12 | 48 | Neg | Neg | NS |
| Grau III | Oct-08 | Ago-09 | 10 | Neg | Pos | NS |
| Grau III | Nov-09 | Set-13 | 46 | Pos | Pos | <i>BRCA1</i> |
| Grau III | Dec-10 | Dec-13 | 36 | Pos | Pos | NS |
| Grau III | Set-06 | Gen-12 | 64 | Pos | Neg | NS |
| Grau III | Gen-07 | Ago-08 | 19 | Neg | Pos | NS |
| Grau III | Maig-07 | Juny-12 | 61 | Pos | Pos | NS |
| Grau III | Set-07 | Març-12 | 54 | Pos | Pos | NS |
| Grau I | Abr-08 | Metàstasis 2012 | 92 | Neg | Pos | No inf |
| Grau III | Oct-11 | Dec-13 | 23 | Pos | Pos | NS |

Diag: diagnòstic; SPV: supervivència; Neg: negatiu o absència d'expressió; Pos: positiu o expressió immunohistoquímica present; NS: no estudiat; No inf: absència de mutació patogènica coneguda.

En mirar si s'observa relació entre els casos amb mutació patogènica de *BRCA* coneguts i l'estat dels marcadors immunohistoquímics basals realitzats (Taula 29), s'observa que en un 80% (4/5) dels casos s'acompanyen d'expressió de CK5/6 i/o EGFR. Mencionar, que l'únic cas que mostra absència d'expressió de marcadors basals es tracta del cas amb mutació patogènica de *BRCA2*.

RESULTATS

Taula 30: Estat d'expressió dels marcadors basals immunohistoquímics estudiats en els casos amb mutació patogènica de *BRCA* coneguda

| Mutació | <i>BRCA1</i> VSI | <i>BRCA1</i> exó 11 | <i>BRCA1</i> Framship | <i>BRCA1</i> Gran deleció | <i>BRCA2</i> |
|---------|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|--------------|
| CK5/6 | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg |
| EGFR | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg |

VSI: variant de significat incert; Pos: positiu o presència d'expressió immunohistoquímica; Neg: negatiu o absència d'expressió immunohistoquímica.

Malgrat el 53.33% dels casos mostren sobreexpressió immunohistoquímica d'EGFR en qualsevol grau (és a dir, major a un 1% de les cèl·lules neoplàsiques), en cap dels casos s'ha detectat mutació activadora del gen *EGFR* en els exons estudiats.

En comparar els casos amb presència d'hipermetilació de la regió promotora del gen *BRCA1* i mutació en l'estudi de línia germinal del gen *BRCA1*, s'observen que 2 dels 60 casos (3,33%) tenen les dues alteracions, corresponents a un grau d'hipermetilació de 42,71% amb una mutació de variant de significat incert *BRCA1*f 156 vsi (mutació vsi) i un grau d'hipermetilació de 58,11% amb una mutació *BRCA1* F 35 (mutació nonsense) (Taula 30).

Quan s'associen els casos amb mutació del gen *PIK3CA* i l'expressió immunohistoquímica dels receptors d'andrògens, s'observa que 3 dels 60 casos (5%) de tota la cohort tenen les dues alteracions. Això correspon a un 50% (3/6) dels casos amb mutació del gen *PIK3CA* i a 42,86% (3/7) dels casos amb receptors d'andrògens positius. Aquests tres casos corresponen a mutacions en l'exó 20 (una p.H1047L i dues p.H1047R) i amb una expressió nuclear de receptors d'andrògens destacable (intensa en un 80%, moderada en un 75% i intensa en el 98% de cèl·lules neoplàsiques, de cada un dels casos) (Taula 31).

En mirar les característiques clinicohistològiques i immunohistoquímiques més rellevants en els casos amb expressió de receptors d'andrògens (RA+ >30% independent de la intensitat) no s'observen relacions significatives (Taula 32).

RESULTATS

Quan s'associen les alteracions dels resultats moleculars observades amb resultats immunohistoquímics i dades clíniques tampoc s'observen relacions significatives.

Taula 31: Característiques clinicopatològiques i immunohistoquímiques en els casos amb hipermetilació del promotor del gen BRCA1

| Grau hipermetilació BRCA1 | Estudi mutacional BRCA | Edat diag | Tipus i grau histològic | SPV (mesos) | KI67 | CK5 | EGFR | RA |
|---------------------------|------------------------|-----------|--------------------------|-------------------|------|-----|------|-----|
| 42,71% | MUTAT | 24 | CDI NOS III | 86 | A | 2 | 1 | Neg |
| 58,11% | MUTAT | 39 | CDI NOS III | 89 | B | 3 | 2 | Neg |
| 33,59% | NS | 76 | CDI NOS III | 48 | A | 0 | 0 | Neg |
| 29,41% | NS | 68 | CDI NOS III | 36 mort per mama | A | 3 | 1 | Neg |
| 45,14% | NS | 60 | CDI NOS II | 117 | A | 2 | 0 | Neg |
| 24,38% | NS | 38 | Car medul·lar atípic III | 112 | A | 2 | 3 | Neg |
| 36,61% | NS | 44 | Car metaplàstic III | 84 | A | 2 | 0 | Neg |
| 43,79% | NS | 55 | CDI NOS III | 103 | A | 0 | 0 | Neg |
| 20,67% | NS | 59 | CDI NOS III | 102 | A | 0 | 0 | Neg |
| 43,29% | NS | 70 | Car medul·lar III +CID | 96 | A | 0 | 0 | Neg |
| 29,39 | NS | 27 | Car medul·lar III | Desconeix | A | 1 | 0 | Neg |
| 44,06 | NS | 90 | CDI NOS III +CID | 13 (mort no mama) | A | 2 | 1 | Neg |
| 42,14 | NS | 72 | CDI NOS III | 23 mort per mama | M | 2 | 2 | Neg |

Diag: diagnòstic; SPV: supervivència; NS: no estudiat; CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; Car: carcinoma; CID: carcinoma intraductal; Neg: negatiu o absència d'expressió.

RESULTATS

Taula 32: Característiques clinicopatològiques i immunohistoquímiques en els casos amb mutació en algun dels exons estudiats del gen PIK3CA

| PIK3CA | RA | Edat | Grau i tipus Histològic | SPV | KI67 | CK5 | EGFR |
|---|-----|------|--|--|------|-----|------|
| Exó20 p.H1047L c.3140 A>T 43% | Pos | 83 | Car metaplàstic III + CID necrosi | 61 (mort no mama) | M | 0 | 2 |
| Exó 20 p.H1047R c.3140 A>G 26% | Pos | 62 | CDI NOS III | 112 (nou CDI contralat, RH, 7 anys després) | A | 0 | 3 |
| 9-542 T 15% p.E524Kc.1624 G>A | Neg | 71 | CDI NOS III preQT | 19 mort per mama | A | 0 | 3 |
| Exó 20 p.H1047R c.3140 A>G 36% | Neg | 44 | Car metaplàstic productor matriu III | 84 (pèrdua seguiment) | A | 2 | 0 |
| Exó 20 p.H1047R c.3140 A>G 56% | Pos | 53 | CDI NOS III | 106 | A | 0 | 0 |
| 9-545 mutat C-T 32% p.E545K c.1633 G>A | Neg | 51 | CDI NOS III +CID Angiolimf | 102 | A | 0 | 3 |

Diag: diagnòstic, SPV: supervivència; Neg: negatiu o absència d'expressió; CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; Angiolimf: angiolimfàtica present; CID: carcinoma intraductal; preQT: quimioteràpia prèvia a cirurgia.

