

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO, CLÍNICO Y DE
METILACIÓN DEL PROMOTOR DE BRCA1 EN
PACIENTES DIAGNOSTICADAS DE CÁNCER DE
MAMA TRIPLE NEGATIVO”**

JAIME CEBALLOS VIRO

2015

DIRECTORES:

PROF. DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO

PROF. DR. D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ

PROF. DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO. CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

PROF. DR. D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ. CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado "Estudio inmunohistoquímico, clínico y de metilación del promotor de BRCA1 en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo", realizado por D. Jaime Ceballos Viro bajo su dirección en el Departamento de Medicina, reúne, a su juicio, todos los requisitos exigidos para ser presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firman la presente en Salamanca a veinte de febrero de 2015.

D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO
CATEDRÁTICO DE MEDICINA

D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ
CATEDRÁTICO DE MEDICINA

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Rogelio González y Juan Jesús Cruz, por su disponibilidad, por facilitarme los medios para realizar la tesis y por haber confiado en mí a lo largo de estos cinco años.

A Asun, por su inestimable ayuda en los primeros pasos de este trabajo en el servicio de Anatomía Patológica.

A Javier Fernández, por haberme introducido pacientemente en el mundo del laboratorio, por tantas tardes compartidas entre pipetas con la incertidumbre de si saldrían adelante los experimentos.

A Ana Martín Casado, por su colaboración en el análisis estadístico.

A mis compañeros de la residencia de Arapiles, especialmente a Javier Burguillo y a Enrique Ocio, con los que conviví tres años y que siempre me animaron.

A José Enrique Alés, Ricardo Sánchez Escribano y Elena Filípovich, por conservar y transmitirme su entusiasmo por la oncología.

A mis padres, hermanos y cuñadas, que conforman ese entramado inquebrantable de cariño sobre el que he crecido y en el cual me apoyo.

Y en último lugar, a Ana Cristina, mi esposa, que cambió radicalmente mi vida y que me ha enseñado que los sueños se pueden cumplir.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer de mama	2
1.1 Epidemiología	2
1.2 Factores de riesgo	3
1.3 Anatomía de la glándula mamaria	5
1.4 Histología de la glándula mamaria	5
1.5 Anatomía patológica	6
1.6 Diagnóstico	7
1.7 Estadificación	8
1.8 Factores pronóstico	11
1.9 Tratamiento	13
1.9.1 Cirugía	13
1.9.2 Radioterapia	13
1.9.3 Hormonoterapia	13
1.9.4 Quimioterapia	14
1.9.4.1 Neoadyuvante	14
1.9.4.2 Adyuvante	14
1.9.4.3 Recurrencia y metastásico	14
1.10 Seguimiento	15
2. Clasificación genética: subtipos moleculares intrínsecos	16
2.1 Aspectos técnicos	16
2.2 Evolución histórica	16
2.3 Subtipos moleculares intrínsecos	18
2.4 Implicación pronóstica de los subtipos moleculares intrínsecos	19
2.5 Detección de subtipos moleculares intrínsecos aplicando técnicas de inmunohistoquímica	20
2.6 Subtipos moleculares intrínsecos y su relación con la diferenciación celular en la mama	20
3. Triple negativo	23
3.1 Definición inmunohistoquímica	23
3.2 Epidemiología	23
3.3 Características histopatológicas	23

3.4 Clínica	23
3.5 Tratamiento	23
3.6 Pronóstico	27
3.7 Seguimiento	27
4. Basal like	28
4.1. Expresión genómica	28
4.2. Epidemiología	28
4.3. Características histopatológicas	28
4.4. Características inmunohistoquímicas	28
4.5. Clínica	29
4.6. Tratamiento	29
4.7. Pronóstico	29
5. Distinción entre triple negativo y basal like	30
6. Triple negativo no basal	31
7. Gen BRCA1	32
7.1 Descripción	32
7.2 ARN mensajero	33
7.3 Proteína	33
7.4 Inmunohistoquímica	34
7.5 Funciones	35
7.6 Gen BRCA1 y cáncer	37
7.7 Mutación de BRCA1 y cáncer de mama	38
7.7.1 Mutación de BRCA1 en cáncer de mama hereditario	38
7.7.2 Mutación de BRCA1 en cáncer de mama esporádico	40
7.8 Hipermetilación del promotor	40
7.8.1 Epigenética	40
7.8.2 Metilación de ADN	41
7.8.3 Hipometilación y cáncer	43
7.8.4 Hipermetilación	43
7.8.4.1 Hipermetilación del promotor y cáncer	43
7.8.4.2 Hipermetilación del promotor y cáncer de mama	44

	Índice
7.8.4.3 Hipermetilación de BRCA1	45
7.8.4.3.1 Hipermetilación de BRCA1 en cáncer de mama hereditario	45
7.8.4.3.2 Hipermetilación de BRCA1 en cáncer de mama esporádico	46
7.9 Otros mecanismos de inactivación de BRCA1	46
7.10 Concepto BRCAness	46
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	47
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Pacientes	52
2. Tipo de estudio	52
3. Muestras	52
4. Inmunohistoquímica	52
5. Estudio de hipermetilación del promotor	53
5.1 Extracción de ADN de tejidos parafinados	53
5.2 Métodos para la medición de la metilación del promotor	54
5.3 Modificación de ADN por la técnica de bisulfito	58
5.4 Medición de la metilación del promotor de BRCA1	59
6. Estudio estadístico	60
RESULTADOS	61
1. Características de los pacientes	62
2. Características de los tumores	64
3. Características del tratamiento	68
3.1 En pacientes estadios I-III	68
3.2 En pacientes estadio IV	70

	Índice
4. Situación actual de las pacientes	71
5. Supervivencia libre de enfermedad	73
6. Supervivencia global	83
7. Resultados del estudio de metilación del promotor de BRCA1	86
8. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en función de la metilación del promotor de BRCA1	90
9. Caracterización multivariante de las pacientes según la metilación del promotor de BRCA1	94
DISCUSIÓN	99
1. Sobre los tumores triple negativo	100
2. Sobre las diferencias entre tumores basal like y triple negativo no basal	102
3. Sobre la metilación del promotor de BRCA1	104
4. Limitaciones del estudio	107
CONCLUSIONES	108
ANEXO	110
BIBLIOGRAFÍA	114

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de mama

1.1 Epidemiología

Incidencia

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres y el segundo tumor más frecuente en el mundo, por detrás del cáncer de pulmón. En 2012 se diagnosticaron 1,67 millones de casos de cáncer de mama, el 25% de todos los cánceres (1).

Su incidencia en el mundo está aumentando a razón de un 2-3% anual debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz. En España la incidencia aumentó hasta el año 2003 y desde entonces está descendiendo poco a poco.