Taula 33: Característiques clinicopatològiques i immunohistoquímiques en els casos amb expressió de receptors d'andrògens (RA>30%)

| Edat diag | Grau i tipus histològic | Necrosi | pT | Ganglis | SPV (mesos) | PIK3CA | BRCA | KI67 | CK5 |
|-----------|------------------------------------|---------|----------|---------|---|--------|-----------|------|-----|
| 93 | CDI NOS III | Neg | pT4d | NS | 10 mort per mama | Neg | NS | A | 0 |
| 83 | Car metaplàstic +CID necrosi | Neg | pT2 | 0/2 | 61 mort no mama | Mutat | NS | M | 0 |
| 62 | CDI NOS III | Neg | pT2 | 0/34 | 112 (Nou contralat CDI RH+, 7anys) | Mutat | NS | A | 0 |
| 53 | CDI NOS III | Min | pT2 | 0/6 | 106 | Mutat | NO inf | A | 0 |
| 72 | CDI II micropapil·lar | Neg | pT2 | 7/12 | 103 | Neg | NS | B | 0 |
| 64 | CLI II | Mod | pT1a | NS | 97 (Antec ipsilat CDI RPG+, 12anys) | Neg | NS | A | 0 |
| 40 | CDI NOS III +CID necrosi | Neg | M pT1 | 1/15 | 54 mort per mama | Neg | NS | A | 2 |

Diag: diagnòstic, SPV: supervivència; Neg: negatiu o absència; CDI NOS: carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic; Car: carcinoma; CID: carcinoma intraductal; CLI: carcinoma lobel·lar infiltrant; Neg: negatiu o absència; Min: mínima; Mod: moderada; NS: no estudiats; Contralat: contralateral; Ipsilat: ipsilateral; antec: antecedent; RH: receptors hormonals; RPG: receptors de progesterona; Pos: positiu; No inf: no informatiu.

RESULTATS

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

DISCUSSION

El càncer de mama és una malaltia heterogènia a nivell morfològic, clínic i biològic amb diferents subgrups. El recent interès en el subtipus conegut com a càncer de mama triple negatiu (TNBC), al qual li manca l'expressió de receptors hormonals (d'estrògens i progesterona) i d'Her2, i que oscil·la aproximadament entre el 10-17% dels càncers de mama (en algunes sèries aquests percentatges es troben en un rang més ampli entre 6-28%, en part probablement influenciades al llindar utilitzat per a considerar l'absència d'expressió de receptors hormonals d'estrògens i progesterona), ha despertat el nostre interès en intentar veure que passava amb les pacients amb TNBC diagnosticades en el nostre servei.

Es tracta d'un estudi retrospectiu que mostra els resultats de la nostra cohort, els quals sabem que estan subjectes a un biaix, degut a la naturalesa retrospectiva i a la petita mida de la mostra, malgrat tot en relacionar els resultats obtinguts en la nostra cohort de pacients amb TNBC i els resultats descrits en la literatura, sobretot centrant-nos en algunes sèries (**Bauer, 2007; Viale, 2009; Spitale, 2009; Thike, 2010; Elsayaf, 2013**) (Taula 33), s'han trobat valors en general superposables, que tot seguit es descriuen en detall.

En relació a les dades clíniques i quirúrgiques, mencionar que en la nostra cohort s'ha observat una afectació mamària amb discret predomini en mama esquerra (53,33% mama esquerra versus 46,67% mama dreta), sent aquest valor similar al descrit en la sèrie Suïssa de carcinomes a mama esquerra en el 58,9% versus el 41,1% de mama dreta (**Spitale, 2009**), probablement aquesta coincidència és anecdòtica.

Per una banda, pel que fa a l'abordatge quirúrgic local realitzat, tal i com és d'esperar, predomina la cirurgia conservadora, havent-se realitzat en la nostra cohort un 75% de tumorectomies versus el 23,33% de mastectomies, sent aquests valors pròxims a la sèrie Italiana (**Viale, 2009**) en la que un 83,1% van ser sotmeses a tumorectomia versus un 16,9% que van ser sotmeses a mastectomia.

DISCUSSION

Per altra banda, el resultat de l'estudi axil·lar és freqüentment negatiu, és a dir, predomina l'absència de metàstasis ganglionars axil·lars, sent els nostres valors d'absència de metàstasis en un 65% de la cohort versus la presència de metàstasis en un 21,7%, resultats similars als descrits en la sèrie Alemanya (**Elsawaf, 2013**) d'un 60% de casos amb ganglis negatius versus al 38% de casos amb ganglis metastàtics.

El TNBC freqüentment es diagnostica en dones joves (≤ 50 anys) (**Viale, 2009; Thike, 2010**), malgrat tot, en la nostra cohort només un 28,33% de les pacients tenien una edat menor o igual a 50 anys en el moment del diagnòstic, concretament s'han diagnosticat un 10% de les pacients en edat menor de 40 anys i un 18,33% en edat compresa entre els 40 i 50 anys.

A nivell anatomopatològic, els TNBC tenen un gran diàmetre tumoral, major grau d'indiferenciació, major índex proliferatiu, freqüent necrosi central i són predominantment de subtipus ductal (**Riccardi, 2015**); sent algunes d'aquestes característiques presents en la nostra cohort.

La majoria dels tumors són de tipus histològic carcinoma ductal infiltrant de tipus no específic (CDI NOS) en un 68,33%, seguit de carcinomes de tipus medul·lar (medul·lar pur, atípic o amb trets medul·lars) només en un 20%, aproximant-se aquests resultats a les dades descrites en la literatura on el 70% són CDI NOS i fins un 21,96% són carcinomes medul·lars o medul·lars atípics (**Zhang, 2013**).

Així mateix, la majoria de carcinomes són d'alt grau histològic (un 85% són pobrament diferenciats – grau III), tal i com es descriu en algunes sèries, on aproximadament tres quartes parts de les cohorts són carcinomes pobrament diferenciats (**Bauer, 2007; Viale, 2009; Thike, 2010**).

Ara, si fem referència a la mida tumoral i la necrosi, aproximadament la meitat de casos són major de 20 mm (45%) i l'altra meitat són menor o igual a 20 mm (46,67%). En la literatura hi ha discrepància en la mida tumoral predominant, sent els nostres resultats més similars a les sèries Europees (**Viale, 2009; Spitale, 2009**), que no en la sèrie Japonesa (**Thike, 2010**). Igual que aproximadament la meitat dels casos de la nostra cohort mostren algun focus de necrosi (46,67%) i l'altra meitat no mostren cap àrea de necrosi (53,33%); aproximant-se aquests resultats més a la sèrie Alemanya (**Elsawaf, 2013**) on al

DISCUSSIÓ

voltant de la meitat dels casos tenen necrosi i l'altre no; que no pas a altres sèries, com la Italiana o la Japonesa (Viale, 2009; Thike, 2010), on predomina la necrosi.