Más de la mitad de los casos de cáncer de mama en el mundo se diagnostican en países desarrollados (1): 370.000 casos/año en Europa (27,4%) y 230.000 casos/año en Norteamérica (31,3%). La tasa ajustada de incidencia española es de 50,9 casos/100.000 habitantes-año (84 casos/100.000 mujeres-año), la tasa ajustada de incidencia mundial es de 37,4 casos/100.000 habitantes-año, la de Europa del Sur de 62,4 casos/100.000 h-año y la de Europa del Norte de 82,5 casos/100.000 h-año.

En España el cáncer de mama es el tumor más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, siendo su incidencia en el año 2012 de 27.200 casos (2, 3).

En el varón existe un pequeño riesgo de cáncer de mama, constituyendo el 1% de los tumores de mama diagnosticados (4).

Mortalidad

A pesar de realizar un tratamiento oncológico adecuado, el 20-30% de las pacientes con cáncer de mama localizado experimentarán recaída con metástasis a distancia (5).

En el año 2012 el cáncer de mama ocasionó la muerte de 522.000 mujeres en todo el mundo (1). Es la quinta causa de muerte por cáncer, la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en países poco desarrollados y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en países desarrollados. En 2006 la tasa de mortalidad por cáncer de mama en España fue de 18,6 casos/100.000 mujeres-año y en Europa de 26 casos/100.000 mujeres-año. La mortalidad del cáncer de mama en España en el año 2012 fue de 6.230 casos (2, 3). La mortalidad por cáncer de mama en el mundo está descendiendo desde 1975, en España desde 1992, a un ritmo del 2% anual (6). Esto es atribuible al diagnóstico precoz y a los avances terapéuticos.

Supervivencia

La supervivencia del cáncer de mama en España a los 5 años se sitúa en torno al 83% (3, 7), en Europa es del 81,8% y en Estados Unidos del 90%.

1.2 Factores de riesgo

Los factores de riesgo implicados en la aparición de cáncer de mama son los siguientes:

- **Edad:** la incidencia de cáncer de mama aumenta exponencialmente con la edad, aunque se ralentiza con la menopausia debido a la disminución de los estrógenos circulantes. En España la mediana de edad de las mujeres en el momento del diagnóstico es de 57,9 años (8).
- **Raza:** las mujeres de raza blanca son las que tienen un riesgo más elevado de padecer cáncer de mama (9). Las mujeres asiáticas y africanas son las que tienen menor riesgo; las razones se desconocen, aunque probablemente guarden una estrecha relación con el estilo de vida.
- **Nivel socioeconómico y lugar de residencia:** las mujeres con un nivel educacional y económico más alto (9) y las que viven en zonas urbanas tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de mama.
- **Lesiones benignas de mama:** son factores de riesgo las lesiones proliferativas sin atipia (como el fibroadenoma, la hiperplasia moderada o severa, la adenosis esclerosante o el papiloma intraductal) y las lesiones proliferativas con atipia (como la hiperplasia lobulillar atípica, la hiperplasia ductal atípica o el carcinoma lobulillar in situ).
- **Estilo de vida:** la obesidad es un factor de riesgo ya que en la mujer postmenopáusica la principal fuente de estrógenos es el tejido adiposo. El ejercicio físico es un factor protector (en la adolescencia retrasa la menarquia y modifica el nivel hormonal, y en mujeres adultas puede disminuir el número de ciclos ovulatorios y el nivel de estrógenos).
- **Factores dietéticos:** son factores de riesgo el consumo de grasas poliinsaturadas y el alcohol (este último aumenta los niveles de estrógenos circulantes y a su principal metabolito, el acetaldehído, tiene un efecto carcinógeno directo). Son factores protectores el aceite de oliva y los ácidos omega-3.
- **Factores hormonales y reproductivos:** son factores de riesgo la menarquia temprana (por cada dos años de retraso en la menarquia disminuye un 10% el riesgo de desarrollar cáncer de mama) (10), la menopausia tardía (por cada año de retraso el riesgo se incrementa en un 1,03%) (11), la nuliparidad (aumenta el riesgo entre un 1,2 y un 1,7%) (12) y la edad tardía al primer

embarazo. La terapia hormonal sustitutiva y los anticonceptivos orales también aumentan el riesgo, desapareciendo tras su abandono. La paridad y la lactancia materna son factores protectores.

- Susceptibilidad genética: tener un familiar de primer grado con cáncer de mama duplica el riesgo de padecer la enfermedad.

El 5-10% de los cánceres de mama son debidos a mutaciones genéticas en genes de alta penetrancia (el 20-40% ocurren en los genes BRCA1 y BRCA2, y un pequeño porcentaje son debidos a otros genes como p53, PTEN, ATM, CHEK2, RAD50 o MSH2/MLH1) (13).

- Exposición a radiaciones ionizantes: incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad, especialmente cuando la radiación se produce en los primeros años de vida y en la adolescencia, momentos en los que la glándula mamaria está desarrollándose.
- Factores ambientales: la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (que se encuentran en el petróleo, el carbón o el alquitrán) aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama.
- Tabaco: el consumo de tabaco parece aumentar el riesgo de cáncer de mama, si bien es complicado determinar el grado de esta asociación debido a la frecuente interacción con el consumo de alcohol y con otros factores hormonales (14).

1.3 Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria está formada por un sistema túbulo-glandular arboriforme que se extiende desde el pezón hasta los lobulillos junto con un estroma fibro-adiposo que rellena los espacios inter e intralobulillares.

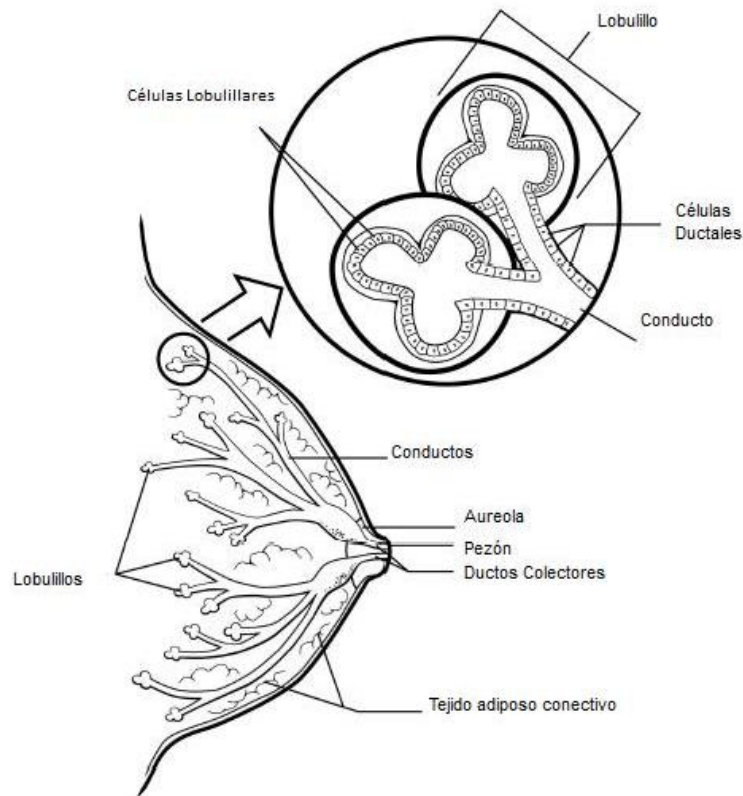


Figura 1: Anatomía de la glándula mamaria. Imagen obtenida de <http://cirujanos-oncologos.com>.