Taula 34: Comparativa de diversos paràmetres clinicopatològics descrits en diferents sèries amb pacients amb càncer de mama triple negatiu

| Paràmetres clinicopatològics | | Nostra cohort | Bauer 2007 | Spitale 2009 | Viale 2009 | Thike 2010 | L-Medina 2011 | Elsawaf 2013 |
|------------------------------|--------------|---------------|------------|--------------|------------|------------|---------------|--------------|
| País | | Espanya | Califòrnia | Suïssa | Itàlia | Singapur | Mèxic | Alemanya |
| Nºpacients | | 60 | 6370 | 90 | 284 | 653 | 469 | 142 |
| Edat | Mitja (anys) | 59,2 | 54 | 58,5 | | 53 | 49,2 | 53 |
| | <40 anys | 10% | 12,2% | 11,1% | 51,8% | 15% | | |
| | 40-50 anys | 18,3% | 24,4% | 24,4% | | 30% | | |
| | >50 anys | 71,7% | 63,4% | 64,5% | 48,2% | 54% | | |
| | Es desconeix | | | | | 1% | | |
| Mida tumor | Mitja (mm) | 22,7 | 22 | 26 | | 29 | | |
| | ≤ 20 mm | 46,7% | | 48,1% | 45,1% | 26% | | 87,3% |
| | >20 mm | 45% | | 51,9% | 53,8% | 70% | | 12,7% |
| | Es desconeix | 8,3% | | | 1,1% | 4% | | |
| Subtipus | CDI NOS | 68,3% | | 91,9% | | 92% | 85,3% | 85% |
| | Medul·lar | 20% | | 1,1% | | 2% | 14,7% | 15% |
| | Altres | 11,7% | | 7% | | 6% | | |
| Grau histològic | I | 3,3% | 3,1% | 24,1% | 0,7% | 2% | 4,1% | 16% |
| | II | 10% | 15,7% | | 8,8% | 20% | 17,5% | |
| | III | 85% | 76,3% | 75,9% | 84,9% | 70% | 78,5% | 84% |
| | Es desconeix | 1,7% | 4,9% | | 5,6% | 1% | | |
| Necrosi | Present | 46,7% | | | 63,3% | 98% | | 48,6% |
| | Absent | 53,3% | | | 36,6% | 2% | | 48,6% |
| | Es desconeix | | | | | | | 2,8% |
| Angiolimfàtica | Present | 13,6% | | 11,1% | 24,3% | 29% | 36,1% | |
| | Absent | 86,4% | | 88,9% | 74,6% | 71% | 63,9% | |
| | Es desconeix | | | | 1,1% | | | |
| Ganglis axil·lars | Negatiu | 65% | | 51,1% | 58,5% | 49% | | 60% |
| | Positiu | 21,7% | | 37,7% | 40,5% | 40% | | 38% |
| | Es desconeix | 13,3% | | 11,2% | 1% | 11% | | 2% |

Se sap que són infreqüents la presència d'imatges d'invasió, tal i com es reflecteix en les diverses sèries; troballa concordant en la nostra cohort, on només 13,33% i 5% mostren imatges d'invasió angiolimfàtica i perineural, respectivament.

DISCUSSIÓ

El càncer de mama triple negatiu té un mal pronòstic amb un curs clínic agressiu, conegut sobretot pel curt temps entre la recaiguda tumoral i la mort, així com la freqüent progressió/recurrencia tumoral amb metàstasi a distància, particularment a nivell visceral (sobretot de pulmó i cervell), per disseminació hematològica, entre el primer i tercer any després del diagnòstic (**Reis-Filho, 2008**). Pel que fa a la nostra cohort, encara que hi ha pocs casos que han progressat un 16,67% (10/60), pràcticament tots (excepte 1) han mort en un interval d'entre menys d'un any i cinc anys. La forma de progressió predominant a sigut la metàstasi a distància (en 8 dels 10 casos, només 2 han mostrat progressió local única), sent la localització més freqüent de les metàstasis visceral, a pulmó i cervell (en 6 dels 8 casos), seguit de metàstasis a os, fetge, ganglis no axil·lars i suprarenal. Només un cas de la cohort ha progressat amb metàstasis òssies, però continua viu, després de 92 mesos de seguiment amb tractaments quimioteràpics.

Malgrat actualment l'únic tractament reconegut és la quimioteràpia sistèmica, s'ha observat que en aquells casos amb quimioteràpia neoadjuvant en que després de la quimioteràpia queda malaltia residual això determina una pitjor supervivència, a diferència dels casos amb resposta patològica completa (**Schneider, 2008**). En la nostra cohort només 5 casos (8,33%) han rebut tractament quimioteràpic previ a la cirurgia, amb estadiatges patològics variables però en general restant una mida tumoral considerable (2 casos amb mides tumorals d'entre 5mm i ≤ 20 mm "ypT1", i 3 casos amb mides tumorals >20 mm "ypT2").

En relació als estudis immunohistoquímics realitzats comentar que, tal i com ja s'ha mencionat, els TNBC són tumors amb alt índex proliferatiu, com per exemple es descriu en la sèrie Suïssa (**Spitale, 2009**), on tres quartes parts de la seva cohort tenen un índex proliferatiu mesurat amb Ki67 major al 20% de les cèl·lules neoplàsiques. En la nostra cohort el percentatge ascendeix una mica més, sent del 83,33%, probablement influenciat pel llindar de tall al 14%. Un valor alt de Ki67 s'associa a pitjor pronòstic i a factors pronòstics adversos (com alt grau histològic, afectació ganglionar i receptors hormonals negatius), considerant-se el seu valor com un important factor pronòstic en la presa de

DISCUSSIÓ

decisiones terapèutiques. Ara, el problema està en la seva marcada variabilitat intra i interobservador, al ser un resultat “patòleg-dependent”, sobretot en els valors intermitjos; sense acostumar-hi a haver problemes en els extrems que determinen els tumors de baix i alt grau. Els últims acords (*Consens de Sant Gallen 2015*) en relació a què s’ha de considerar un índex proliferatiu de Ki67 alt en càncer de mama, semblen posar el llindar al 14%, amb un comentari que “els valors s’han d’adaptar als propis resultats del centre, establint que si la mitjana de Ki67 en un centre és del 20%, la presència de <10% de cèl·lules amb positivitat nuclear per a Ki67 es podria considerar baix grau o més del 30% alt grau, establint així els límits entre baixa i alta activitat proliferativa” **(Coates, 2015)**.

Els carcinomes de mama triple negatius (TNBC) comparteix varies característiques biològiques i clíniques amb els tumors basal-like (BL), encara que no són sinònims i la seva diferència no és sistemàtica, hi ha diversos aspectes rellevants que representen matisos de diferenciació. S’ha de tenir present que el TNBC es una malaltia heterogènia que amaga una altra classificació subsidiària que inclou diverses entitats amb comportaments clínics potencialment diferents, amb diferents històries naturals i sensibilitat a fàrmacs; mentre que el BL és una malaltia amb entitat pròpia, que ja hem après a reconèixer i que probablement la seva descripció seria un primer exemple d’aquesta fragmentació, que probablement no representa més que l’inici d’una evolució descriptiva.

Tal i com estem dient, el solapament entre carcinoma “basal-like” i “triple negatiu” es molt alta, tant des del punt de vista clínic, com morfològic i immunohistoquímic. Mentre que l’expressió en el carcinoma “triple negatiu” és molt clara i es refereix amb l’absència d’expressió immunohistoquímica de receptors hormonals i d’Her2; la definició de carcinoma “basal-like” no és tant clara, ja que en realitat deriva de l’anàlisi de microarrays, però la seva poca aplicació rutinària a creat la necessitat de diferents propostes de marcadors immunohistoquímics per tal de poder-los identificar.

Genèticament es coneix que la correlació no es completa entre els tumors “basal-like” i a través d’expressió d’arrays només el 85% dels TNBC són BL, encara que els dos s’associen a major recurrència i menor supervivència.

DISCUSSIÓ

La prevalença de carcinomes de mama “basal-like” és al voltant del 15% de tots els càncers de mama i s’ha demostrat que l’expressió de queratines basals té un valor pronòstic independent de la mida tumoral, el grau i l’estadi ganglionar, però aquest pronòstic no es manté quan es compara amb altres tumors d’alt grau negatius per a receptors hormonals sense fenotip basal **(GEICAM, 2010)**.

Des del punt de vista immunohistoquímic BL es caracteritza per un perfil “immunohistoquímic de triple negatiu” al que se li suma l’expressió de determinats marcadors basals, motiu pel qual en els últims anys s’estan intentant crear panells per a diferenciar-los. Alguns simplement formats per CK basals, altres CK5/6 i EGFR, altres afegint marcadors com la vimentina o marcadors de cèl·lules mioepitelials (com l’actina de múscul llis i CD10), però la gran diversitat en els seus resultats, el poc coneixement del seu significat i la manca d’acord, fa que el terme patològic definit immunohistoquímicament de “fenotip basal-like” no hagi d’impactar en la decisió clínica terapèutica **(Livasy, 2006; Rakha, 2009)**.

La caracterització dels tumors tipus “basal-like” parteix d’estudis en la dècada dels 80 i principis dels 90 que van posar per primer cop de manifest la presència d’un grup de carcinomes de mama amb expressió de citoqueratines basals (CK5 i CK14) i vimentina. *Palacios* va descriure un grup de carcinomes ductals d’alt grau, amb absència d’expressió de receptors hormonals i d’expressió de catenina P (marcador de cèl·lules basals), que, a més, mostraven un patró de creixement característic, amb una zona central de necrosi i/o elastosi rodejada per ribet perifèric de cèl·lules neoplàsiques. Aquests tumors presentaven expressió de marcadors mioepitelials i mal pronòstic, amb predisposició a major disseminació hematògena amb metàstasis pulmonars i cerebrals, que no pas a ganglis axil·lars i os. Els estudis de microarrays mostraven com aquest grup de tumors expressaven gens que normalment s’expressen en cèl·lules basals i mioepitelials de la mama normal. Al 2004 *Nielsen* proposa un panell limitat format per RE, RPG i Her2 negatius amb positivitat per CK5/6 i/o EGFR. Al 2008 *Reis-Filho* descriu que no tots els carcinomes BL són TNBC ni no tots els TNBC són BL, de manera que quan s’estudien les citoqueratines basals en els TNBC només un 56-84% dels mateixos les expressen, tenint aquests una supervivència lliure de malaltia

DISCUSSION

sensiblement més curta que en els TNBC sense diferenciació basal; i permeten així identificar un subgrup de carcinomes amb fenotip basal-like i característiques biològiques diferents del grup general de TNBC, amb un pronòstic més agressiu i amb diferent predisposició de resposta a determinades quimioteràpies.

A més, de les citoqueratines basals i EGFR, el carcinoma "basal-like" dins del grups de TNBC s'associa a expressió de gens de proliferació i des del punt de vista immunohistoquímic, també hi ha diferències significatives en quan a l'expressió de marcadors de proliferació (Ki67) i la mutació de *p53*, que són més alts i més freqüent en el carcinoma BL que en els TNBC (**GEICAM, 2010**).

En la nostra cohort s'ha observat que un 73,33% (44/60) dels càncer de mama triple negatius són basal-like per expressió immunohistoquímica de CK5/6 i/o EGFR, sent aquest valor aproximat al descrit en la literatura, de que entre el 60-70% de TNBC són BL (**Tilch, 2014; Sood, 2014**). S'ha vist que normalment els TNBC que expressen CK5/6 i EGFR (marcadors immunohistoquímics de cèl·lules basals) es relacionen amb un mal pronòstic i freqüent associació a *BRCA* mutats. En la nostra sèrie en relacionar les 9 pacients mortes per càncer de mama amb els marcadors basals, només un 11,1% (1/9) pacients no expressava cap dels dos macadors, un 33,3% (3/9) n'expressaven un dels dos marcadors i un 55,6% (5/9) expressaven els dos marcadors basals; mentre que en relacionar-ho amb a la presència de mutació del gen *BRCA1* només una de les pacients mortes tenien la mutació.

En desglossar els nostres resultats per les diferents positivitats immunohistoquímiques s'observa que de les 60 pacients amb càncer de mama triple negatiu tenen un fenotip tipus "basal-like" per l'expressió només de CK5/6 (positivitat $\geq 5\%$ de cèl·lules neoplàsiques) un 55% (33/60), per l'expressió només d'EGFR (grups 1, 2 i 3+, positivitat $>1\%$ de cèl·lules neoplàsiques) un 53,33% (32/60), per la coexpressió de CK5/6 i EGFR un 35% (21/60) i per l'expressió d'un o els dos marcadors basals un 73,33% (44/60). En comparar aquests percentatges amb els descrits en la literatura, s'observa una gran diversitat de resultats, oscil·lant aproximadament entre 30 i 90% de casos positius en algun dels dos marcadors immunohistoquímics (Taula 34). Probablement una de les principals explicacions deu radicar en la manca

DISCUSSIÓ

d'estandardització i d'acord en a partir de quin llindar i tipus d'expressió immunohistoquímica s'ha de considerar un cas positiu per a CK5/6 i EGFR

Taula 35: Percentatges d'expressió de marcadors basals (CK5/6 i EGFR) en diverses publicacions

| | CK5/6 + | EGFR+ |
|--|---------|--------|
| La nostra cohort | 55% | 53,33% |
| <i>Mod Pathol 2006, Livasy</i> | 61% | 72% |
| <i>The Breast 2007, Siziopikou</i> | 67% | 69% |
| <i>BMC Cancer 2008, Toyama</i> | 52% | 31% |
| <i>BMC Clin Pathol 2012, Kanapathy</i> | 89% | 72% |
| <i>Pathol Res Int 2014, Sood</i> | 61% | 86% |

El receptor d'andrògens (RA) és un membre de la família dels receptors d'esteroides, que s'expressa en més del 70% de càncers de mama i està implicat en la seva patogènesi. Encara que la seva expressió és més freqüent en càncers de mama receptors hormonals positius, al voltant d'un terç dels TNBC són RA positius (**Riccardi, 2015**).

S'observa que normalment els TNBC que expressen RA tenen trets apocrins, s'associen a millor pronòstic, sobretot en estadi precoç, i a una disminució del risc de recidiva, són diagnosticats en pacients de major edat i, a vegades, s'associen a major freqüència de *BRCA1/2* mutat (**Riccardi, 2015**).