1.4 Histología de la glándula mamaria

Las estructuras tubulares de la glándula mamaria están revestidas por dos capas celulares:

- Capa luminal o epitelial: recibe este nombre porque sus células (luminales o epiteliales) dan hacia la luz de la glándula. Poseen diversas funciones como secretar leche o expresar receptores hormonales (15), y se caracterizan por la presencia de citoqueratinas 8, 18 y 19.
- Capa basal. Contiene los siguientes tipos celulares:
 - Células mioepiteliales o basales: en contacto con la membrana basal. Poseen elementos propios de las células epiteliales (citoqueratinas) y elementos propios del músculo liso

(microfilamentos, placas densas y proteínas contráctiles). Expresan citoqueratinas 5/6, 14 y 17 y otras proteínas como la vimentina, actina de músculo liso, p63, CD10 y S100.

Se le atribuyen funciones de contracción durante la lactancia, inducir la polaridad de las células luminales durante su desarrollo, intervenir en la síntesis y el remodelado de la membrana basal, regular la morfología de los conductos y secretar factores supresores de tumores y factores antiangiogénicos.

- Células madre mamarias (16). Darán lugar a las células progenitoras, que a su vez originarán las células epiteliales y las células mioepiteliales. Expresan proteínas como citoqueratina 14/19, EpCAM, CD49f, SSEA-4.

Tienen capacidad de autorrenovación y de diferenciación. Esta renovación puede ser asimétrica (una célula progenitora y otra célula madre, lo que mantendría el número de células madre) o simétrica (dos células madre, originando un aumento de células madre). Este proceso de regulación entre asimétricas y simétricas no está bien definido, se ha visto que está implicado p53 y vías como NOTCH, Hedgehog y Wnt, que están desreguladas en la carcinogénesis (17).

1.5 Anatomía patológica

Los tumores de mama pueden clasificarse en dos grupos: in situ (cuando no han roto la membrana basal) e infiltrantes (cuando se extienden a través de la membrana basal).

Los tumores in situ representan el 15-30% y comprenden el carcinoma lobulillar in situ y el carcinoma ductal in situ. Los tumores infiltrantes representan el 70-85% y se dividen en los siguientes tipos (18):

- Carcinoma ductal infiltrante: es el más frecuente, correspondiendo al 70-80% de todos los tumores infiltrantes de mama. De apariencia microscópica heterogénea, las células tumorales forman glándulas, nidos, cordones, trabéculas o láminas. Desde el punto de vista citológico pueden ser similares a las células epiteliales de mama o tener un marcado pleomorfismo celular y atipias celulares.
- Carcinoma lobulillar infiltrante: es el segundo más frecuente, comprende el 5-10% (19). En el estudio citológico se observan células pequeñas y uniformes que invaden el estroma de manera lineal, con poca reacción desmoplásica circundante. Normalmente expresan receptores de estrógenos y progesterona y no sobreexpresan HER2/neu ni E-cadherina. Con mayor frecuencia que otros tipos son multifocales y bilaterales. Existe una variante pleomórfica que puede sobreexpresar HER2/neu.

- Carcinoma medular: representa el 5% de los tumores invasivos. Generalmente asocia componentes de carcinoma ductal in situ, zonas de necrosis, hemorragia y degeneración quística. No suele expresar receptores hormonales ni HER2 (20).
- Carcinoma tubular: se caracteriza por la proliferación de glándulas o túbulos bien diferenciados. Asocia componente intraductal, suelen ser multicéntricos y bilaterales y expresar receptores hormonales sin sobreexpresión de HER2. Tienen buen pronóstico (21).
- Carcinoma mucinoso o coloide: se caracteriza por la producción extracelular de mucina. Presenta buen pronóstico, sobreexpresa receptores hormonales y no expresa HER2 (22).
- Carcinoma metaplásico: representa menos del 1%. Está caracterizado por la mezcla de adenocarcinoma con áreas dominantes de células fusiformes, escamosas y/o diferenciación mesenquimal. Incluye el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes, el carcinoma adenoescamoso y el carcinoma con metaplasia mixta epitelial/mesenquimal (23).
- Carcinoma papilar.
- Carcinoma apocrino.
- Carcinoma con diferenciación neuroendocrina.
- Carcinoma adenoide quístico.
- Carcinoma inflamatorio: cuando las células tumorales infiltran vasos linfáticos de la dermis.
- Enfermedad de Paget: se define por la afectación intraepitelial del pezón por un carcinoma ductal in situ o infiltrante.
- Otros: en la mama pueden asentar otros tumores no considerados típicamente mamarios (linfoma primario, angiosarcoma o cistosarcoma filodes).

1.6 Diagnóstico

Ante la sospecha de un carcinoma de mama existen cuatro pilares diagnósticos básicos: exploración física, exploración radiológica de ambas mamas, estudio anatomopatológico y estudio de extensión.

En los países desarrollados más del 90% de los diagnósticos presentan la enfermedad localizada. Esto es posible gracias al cribado con mamografías anuales o bienales a partir de los 40-50 años.

1.7 Estadificación

La clasificación TNM utiliza el tamaño del tumor, la afectación de ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis. La clasificación TNM (7ª edición) (24) se recoge en la tabla 1:

Tabla 1: Clasificación TNM 7ª edición.