En la nostra cohort hem observat una expressió de receptors d'andrògens del 11,67% (7/60), sent aquest valor menor al descrit en la literatura, que es troba al voltant de 21,7% i 26,6% (**Cossu-Rocca, 2015; Riccardi, 2015**), respectivament. L'edat mitja de diagnòstic del càncer de mama triple negatiu amb expressió de receptors d'andrògens de la nostra cohort és de 66,71 anys (oscil·lant entre 40 i 93 anys) i només en una de les pacients s'ha estudiat la possible presència de mutació del gen *BRCA*, sent el resultat no informatiu (és a dir, absència de mutació patogènica coneguda).

Una minoria de càncers de mama es consideren hereditaris (5-10%), i d'aquests aproximadament una quarta part són deguts a mutacions germinals de gens supressors tumorals de càncers com són el *BRCA1* i el *BRCA2*. Tant els TNBC com els càncer de mama amb mutació en línia germinal *BRCA1* són

DISCUSSIÓ

freqüentment de tipus basal i s'associen a mal pronòstic (més d'un 15% de tumors TNBC tenen mutació germinal del gen *BRCA1*) (**Flower, 2015**).

De manera que al voltant d'un 20% de tumors basal-like presenten mutacions germinals en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, podent-se així aquestes beneficiar de tractaments amb inhibidors de PARP i/o tractaments amb esquemes basats amb quimioteràpies de platins (**Prat, 2015**). En la nostra cohort només s'ha estudiat la presència de mutació del gen *BRCA* en un 21,67% (13/60), trobant mutació patogènica coneguda només en un 38,46% d'aquests casos (5/13), observant en 4 d'ells expressió immunohistoquímica d'un o dels dos marcadors basals realitzats en l'estudi. Mencionar, que el cas sense expressió de marcadors immunohistoquímics basals coincideix amb una mutació en el gen *BRCA2*, en lloc de *BRCA1*.

Els estudis actuals intenten avaluar la resposta de tractaments amb inhibidors de la tirosin cinasa d'EGFR en pacients amb càncer de mama triple negatiu, ja que les teràpies hormonals són poc efectives. L'EGFR (receptor de factor epidèrmic tirosin cinasa) s'expressa freqüentment, entre un 30-52% dels TNBC, i pot pujar fins a un 60% en càncers tipus basal-like, associant-se a mal pronòstic (**Siziopikou, 2007; Martin, 2012**). Malgrat això, la resposta a teràpies anti-EGFR no depèn de la seva expressió immunohistoquímica, sinó de la presència de la mutació activadora (com són la deleció de l'exó 19, la substitució L858R de l'exó 21 o rarament, la mutació de l'exó 18) i /o l'amplificació del gen (augment del número de còpies). El problema, es que no s'observa correlació entre els estudis moleculars i els resultats immunohistoquímics (**Reis-Filho, 2008; Jacot, 2011; Teng, 2011**). Encara que algun article, sí que descriuen certa correlació entre la sobreexpressió immunohistoquímics d'EGFR i l'amplificació d'aquest, sense associar-se a presència de mutacions (**Bhargava, 2005**).

Aquesta situació de discordança entre els resultats immunohistoquímics i els resultats moleculars és la que trobem en la nostra cohort, on s'ha observat expressió immunohistoquímica d'EGFR en un 53,33% (32/60) de casos, sense detectar cap mutació activadora d'*EGFR* en els exons estudiats. Trobant així, per una banda, una concordança amb grups europeus, caucàsics i japonesos que publiquen resultats idèntics d'absència de mutacions (**Tilch, 2014; Grob,**

DISCUSSION

2012; Martin, 2012; Jacot, 2011; Toyama, 2008). Mentre, que per l'altra banda, discordança amb el grup de Singapur on troben fins a un 11,4% de mutacions potencialment patogèniques (**Teng, 2011**).

Es planteja si la situació d'aquests resultats discordants podria ser deguda a una influència de factors genètics i ambientals (sobretot geogràfics i ètnics) associats al tipus de pacient estudiat i no tant, al tipus de tumor; ja que aquestes discrepàncies d'estat mutacional també es veuen reflectides en el càncer de pulmó no cèl·lula petita, entre població d'Àsia de l'est i caucàsica. De manera que, malgrat es coneix una teràpia dirigida per la mutació activadora d'*EGFR* més comú que es troba en altres càncers, la troballa d'aquesta mutació no coexisteix o és molt rara en càncer de mama triple negatiu o basal-like (**Tilch, 2014; Jacot, 2011**).

La via de senyalització de Pi3K/AKT és la via més recurrentment alterada en càncer de mama, encara que la mutació del gen *PIK3CA* és més prevalent en càncers de mama receptors hormonals positius 35% i Her2 positiu 23%, no és despreciable en càncers de mama triple negatiu, on el seu rang oscil·la entre 5-13% (**Cossu-Rocca, 2015**), sent la segona mutació més freqüentment descrita en TNBC, després de la p53, que s'observa en el voltant d'un 68% de TNBC (**Lehmann, 2015**).

El 80% de les mutacions somàtiques del gen *PIK3CA* succeeixen en tres "hotspots", dos situats en els codons 542 i 545 del domini hèlix de l'exó 9 i un en el codó 1047 del domini cinasa de l'exó 20 (**Baker, 2012**), amb predomini de les mutacions en el domini H1047R de l'exó 20. Els autors comenten que la presència de mutacions en el gen *PIK3CA* es relaciona amb un bon pronòstic i millora de la supervivència, altres no veuen efecte significatiu i inclòs altres comenten que les mutacions de l'exó 9 són independents del pronòstic però que les de l'exó 20 es relacionen amb un millor pronòstic (**Cizkova, 2012; Barbareschi, 2007**).

En la nostra cohort s'ha trobat la mutació del gen *PIK3CA* en un 10% (6/60) de casos, sent en un 66,67% (4/6) en el domini cinasa de l'exó 20 codó H1047 (3 en H1047R i 1 H1047L) i un 33,33% (2/6) en l'exó 9, un en el codó 542 i l'altre en el codó 545. Sent aquests valors similars als descrits en la literatura on troben mutació del gen *PIK3CA* en els TNBC al voltant del 8%, 9,8%, 12,5% i

DISCUSSION

16,8% en diverses sèries de pacients de Texas i Perú, americans de Vanderbilt, europeus de França i caucàsics d' Austràlia, respectivament **(Santarpia, 2012; Lehmann, 2015; Cizkova, 2012; Tilch, 2014)**, sent més freqüentment en el domini cinasa H1047R de l'exó 20, al voltant del 70%, 90% i 44% dels casos **(Cossu-Rocca, 2015; Lehmann, 2015; Tilch, 2014)**. De les pacients amb mutació del gen *PIK3CA* un 16,67% (1/6) ha recaigut, amb mutació situada en domini H1047R de l'exó 20; i un 33,33% (2/6) han mort, amb mutacions una situada en el domini H1047L de l'exó 20 i l'altre en el codó 542 de l'exó 9. De manera, que la valoració de si la presència i/o situació de la mutació pot influenciar en el pronòstic en les pacients de la nostra cohort, queda una mica en dubte perquè malgrat el 50% (3/6) han tingut un bon pronòstic, les de mal pronòstic han mostrat variabilitat en la localització de la mutació; probablement influenciat pel petit nombre de casos.

En 3 casos s'ha trobat coexpressió de Receptors d'Andrògens i mutació de *PIK3CA*; observant que el un 42,86% (3/7) dels casos amb expressió de receptors d'andrògens presenten mutació del gen *PIK3CA*, sent aquesta associació similar al que es descriu en la literatura, on en els casos de TNBC amb RA positius la presència de mutació de *PIK3CA* pot augmentar fins a un 40% versus el 4% en casos RA negatius **(Lehmann, 2014)**.

S'observa major incidència de metilació de *BRCA1* en càncers d'alt grau histològic, amb fenotips triple negatius, es correlaciona amb expressió de citoqueratines basals i juga un paper significatiu en la patogènesis dels càncers de mama basal-like esporàdics. A més, la similitud genètica amb els càncers de mama portadors de mutacions germinals *BRCA1* pot plantejar si la terapèutica utilitzada en aquests podria ser útil en els càncers esporàdics metilats **(Bal, 2012)**.

S'ha descrit la presència de metilació en el promotor del gen *BRCA1* entre un 11-32% de càncers de mama esporàdics **(Bal, 2012)** i un 30% de càncers de mama esporàdics triple negatius **(Sharma, 2014)**, sent en algunes sèries al voltant del 35% en TNBC **(Bal, 2012)** i que pot augmentar fins a un 60% en TNBC de tipus medul·lar i metaplàstic amb fenotip basal-like **(Badve, 2011; Reis-Filho, 2008)**.

DISCUSSIÓ

En la nostra cohort s'ha trobat un 21.67% (13/60) de casos amb hipermetilació del promotor del gen *BRCA1*, sent aquest valor menor al descrit en la literatura. Al concretar amb subtipus medul·lar s'observa que 3 dels 13 casos metilats són carcinomes "medul·lars", sent un 23,1% dels metilats de tipus medul·lar (3/13) o un 25% dels medul·lars estan metilats (3/12). Mencionar que no està descrit ni estandaritzat un llindar a partir del qual es considera un cas hipermetilat, degut a que l'objectiu d'aquests estudis només és determinar el grau de metilació d'una regió de l'ADN i no es pot saber si aquest grau produeix amb total seguretat la no expressió d'aquest gen. Es necessiten estudis addicionals d'expressió i altres per definir quin és el grau d'hipermetilació que produeix efectivament la pèrdua d'expressió gènica.

En estudiar els estromes mamaris no neoplàsics dels casos hipermetilats, s'ha trobat que només un dels casos (9%) mostra un grau d'hipermetilació similar al de la mostra tumoral. En la literatura trobem un article antic en que parla de l'absència de metilació aberrant en el teixit mamari normal (de línies cel·lulars i sang perifèrica) estudiat en pacients amb càncer de mama metilats receptors hormonals negatius (**Catteau, 1999**); mentre que altres articles més recents parlen de que s'observa hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* entre 8,3-22% de parènquima mamari normal de pacients amb càncer de mama metilat, trobant valors mitjos de metilació al voltant del 34% en els càncers i del 9,25% en el parènquima normal (**Otani, 2014; Cai, 2016**). Mencionar que en comparar-ho amb la literatura no estranya la possibilitat de trobar algun estroma metilat, però potser si que crida l'atenció que el grau de metilació obtingut en l'estroma és similar al del tumor i no menor, com es descriu ens les publicacions. En aquest cas hagués sigut interessat conèixer si existeix alguna mutació patogènica del gen *BRCA* però es tracta d'una de les pacient no estudiada.

Només en dos casos de la nostra cohort, coexisteix una hipermetilació del promotor del gen *BRCA1* amb mutació en línia germinal del gen *BRCA1*, sent aquestes mutacions una "mutació variant significat incert *BRCA1F 156 vsi*, de l'exó 12 del gen" i una "mutació *BRCA1 F 35 positiu*, de l'exó 11". En la literatura es descriu que els perfils de metilació dels tumors *BRCAX* (wild-type, però que han de ser família *BRCA* o amb variant de significat incert) són molt similars als càncers esporàdics (**Flower, 2015**); descriu dos casos amb

DISCUSSIÓ

metilació del promotor (>10% per piroseqüenciació), un *BRCA1x* (molt propera a una mutació *BRCA1* patogènica) i una variant de significat incert (*BRCA1* VSI 9+16C>G), sense haver-se pogut estudiar el teixit mamari normal no tumoral per a compara si les variacions genètiques influeixen en el teixit normal. De manera, que encara no està clar si la metilació del promotor *BRCA1*, que és molt heterogènia en les cèl·lules tumorals, influeix de la mateixa manera que les mutacions patogèniques en línia germinal ni se sap realment el seu significat; de moment només se s'està observant que la seva presència pot ser un indicador de resposta a tractament amb fàrmacs que danyen l'ADN, com els inhibidors de PARP, igual que succeeix en les pacients amb càncer de mama portadores de mutació del gen *BRCA* (**Flower, 2015**).

El càncer de mama està constituït per un grup de malalties heterogènies, i dins d'aquesta heterogenicitat el càncer de mama triple negatiu està format per un conjunt d'entitats amb diferents comportaments, històries naturals i respostes a tractaments, que probablement formant una entitat de moment massa generalitzada.

Es necessari seguir avançant en la cerca de noves dianes terapèutiques, i, per això, es precis generar noves hipòtesis de treball que siguin fruit d'una estratègia ben coordinada d'investigació bàsica i translacional, que ens permeti donar un pas endavant en el sentit de transformar una entitat que de moment es defineix "per defecte", en una situació que contempli una o diverses entitats més específiques lligades a dianes potencialment tractables (**GEICAM, 2010**).

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La piroseqüenciació és una tècnica útil per a realitzar estudis mutacionals en teixits parafinats i sobretot per l'estudi de metilació de promotors, amb una sensibilitat adequada i que permet una quantificació, tant de mutacions com del grau de metilació.
2. En la cohort estudiada de càncer de mama triple negatiu no s'han detectat mutacions d'*EGFR*, malgrat trobar un 53,33% de casos amb sobreexpressió immunohistoquímica d'*EGFR*.
3. S'ha detectat mutació activadora de les regions "hotspot" estudiades del gen *PIK3CA* en un 10% dels casos, amb predomini de l'exó 20 i amb coexpressió de Receptors d'Andrògens en la meitat dels casos. La meitat d'aquests casos han tingut un bon pronòstic.
4. S'ha detectat hipermetilació de la regió promotora del gen *BRCA1* en un 25% dels casos, coexistint un grau d'hipermetilació de l'estroma no tumoral similar al tumor en un dels casos estudiats. En dos dels casos metilats es coneix la presència d'una mutació patogènica de *BRCA1*.
5. L'estudi en línia germinal de *BRCA1* s'ha indicat en un 21,67% de la cohort, obtenint un resultat de mutació patogènica coneguda en un 38,46% d'aquests pacients (5/13).
6. A nivell immunohistoquímic la majoria de casos mostren un alt índex proliferatiu de Ki67 (83,33%) i expressió de marcadors basals, CK5/6 i/o *EGFR* (73,33%).
7. Només un 28,33% de la cohort tenia una edat ≤ 50 anys en el moment del diagnòstic, i d'aquestes només el 10% era < 40 anys.
8. En la majoria de pacients s'ha realitzat tractament quirúrgic conservador amb estudi ganglionar negatiu.