Tumor Primario (T)	
TX	El Tumor Primario no se puede evaluar
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal "in situ"
Tis (LCIS)	Carcinoma Lobulillar "in situ"
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor
	La enfermedad de Paget asociada a tumor se clasifica de acuerdo al tamaño del tumor
T1	Tumor < 2 cm. en su mayor dimensión
T1mic	Microinvasión < 0.1 cm. en su mayor dimensión
T1a	Tumor > 0.1 cm. pero no > 0.5 cm. en su mayor dimensión
T1b	Tumor > 0.5 cm. pero no > 1 cm. en su mayor dimensión
T1c	Tumor > 1 cm. pero no > 2 cm. en su mayor dimensión
T2	Tumor > 2 cm. pero no > 5 cm. en su mayor dimensión
T3	Tumor > 5 cm. en su mayor dimensión
T4*	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica y/o piel
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir el músculo pectoral mayor
T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama
T4c	Ambos T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio**
Ganglios Linfáticos Regionales (N)***	
NX	Cuando no se pueden evaluar (p.e. Cirugía previa)
N0	No metástasis en los Ganglios Linfáticos Regionales
N1	Metástasis en Ganglios homolaterales móviles

N2	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos o agrupados, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes* en ausencia de afectación clínica axilar
N2a	Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijos entre si o a otras estructuras
N2b	Metástasis sólo en ganglios homolaterales de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes* y en ausencia de afectación clínica evidente axilar
N3	Metástasis en ganglios infraclaviculares homolaterales, o en cadena mamaria interna homolateral clínicamente aparentes en presencia de afectación axilar clínicamente evidente; o metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales con o sin afectación axilar o de la mamaria interna
N3a	Metástasis en ganglios infraclaviculares y axilares homolaterales
N3b	Metástasis en cadena mamaria interna y axilar homolateral
N3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales

Ganglios Linfáticos Regionales (pN)****	
pNX	Cuando no son evaluables (no extirpados o por cirugía previa)
pN0	No afectación histológica, sin estudios adicionales para células tumorales aisladas**
pN0(i-)	No afectación ganglionar histológica, H&E y IHC negativas.
pN0(i+)	Presencia de células tumorales aisladas por H&E o IHC , ninguna agrupación > 0.2 mm
pN0(mol-)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular negativo (RT-PCR)
pN0(mol+)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular positivo(RT-PCR)
pN1mi	Micrometástasis (> 0.2 mm, ninguna > 2.0 mm)
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y/o en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos.
pN1b	Metástasis en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos, o afectación clínicamente aparente de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos (al menos un depósito tumoral > 2.0 mm)

pN2b	Metástasis clínicamente aparente en ganglios de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar.
pN3	Metástasis en > 10 ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas clínicamente negativas de la mamaria interna; o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a	Metástasis en > 10 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2,0 mm), o metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares
pN3b	Metástasis en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas de la mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes.
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
ypN postratamiento	La ypN postratamiento debe ser evaluada como para el N clínico (pretratamiento). El sufijo SN se ha de usar solo si se realiza la técnica de ganglio centinela postratamiento, si no le asume que es por linfadenectomía axilar. Si no se hace estudio del ganglio centinela post se debe poner Nx. Las categorías post son iguales que en el caso sin terapia neoadyuvante

Metástasis a distancia (M)	
MX	No se pueden evaluar
M0	No metástasis a distancia
cM0(i+)	No evidencia clínica ni radiológica de metástasis pero presencia de depósitos de células tumorales detectadas en sangre circulante, médula ósea u otro tejido ganglionar no regional que es < 0,2mm en un paciente sin signos ni síntomas de metástasis.
M1	Metástasis a distancia presentes

* La invasión de la dermis sólo no clasifica al tumor como T4.

** La definición de Carcinoma Inflamatorio es fundamentalmente clínica. Implica la presencia de eritema y edema (piel de naranja) difuso de la mama asociado o no a una masa palpable subyacente. Estos cambios deben afectar a la mayor parte de la piel de la mama (la presencia de estos cambios asociados de forma limitada a un tumor localmente avanzado no implica el diagnóstico de carcinoma inflamatorio). La presencia de linfáticos dérmicos infiltrados sin los cambios clínicos descritos no implica por si solo el diagnóstico de carcinoma inflamatorio.

*** Detectado clínicamente se define como detectado por estudios de imagen (excluyendo la linfogammagrafía) o por exploración física con características de alta sospecha o posible macrometástasis basado en PAAF. La confirmación de una metástasis clínica por PAAF sin biopsia excisión se designa con el sufijo "f" (p.e. cN3a(f)). La biopsia excisión de un ganglio linfático en ausencia de pT se clasifica como N clinic. pN se usa solo para la excisión/biopsia de un ganglio centinela solo en conjunction con una valoración patológica de la T.

**** La clasificación pN está basada en la disección axilar con o sin estudio del ganglio centinela. Cuando esta basada en el Ganglio centinela solo se debe poner en el estadiaje (sn).

Estadío	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1b	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1b	N1mi	M0
IIA	T0	N1c	M0
	T1b	N1c	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIC	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.8 Factores pronóstico

- Tamaño tumoral: el tamaño es el principal factor pronóstico en ausencia de afectación axilar (25) y se relaciona con el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares y con el riesgo de recurrencia.
- Afectación ganglionar axilar: es el factor pronóstico más importante en el carcinoma de mama no metastásico para predecir supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (26).
- Tipo histológico: los subtipos histológicos ductal infiltrante y lobulillar infiltrante tienen peor pronóstico. La histología mucinosa (coloide) y tubular confieren buen pronóstico.
- Grado nuclear. La gradación según Scarff-Bloom-Richardson asigna de 1 a 3 puntos en función de características como tamaño, mitosis y formación de túbulos, clasificándose como bajo grado (3-5 puntos), grado intermedio (6-7 puntos) o alto grado (8-9 puntos) (27). Tumores pobremente diferenciados o con alto grado nuclear presentan una peor supervivencia global (28).

- Índice de proliferación: Ki-67 es un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra el antígeno nuclear que se expresa en las células en fase de proliferación. El índice de proliferación se ha correlacionado con la supervivencia global y con la supervivencia libre de enfermedad (29).
- Receptores hormonales: la presencia de receptores de estrógenos y/o receptores de progesterona confieren un mejor pronóstico (30) y constituyen el factor predictivo de respuesta a la terapia endocrina más importante.
- Amplificación o sobreexpresión de HER2: HER2 es un receptor de factor de crecimiento. Se encuentra amplificado en el 15% de los tumores de mama invasivos y conlleva un aumento de recurrencia tumoral y una disminución de supervivencia global (31). En los últimos años han surgido múltiples fármacos anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y trastuzumab-emtansina).
- Patrones de expresión génica: existen instrumentos de diagnóstico genómico como Oncotype DX, MammaPrint, la firma genética de Rotterdam y PAM50 que predicen el riesgo de recurrencia en función de la expresión de determinados genes (32).
 - Oncotype DX utiliza una RT-PCR de tejido en parafina de 21 genes (16 relacionados con cáncer y 5 control) (33). Se compuso un algoritmo denominado recurrence score (de 0 a 100) indicando el riesgo de recidiva en los 10 años posteriores al diagnóstico y dividiendo los tumores en bajo (< 18), intermedio (18-30) y alto riesgo (\geq 31-100). Está validado para tumores estadios I y II, sin afectación ganglionar y con receptores de estrógenos positivos, y se está estudiando en ganglios positivos con receptores de estrógenos positivos.
 - MammaPrint es una firma pronóstica desarrollada por el Netherlands Cancer Institute con estudio por microarray de 70 genes (34). Predice el riesgo de recurrencia en pacientes con tumores en estadios iniciales y receptores de estrógenos positivos.
 - La firma genética de Rotterdam estudia 76 genes (34, 35) e, igual que el MammaPrint, predice el riesgo de recurrencia en pacientes con tumores en estadios iniciales y receptores de estrógenos positivos.
 - PAM50 (Prediction Analysis of Microarray) utiliza 50 genes y ha demostrado capacidad pronóstica (36, 37).

1.9 Tratamiento

El tratamiento del cáncer de mama suele combinar cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y terapias dirigidas.

Empleamos los siguientes términos a la hora de describir dichos tratamientos:

- Tratamiento local radical: incluye cirugía y/o radioterapia. Elimina el tumor visible en la mama y en la axila.
- Tratamiento neoadyuvante: se aplica antes del tratamiento local radical para intentar reducir el volumen tumoral, eliminar enfermedad micrometastásica y testar la sensibilidad a los fármacos.
- Tratamiento adyuvante: se administra después del tratamiento local radical para eliminar enfermedad micrometastásica.
- Tratamiento paliativo: su finalidad de paliar los síntomas y aumentar la supervivencia.

1.9.1 Cirugía

En el siglo XIX se creía que el cáncer de mama era una enfermedad locorregional. En 1.889 Halsted presentó su serie de pacientes con mastectomías radicales (extirpación de la glándula en la unión de ambos pectorales y linfadenectomía axilar de tres niveles), convirtiéndose en el estándar quirúrgico durante un siglo. Desde 1.972 se empezaron a practicar cirugías más conservadoras seguidas de radioterapia, con las que se objetivaba una supervivencia similar a la cirugía radical. Sin embargo un porcentaje de estas pacientes fallecía por enfermedad a distancia, lo que hacía sospechar una diseminación tumoral precoz.

1.9.2 Radioterapia

Es una parte integrante del tratamiento conservador del cáncer de mama (sobre el lecho tumoral) y del tratamiento con mastectomía radical (sobre la pared torácica y el área supraclavicular). Disminuye la tasa de fallo local desde el 30% sólo con cirugía hasta menos del 10% con radioterapia adyuvante. También se utiliza como tratamiento paliativo en enfermedad diseminada sobre metástasis óseas, cerebrales, compresión medular, masas de partes blandas, etc.

1.9.3 Hormonoterapia

El 70% de los cánceres de mama expresan receptores hormonales (receptores de estrógenos y/o receptores de progesterona). El tratamiento hormonal se utiliza desde hace más de cien años y es una terapia dirigida muy efectiva. Los principales agentes utilizados son el tamoxifeno, los supresores de la función ovárica y los inhibidores de aromatasa. El tamoxifeno actúa como antagonista competitivo del

receptor de estrógenos y está indicado en adyuvancia (disminuye el riesgo de recaída en un 40%, de muerte en un 30% y de cáncer de mama contralateral) y en enfermedad avanzada (38). Los supresores de la función ovárica son una opción en mujeres premenopáusicas y han demostrado reducción de recurrencia y de mortalidad (39). Los inhibidores de aromatasa (letrozol, anastrozol y exemestano) disminuyen la producción de estrógenos al bloquear la aromatización de andrógenos producidos en la glándula suprarrenal. Tienen indicación en neo/adyuvancia como terapia de inicio o de sustitución tras tamoxifeno en pacientes postmenopáusicas, como terapia de inicio en combinación con análogos LHRH en pacientes premenopáusicas, y en enfermedad avanzada (40).

1.9.4 Quimioterapia

1.9.4.1 Neoadyuvante

Aunque la quimioterapia neoadyuvante no ha demostrado aumento de supervivencia global ni libre de progresión con respecto a quimioterapia adyuvante (41) es útil por dos motivos:

- Permite valorar la sensibilidad a tratamientos de quimioterapia. Alcanzar una respuesta completa patológica está asociado con un incremento en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global (42).
- Al disminuir el tamaño tumoral aumentan las opciones de realizar una cirugía conservadora.

La quimioterapia neoadyuvante es el tratamiento de elección a partir de los estadio IIIA y puede ser considerada a partir de un estadio IIA.

Suelen utilizarse la combinación de antraciclinas y taxanos (43), junto con trastuzumab en los tumores HER2 positivos.

1.9.4.2 Adyuvante

En general la quimioterapia adyuvante está recomendada cuando existe afectación ganglionar, y en pacientes sin afectación ganglionar cuando existe algún factor de alto riesgo (menor de 35 años, receptores hormonales negativos, > 2 cm de tamaño o grado histológico intermedio o alto).

1.9.4.3 Recurrencia o metastásico

La combinación de agentes quimioterápicos ha demostrado aumento en la tasa de respuestas, en la supervivencia libre de progresión y un leve aumento de supervivencia global, junto con un importante incremento de la toxicidad (44). Por este último motivo el tratamiento habitual es un agente en monoterapia, dejando reservada la combinación para aquellos casos en los que se requiere un rápido control de la enfermedad.

1.10 Seguimiento

Las recomendaciones de las principales guías incluyen (45):

- Historia clínica y exploración física cada 4-6 meses durante los 5 primeros años, después anualmente.
- Mamografía anual de la mama contralateral y de la ipsilateral si se ha realizado una cirugía conservadora.
- Revisión ginecológica anual con citología cervical en pacientes que han recibido o están en tratamiento con tamoxifeno.
- Estudio densitométrico óseo basal y periódico en pacientes en tratamiento con inhibidor de aromatasa o con supresores ováricos.
- La realización de pruebas de imagen de hueso, abdomen, tórax y cerebro no están recomendadas salvo que exista sospecha clínica.

2 Clasificación genética: subtipos moleculares intrínsecos

La expresión genética, el estudio del nivel transcripcional a través del ARN mensajero, permite caracterizar los tumores de mama más allá de la histología, del grado y de la descripción inmunohistoquímica.

2.1 Aspectos técnicos

Los perfiles genéticos se basan en la expresión de genes en las células cancerígenas utilizando microarrays. Los arrays de expresión génica miden el nivel de ARN mensajero (ARNm) de genes en células tumorales comparándolos con ARNm de los mismos genes de una muestra referencia. El tumor es procesado y el ARN o ADN complementario (ADN de doble cadena sintetizado a raíz de una hebra simple de ARN maduro) es etiquetado por una sonda fluorescente. El tumor es etiquetado en rojo y la muestra de referencia en verde. En el array se une a la sonda específica y el ratio rojo:verde reflejará la expresión de cada gen. Los ordenadores buscan patrones de expresión de cientos de genes simultáneamente, y algunos de esos genes nos servirán para categorizar los tumores.