CONCLUSIONS

9. Histològicament, la majoria de casos són carcinomes ductals infiltrants de tipus no específic (68,33%), seguits de carcinomes medul·lars (20%). Mostrant la majoria un grau histològic pobrament diferenciat (85%) i casi la meitat moderada o extensa necrosi (46,67%). Sent la mida tumoral variable (en 45% >20 mm i en 46,67% ≤20mm) i les imatges d'invasió angiolimfàtica i perineurals infreqüents.
10. En la cohort 10 de les 60 pacients (16,67%) han progressat, la majoria per disseminació hematògena amb metàstasis a distància, principalment a pulmó i cervell, i 9 d'ells han mort en un interval d'entre 1 i 5 anys des del diagnòstic. D'aquests pacients, el 89% expressaven un o els dos marcadors immunohistoquímics de cèl·lules basals.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Arnes JB, Bégin LR, Stefansson I et al. (2009) *Expression of epidermal growth factor receptor in relation to BRCA1 status, basal-like markers and prognosis in breast cancer.* J Clin Pathol; 62: 139-146.
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ et al. (2011) *Basal-like and triple-negative breast cancer a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists.* Mod Pathol; 24:157-167.
- Baker CK, Vaughn CP and Samowitz. (2012) *A PIK3CA pyrosequencing based assay that excludes pseudogene interference.* J Mol Diagn; 14: 56-60.
- Bal A, Verma S, Joshi K et al. (2012) *BRCA1-methylation sporadic breast cancer are BRCA-like in showing a basal phenotype and absence of ER expression.* Virchow Arch; 461: 305-312.
- Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L et al. (2007) *Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas.* Clin Cancer Res; 13: 6064-6069.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD et al. (2007) *Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and Her2-negative invasive breast cancer, the so-called Triple-Negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry.* Cancer; 109: 1721-1728.
- Bhargava R, Gerald WL, Li AR et al. (2005) *EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations.* Mod Pathol; 18: 1027-1033.
- Bloom HJ and Richardson WW. (1991) *Histological grading and prognosis in breast cancer, a study of 1049 cases of which 359 have been followed for 15 years.* Breast J Cancer; 11: 359-377.

BIBLIOGRAFIA

- Cai F, Chen S, Wang MH et al. (2016) *Pyrosequencing quantified methylation level of BRCA1 promoter as prognostic factor for survival in breast cancer patient*. *Oncotarget*; doi: 10.18632/oncotarget.8355.
- Cai F, Ge I, Wang M et al. (2014) *Pyrosequencing analysis of BRCA1 methylation level in breast cancer cells*. *Tumor Biol*; 35: 3839-44.
- Catteau A, Harris WH, Xu CF et al. (1999) *Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics*. *Oncogene*; 18-. 1957-1965.
- Chen X, Li J, Gray WH et al. (2012) *TNBC type: a subtyping tool for triple-negative breast cancer*. *Cancer Informatics*; 11:147-156.
- Cizkova M, Susini A, Vacher S et al. (2012) *PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α PR and ERBB2-based subgroup*. *Breast Cancer Res*; 14: R28.
- Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A et al. (2015) *Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer*. *Annals of Oncology*, 2015; Advance Acces Published.
- COSMIC – Catalogue of Somatic Mutation in Cancer. U.K. [Internet]. 2004. [Consulta: 31 de març del 2015]. Disponible en <<http://www.cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=PIK3CA>>.
- Cossu-Rocca P, Orrù S, Muroi MR et al. (2015) *Analysis of PIK3CA Mutations and activation pathways in triple negative breast cancer*. *Plos one*; Nov 5; 10: e0141763.
- D'Ippolito E and Iorio MV. (2013) *MicroRNAs and triple negative breast cancer*. *Int J Mol Sci*; 14: 22202-22220.
- Elsayaf Z, Sinn HP, Rom J. (2013) *Biological subtypes of triple negative breast cancer are associated with distinct morphological change and clinical behaviour*. *Breast*; 22: 986-92.

BIBLIOGRAFIA

- Elston CW and Ellis IO. (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: 403-410.
- Flower KJ, Shenker NS, El-Bahrawy M et al. (2015) *DNA methylation profiling to assess pathogenicity of BRCA1 unclassified variants in breast cancer*. *Epigenetics*; 10: 1121-1132.
- García-Tejido P, Luque Cabal M, Peláez Fernández et al. (2016) *Tumor infiltrating lymphocytes in Triple Negative breast cancer: The future of immune targeting*. *Clin Med Ins Oncol*; 10: 31–39.
- *GEICAM - Boletín del Grupo Español de Investigación del Cáncer de Mama*. 2010, 27. San Sebastian de los Reyes. Editorial: Fundación GEICAM.
- *GenBank – GenBank, National Center for Biotechnology Information*. U.S.A. [Internet]. 2013. [Consulta: 26 de novembre del 2015 i 31 de març del 2015]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/nocore/L78833.1> >.
- *GenBank – GenBank, National Center for Biotechnology Information*. U.S.A. [Internet]. 2013. [Consulta: 31 de març del 2015]. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/nocore/NG_012113.2 >.
- Generali D, Leek R, Fox SB et al. (2007) *EGFR mutations in exons 18-21 in sporadic breast cancer*. *Annals of Oncol*; 18: 203-205.
- Glodhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. (2011) *Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. *Annals of Oncol*; 22: 1736-1747.
- Glodhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. (2013) *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013*. *Annals of Oncol*; 00: 1-18.
- Green AR, Powe DG, Rakha EA et al. (2013) *Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers*. *British J of Cancer*; 109: 1886-1894.

BIBLIOGRAFIA

- Grob TJ, Heilenkötter U, Geist S et al. (2012) *Rare oncogenic mutations of predictive markers for targeted therapy in triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat; 134: 561-7.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. (2010) *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med; 134: 907-922.
- Hudis CA and Gianni L. (2011) *Triple-Negative breast cancer: an unmet medical need*. The Oncologist; 16: 1-11.
- Ibragimova I and Cairns P. (2011) *Assays for hypermethylation of the BRCA1 gene promoter in tumor cells to predict sensitivity to PARP-inhibitor therapy*. Methods Mol Biol; 780: 277-291.
- Jacot W, Lopez-Crapez E, Thezenas S et al. (2011) *Lack of EGFR-activating mutations in European patients with triple-negative breast cancer could emphasise geographic and ethnic variations in breast cancer mutation profiles*. Breast Cancer Res; 13: R133.
- Jermal A, Murray T, Ward E et al. (2005) *Cancer statistics 2005*. CA Cancer J Clin; 55: 10-30.
- Kanapathy SK, Tay A, Nair S et al. (2012) *Triple-negative breast cancer in associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women*. BMC Clin Pathol; 12: 18.
- Kim Y, Kim J, Lee HD et al. (2013) *Spectrum of EGFR gene copy number change and KRAS gene mutation status in korean Triple negative breast cancer patients*. Plos one; 8: e79014.
- Krasteva ME, Bozhanov SS, Antov GG et al. (2012) *Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status*. Neoplasma; 59: 85-91.
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ et al. (2012) *World Health Organization Classification of tumours of the breast*. IRAC.