2.2 Evolución histórica

El primer estudio de expresión génica fue publicado en Nature en el año 2.000 (46) por un grupo de Stanford y Noruega liderado por Charles M. Perou y Therese Sorlie. En dicho estudio se analizaron 65 muestras de 42 pacientes utilizando microarrays de ADN complementario de 1.753 genes humanos. 20 muestras tumorales de las 65 fueron analizadas en dos momentos, antes y después de un tratamiento de quimioterapia neoadyuvante. De los 1.753 genes se seleccionaron 496 (denominados conjunto de genes intrínsecos), aquellos con gran variación entre los tumores y que apenas variaban en las muestras que procedían del mismo tumor. Vieron que los tumores se agrupaban por similitud en el perfil de expresión (dendrograma) en dos ramas: receptores de estrógenos positivos o negativos. Los que expresaban receptores de estrógenos también expresaban genes propios de las células epiteliales (receptores de progesterona, CK8, CK18, BCL-2), y por eso se les denominó luminales (constituían el 58%). En la rama de receptores de estrógeno negativos aparecían tres subgrupos: basal like (13% del total), HER2 positivo (11%) y normal like (18%). Los tumores normal like expresaban genes propios de células mioepiteliales de mama normal y de células adiposas. La mayoría de los tumores basal like no expresaban ni receptores de estrógenos ni HER2 (triple negativo) y expresaban genes propios de células mioepiteliales como CK5/6, CK17, integrina β 4 y laminina. Los tumores HER2 expresaban altos niveles de genes HER2. El agrupamiento se realizó de forma de jerárquica, no supervisada (dendrograma).

Posteriormente se analizó el conjunto de genes intrínsecos (reducido a 456 genes) en 78 tumores. De nuevo los tumores se volvieron a agrupar en dos subgrupos claramente diferenciados en función de los receptores de estrógenos. La rama de receptores de estrógenos positivos se subdividió en tres: luminal A

(38%), luminal B (6%) y luminal C (12%). Y la rama de receptores de estrógenos negativos se subdividió en los mismos tres subgrupos vistos en el primer estudio: basal like (16%), HER2 positivo (13%) y normal like (15%). También se estudió el comportamiento biológico y se observó que los tumores basal like, HER2 positivo y luminal C presentaban una menor supervivencia global y un menor tiempo libre de enfermedad (47).

En un tercer estudio del mismo grupo se estudiaron 534 genes (una versión ampliada del conjunto de genes intrínsecos) en 115 muestras tumorales, encontrando los mismos 5 subgrupos: luminal A (36%), luminal B (14%), HER2 (14%), basal like (24%) y normal like (12%). Se incluyeron 18 tumores portadores de la mutación BRCA1 clasificándose todos como basal like (48). (Figura 2).

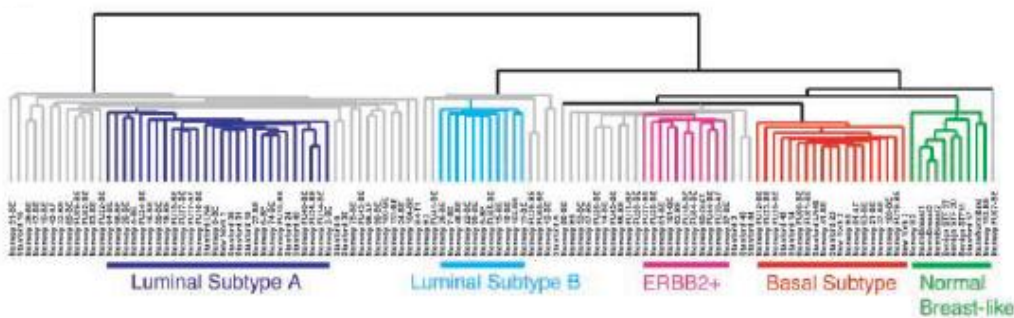


Figura 2: Dendrograma de distribución de los cinco subgrupos según el estudio de Sorlie (48).

Otros grupos de investigación utilizaron estos mismos genes en sus propias series tumorales encontrando resultados similares:

- Un grupo de investigadores de la universidad de Ámsterdam estudió 98 cánceres de mama inicialmente con ganglios negativos, encontrando 231 genes que se asociaban al desarrollo de enfermedad (definido como presencia de metástasis a 5 años) (49).
- Sotiriou et al. estudiaron 56 genes en 99 tumores de mama con ganglios positivos y negativos, subdividiendo los tumores en luminal 1 (19%), luminal 2 (23%), luminal 3 (24%), HER2 (7%), basal like (16%) y normal like (10%) (50).
- Bertucci et al. estudiaron 81 tumores de mama con la peculiaridad de que todos eran inflamatorios. Los 120 genes que escogieron dividieron los tumores en luminal A (30%), luminal B (13%), HER2 (18%), basal like (19%) y normal like (7%) (51).
- Calza et al. utilizaron los 496 genes del grupo de Noruega/Stanford en 412 tumores y los resultados fueron similares: luminal A (30%), luminal B (13%), HER2 (10%), basal like (14%), normal like (22%) (52).

Hu et al. analizaron 105 tumores, de los cuales 26 eran réplicas del mismo paciente en diferentes estadios, obteniendo una huella génica intrínseca. Por agrupamiento observaron los mismos subgrupos descritos: luminal A (28%), luminal B (13%), HER2 (9%), basal like (27%) y normal like (7%). Posteriormente utilizaron las series de Sorlie, van't Veer y Sotiriou (311 tumores) y obtuvieron una huella génica diferente pero con elementos comunes a las cuatro series, la cual también agrupaba en los mismos grupos y conservaba el valor pronóstico predictivo (53).

En 2006 el grupo de Stanford (Fan et al.) analizaron la concordancia de los principales perfiles descritos hasta el momento, encontrando que todos ellos predecían el pronóstico de manera similar (54).

En 2007 el grupo de Stanford (Herschkowitz et al.) describió un nuevo subgrupo, que denominó claudin low (7-14%) (55).

2.3 Subtipos moleculares intrínsecos

Podemos clasificarlos en tres grupos: receptores de estrógenos positivos (luminal A y luminal B), receptores de estrógenos negativos (basal like, HER2 enriquecido y normal like) y claudin low.

Las principales características de los subtipos moleculares intrínsecos son las siguientes:

Luminal A

Representan en torno al 40% de los cánceres de mama. Presentan una alta expresión de genes relacionados con receptores de estrógenos y una baja expresión de genes de HER2 y de genes relacionados con la proliferación (54). Expresan citoqueratinas 8 y 18, suelen ser tumores de bajo grado y menos del 20% tienen mutaciones de p53.

Luminal B

En torno al 20% de los tumores de mama. Tienen una menor expresión de genes relacionados con receptores de estrógenos, variable expresión de HER2 y mayor expresión de genes de proliferación.

HER2 enriquecido

Suponen el 10-15% de los tumores de mama. Comprenden sólo la mitad de los tumores HER2 positivo, ya que la otra mitad se encuentra en el subtipo luminal B al expresar receptores de estrógenos. Normalmente son de alto grado y entre el 40-80% presentan mutaciones en p53.

Basal like

Representan el 15-20% de los tumores de mama. Tienen una baja expresión de genes luminales y HER2 y una alta expresión de EGFR y de genes denominados basales (citoqueratina 5/6, 14 y 17). Se han

apodado triple negativo porque típicamente son receptores de estrógenos, de progesterona y HER2 negativos. Sin embargo, aunque muchos triple negativo son basal like y muchos basal like son triple negativo, existe en torno a un 30% de discordancia entre estas dos clasificaciones (56).

Normal-like

Presentan una expresión génica similar al tejido mamario normal. Su significado no está claro y se sospecha que puedan representar un artefacto (56).

Claudin low

Suponen entre el 7-14% de los cánceres de mama. El 60-70% son tumores triple negativo (57). Se caracterizan por una baja expresión de genes de adhesión celular (claudina 3, 4, 7 y E-cadherina), marcadores de diferenciación luminal (EpCAM y MUC1) y una alta expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima (vimentina, metaloproteinasa-2), de respuesta inmune y con características de células madre (CD44 +/CD24 -/low) (58). Son carcinomas ductales y con alta frecuencia presentan diferenciación metaplásica o medular (57). Tienen un crecimiento más lento, un menor grado y una menor expresión del gen Ki-67 que los tumores basal like (59).

2.4 Implicación pronóstica de los subtipos moleculares intrínsecos

Aunque los subtipos moleculares intrínsecos no fueron desarrollados con esta intención, se observó que tenían una correlación pronóstica (en supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad) (60).

El subtipo con mejor pronóstico es el luminal A y los de peor pronóstico basal like y HER2 enriquecido. El subtipo luminal con expresión HER2 tiene una mortalidad similar a los receptores hormonales negativos. Gracias a las terapias anti-HER2 el pronóstico de los subtipos HER2 enriquecido y luminal con expresión HER2 está mejorando.

Los tumores con receptores hormonales positivos tienen una mortalidad constante en el tiempo desde el diagnóstico, mientras que los tumores con receptores hormonales negativos tienen un pico de mortalidad en los primeros años tras el diagnóstico (61).

En un estudio realizado en 3.726 pacientes con un seguimiento de 14,8 años la mediana de supervivencia desde el desarrollo de metástasis fue de 2,2 años en el subtipo luminal A; 1,6 años en el luminal B; 1,3 años en el luminal/HER2; 0,7 años en el HER2 y 0,5 años en el subtipo basal like (62).

En cuanto a las recaídas, se ha observado que las pacientes con tumores HER2 y basal like sometidas a cirugía conservadora de mama tienen mayor riesgo de recurrencia regional; y que las pacientes con tumores luminal B, luminal/HER2, HER2 y basal like sometidas a mastectomía tienen un aumento del

riesgo de recaída local y regional (en torno al 20%) (63). El subtipo luminal A tiene un bajo riesgo de recaída local y regional.

2.5 Detección de tipos moleculares aplicando técnicas de inmunohistoquímica.

La intención de identificar los subtipos moleculares a través de métodos inmunohistoquímicos es limitada, y debe entenderse siempre como una aproximación que orienta a los clínicos y que ayuda en la toma de decisiones.

Actualmente no existe consenso sobre la forma de definir por inmunohistoquímica cada subtipo molecular, y conviven diversas definiciones:

- Luminal A (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, Ki-67 <14%), luminal B (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, Ki-67 ≥14%), luminal-HER2 (receptores hormonales positivos, HER2 positivo), HER2 enriquecido (receptores hormonales negativos, HER2 positivo), triple negativo basal like (receptores hormonales negativos, HER2 negativo y CK5/6 y/o EGFR positivo) y triple negativo no basal (receptores hormonales negativos, HER2 negativo, CK5/6 negativa y EGFR negativo) (63). En 2013 se ha añadido el porcentaje de receptores de progesterona >20% a la definición de luminal A (64).
- Luminal A (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, Ki-67 <13%), luminal B (receptores hormonales positivos y HER2 positivo o Ki-67 ≥13%), HER2 (receptores hormonales negativos, HER2 positivo) y triple negativo (receptores hormonales negativos, HER2 negativo) (65).
- También existe una clasificación jerárquica: si expresa receptores hormonales se clasifica en luminal o no luminal. Estos dos grupos, en función de la sobreexpresión de HER2, se dividirán en 4 subgrupos, y estos, a su vez, en función de marcadores basales, en 8 subtipos. En este estudio se define luminal 1 como receptores hormonales positivos, HER2 negativo; y luminal 2 como receptores hormonales positivos, HER2 positivo (66).

Claudin low es definido como receptores de estrógenos negativo, HER2 negativo y E-cadherina negativo (59).

2.6 Subtipos moleculares y su relación con la diferenciación celular en la mama

En el tejido mamario normal existen células madre mamarias con capacidad para diferenciar células epiteliales lumbales y mioepiteliales (67). Una célula madre daría origen a un progenitor común que se diferenciaría en progenitor luminal y mioepitelial, y estos progenitores se diferenciarían en células maduras de estirpe epitelial o mioepitelial. En función del momento en que se produjera la transformación neoplásica se originaría un subtipo molecular u otro.

Los subtipos luminal A y B derivarían de la transformación neoplásica del luminal maduro.

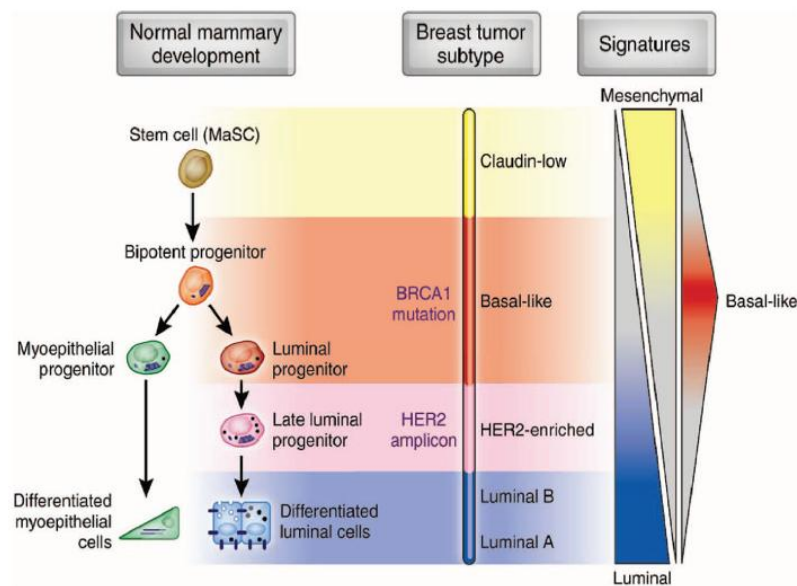


Figura 3: Desarrollo epitelial mamario y la relación con los subtipos intrínsecos de cáncer de mama (68).