BIBLIOGRAFIA

- Lambie H, Miremadi A, Pinder SE et al. (2003) *Prognostic significance of BRCA1 expression in sporadic breast carcinomas*. J Pathol; 200: 207-13.
- Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez D et al. (2011) *Triple-Negative Breast Cancer in Hispanic Patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopause status, body mass index and parity*. Cancer; 117: 3658-69.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. (2011) *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. J Clin Inv; 121: 2750-2767.
- Lehmann BD and Pietenpol JA. (2014) *Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes*. J Pathol; 232: 142-150.
- Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM et al. (2014) *PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors*. Breast Cancer Res; 16: 406.
- Lehmann BD, Pietenpol JA and Tan AR. (2015) *Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy*. Am Soc Clin Oncol Edu Book; e31-9: 10.14694.
- Liu YR, Jiang YZ, Xu XE et al. (2016) *Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer*. Breast Can Res; 18:33.
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. (2006) *Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Mod Pathol; 19: 264-271.
- Lv N, Xile X, Ge Q et al. (2011) *Epidermal growth factor receptor in breast carcinoma: association between gene copy number and mutations*. Daig Pathol; 6: 118-126.
- Mao Y, Qu Q, Chen X et al. (2016) *The prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. Plos One; 11: e0152500.

BIBLIOGRAFIA

- Martin de Civetta MT and Civetta JD. (2011) *Carcinogenesis*. *Salud Publica Mex*; 53: 405-414.
- Martin V, Botta F, Zanellato E et al. (2012) *Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features*. *Histol Histopathol*; 27: 785-792.
- Modolell Roig A and Izquierdo Sanz M. (2015) *Fundación Española de Seniología y Patología Mamaria. Manual de Práctica Clínica en Seniología 2015*. EstdioMAT1A5. 3era Edició Revisada y Ampliada.
- NIH – *Instituto Nacional del cancer, cancer de seno (mama)*. (2014) España. [Internet], Maig 2014. [Consulta: 2 de maig del 2016]. Disponible en <<http://www.cancer.gov/espanol/tipo/seno/pro>>.
- Netter F.H. (2001) *Sistema reproductor, tomo 2*. Ed. Masson, S.A.
- Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M et al. (2008) *PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations*. *Neoplasia*; 10: 534-541.
- Otani Y, Miyake T, Kagara N et al. (2014) *BRCA1 promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor of BRCA1-methylated breast cancer*. *Cancer Science*; 105: 1369-1376.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. (2000) *Molecular portraits of human breast tumors*. *Nature*; 406: 747-752.
- Prat A, Adamo B, Fan Ch et al. (2013) *Genomic analyses across six cancer types identify basal-like breast cancer as a unique molecular entity*. *Sci Rep*; 3: 3544.
- Prat A et Cortes J. (2015) *Perfils de expresión gènica en càncer de mama*. Transworld Editors S.L.
- Prat A, Pineda E, Adamo B et al. (2015) *Clinical implication of the intrinsic molecular subtypes of breast*. *The Breast*; 24: S26-S35.
- Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA et al. (2009) *Triple-Negative breast cancer: distinguishing between Basal and NonBasal subtypes*. *Clin Cancer Res*; 15: 2302-2310.

BIBLIOGRAFIA

- Reis-Filho JS and Tutt ANJ. (2008) *Triple negative tumours: a critical review*. *Histopathology*; 52: 108-118.
- Riccardi GR, Adamo B, Leni A et al. (2015) *Androgen receptor (AR), E-cadherin, and Ki67 as emerging targets and novel prognostic markers in triple negative breast cancer (TNBC) patients*. *Plos one*; 10: e01238368.
- Rosai and Ackerman's. (2004) *Surgical Pathology*. Ed. Mosby. 8ena edition.
- Sadler TW. (1996) *Embriología médica*. Editorial médica Panamericana. 7ena edición.
- Salgado R, Denkert C, Demaria S et al. (2015) *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working group 2014*. *Ann Oncol*; 26: 259-271.
- Santaballa A. (2015) *Información sobre tipos de cáncer: cáncer de mama*. [Internet], Març 2015. [Consulta: 5 de març del 2016]. Disponible en <<http://www.seom.org/es/infomacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/cancer-de-mama-raiz/cancer-de-mama?start=2#content> > .
- Santarpia L, Qi Y, Stemke-Hale K et al. (2012) *Mutation profiling identifies numerous rare drug targets and distinct mutation patterns in diferent clinical sutypes of breast cancers*. *Breast Cancer Res Treat*; 134: 333-43.
- Schneider BP, Winer E, Foulkes WD et al. (2008) *Triple-negative breast cancer: risk factors of potential targets*. *Clin Cancer Res*; 14: 8010-8018.
- SEOM - Sociedad Española de Oncología Médica. (2016) *Las cifras del cáncer en España 2016*. [Internet], Gener 2016. [Consulta: 27 de febrer del 2016]. Disponible en <<http://www.seom.org/es/premsa/el-cancer-en-espanyacom/105460-el-cancer-en-espana-2016#content> >.
- Shah SP, Roth A, Goya R et al. (2012) *The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers*. *Nature*; 486: 395-9.
- Sharma P, Stecklein SR, Kimler BF et al. (2014) *The prognostic value of BRCA1 promoter methylation in early triple negative breast cancer*. *J Cancer Ther Res*; 3: 1-11.

BIBLIOGRAFIA

- Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T et al. (2005) *Molecular evolution of breast cancer*. J Pathol, 205: 248-254.
- Siziopikou KP and Cobleigh M. (2007) *The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies*. The Breast; 16: 104-107.
- Sood N and Nigam JS. (2014) *Correlation of CK5 and EGFR with clinicopathological profile of triple-negative breast cancer*. Pathol Res International; 141864.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. (2001) *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci; 98: 10869-10874.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. (2003) *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. Proc Natl Acad Sci; 100: 10393-10398.
- Spitale A, Mazzola P, Soldini D et al. (2009) *Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the south of Switzerland*. Annals of Oncology; 20: 628-635.
- Teng YH, Tan WJ, Thike AA et al. (2011) *Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy*. Breast Cancer Res; 13: R35.
- Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR et al. (2010) *Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer*. Mod Pathol; 23: 123-133.
- Tilch E, Seidens T, Cocciardi S et al. (2014) *Mutations in EGFR, BRAF and RAS are rare in triple-negative and basal-like breast cancers from Caucasian women*. Breast Cancer Res Treat; 143: 385-392.
- Tot T. (2011) *Breast cancer 2011*. Ed. Springer.
- Toyama T, Yamashita H, Kondo N et al. (2008) *Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased*

BIBLIOGRAFIA

- BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers.* BMC Cancer; 8: 309.
- Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P et al. (2009) *Invasive ductal carcinoma of the breast with the “triple-negative” phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity.* Breast Cancer Res Treat; 116: 317-328.
 - Vuong D, Simpson PT, Green B et al. (2014) *Molecular classification of breast cancer.* Virchow Arch; 465: 1-14.
 - Weigelt B and Reis-Filho JS. (2010) *Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry.* Breast Can Res; 12: 55-58.
 - Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. (2007) *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.* J Clin Oncol; 25: 118-145.
 - Yadave BS, Chanana P and Jhamb S. (2005) *Biomarkers in triple negative breast cancer: A review.* World Journal Clin Oncol; 6: 252-263.
 - Zhang J, Wang Y, Yin Q et al. (2013) *As associated classification of triple negative breast cancer: the risk of relapse and the response to chemotherapy.* Int J Clin Exp Pathol; 6: 1380-1391.
 - Zhang L, Fang C, Xu X et al. (2015) *Androgen Receptor, EGFR, And BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis.* BioMed Res Int; 357485.