Inicialmente se especuló que los tumores basal like procederían de una célula muy indiferenciada (de las células madre mamarias) debido a la falta de expresión de receptores hormonales y a tratarse de tumores pobremente diferenciados.

Lim et al. (69) encontraron que el tejido mamario de portadoras de mutación BRCA1 contenía una gran cantidad de progenitores luminales y encontraron una gran similitud con este progenitor (superior a la que existía en el resto de subgrupos). Observaron que el progenitor luminal estaba enriquecido con características basales, y que el subtipo basal like era el más similar al progenitor luminal. En este estudio señalaron el receptor de c-KIT (codificado por el gen KIT) como marcador del progenitor luminal, y describieron que c-KIT se encontraba ampliamente expresado en tumores basal like. Aunque normalmente los tumores basal like no expresan receptores hormonales, existe un porcentaje pequeño (en torno al 10-15%) que sí los expresa, hecho que encaja con el papel de BRCA1 en la diferenciación del progenitor mamario (receptor de estrógenos negativo) a célula luminal (receptor de estrógenos positivo) (17).

Posteriormente se realizó un estudio con ratones corroborando la tesis de que los tumores asociados a BRCA1 y los tumores basal like esporádico procedían de progenitores luminales más que de células madre basales. En dicho estudio se anuló la función de BRCA1 en células basales, células luminales y en sus respectivos progenitores, encontrando que los progenitores luminales generaban tumores similares al fenotipo BRCA1 y basal like esporádico en humanos, mientras que los progenitores basales generaban adenomioepiteliomas (70).

El subtipo claudin low procedería de las células madre mamarias. A raíz de la observación de que en tumores basal like tratados con quimioterapia sobrevivían una proporción de células claudin low, responsables del pobre pronóstico a pesar de la respuesta inicial al tratamiento, se generó la hipótesis de las células madre cancerígenas. Esta hipótesis sostiene que la mayor parte del tumor está constituido por células diferenciadas con escasa capacidad proliferativa, mientras que las células madre cancerígenas son las que mantienen el tumor y contribuyen a la resistencia al tratamiento (71). Al-Hajj et al. fueron los primeros que describieron la presencia de una subpoblación CD44+/CD24- en cáncer de mama con propiedades de células madre tumorales (67).

3 Triple negativo

3.1 Definición

Tumores que carecen de expresión de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y HER2. El punto de corte para la tinción de receptores hormonales se encuentra en el 1%.

3.2 Epidemiología

Suponen aproximadamente el 20% de los cánceres de mama diagnosticados en el mundo entero (cerca de 200.000 casos cada año en el mundo). En España el porcentaje descrito es algo inferior, en torno al 13% (8).

Estos tumores son más frecuentes en mujeres menores de 40 años (72) y de raza afro-americana (73).

La mayoría de los tumores triple negativo (50-80%) son basal like, y el resto claudin low y normal like (74).

3.3 Características histopatológicas

Normalmente son carcinomas ductales infiltrantes, de alto grado (grado 3 en el 85%) (75), con un índice de proliferación elevado (76), con áreas de necrosis, infiltrado linfocítico y un alto porcentaje de mutaciones en p53 (77).

3.4 Clínica

Con respecto a otros subtipos es más frecuente que se detecte por exploración clínica que por imagen, y con frecuencia se detectan en el intervalo entre mamografías (cánceres de intervalo) debido a su agresividad y a su rápido crecimiento.

No suelen presentar afectación ganglionar inicial, aunque sí un mayor riesgo de recurrencia regional y ganglionar (8, 63, 78). El patrón de metástasis muestra afinidad por pulmón y cerebro (en un estudio con 116 pacientes triple negativo metastásicas el 46% desarrolló metástasis cerebrales, y en el 14% la afectación cerebral fue el primer asiento de metástasis) (62, 79, 80).

3.5 Tratamiento

El manejo quirúrgico y radioterápico es similar al resto de los tumores de mama. Al tratarse de tumores normalmente unifocales y con márgenes bien delimitados, son buenos candidatos a cirugías conservadoras.

El interés suscitado por este tipo de tumores radica en el hecho de que, a pesar de la agresividad y el peor pronóstico, en este momento no disponemos de una estrategia terapéutica adecuada puesto que no se benefician de la hormonoterapia ni de la administración de fármacos dirigidos.

Son tumores particularmente sensibles a la quimioterapia, alcanzando una alta tasa de respuestas en comparación con otros subtipos, si bien esa alta tasa de respuestas no se traduce en un beneficio clínico. A este hecho se le denomina “la paradoja de los triple negativo”, y probablemente se explique por la alta tasa de recurrencia entre las pacientes con enfermedad residual, que hace que estos tumores tengan una supervivencia pobre en comparación con tumores que expresan receptores hormonales o HER2 (81, 82).

Quimioterapia neoadyuvante

La respuesta completa patológica (RCp) está asociada con un aumento en la supervivencia libre de enfermedad y en supervivencia global (81). Por este motivo se recomienda administrar quimioterapia neoadyuvante en estadios iniciales operables, además de en enfermedad localmente avanzada/inoperable.

En un estudio realizado por el MD Anderson en 1.118 mujeres de las que 255 fueron triple negativo, se objetivó una tasa de respuestas completas patológicas del 22% en los tumores triple negativo frente al 11% en el resto de subtipos. Sin embargo el riesgo de recurrencia y de muerte entre las mujeres triple negativo con enfermedad residual fue 1,5 veces superior al del resto de subgrupos, mientras que aquellas mujeres triple negativo que alcanzaron una respuesta completa patológica tuvieron una supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global equiparable a la del resto de subgrupos (81).

Los esquemas de quimioterapia neoadyuvante en tumores triple negativo incluyen antraciclinas y taxanos, administrados de forma concurrente o secuencial (43).

El tratamiento con platinos (cisplatino y carboplatino) ha resurgido en los últimos años como posible tratamiento en los tumores triple negativo. Esto es debido a que, al estar asociados a un déficit de BRCA1 (implicado en la reparación del ADN y en el control del ciclo celular), pueden ser más sensibles a agentes alquilantes de ADN. Se han llevado a cabo múltiples ensayos clínicos con platinos en neoadyuvancia: 74 pacientes triple negativo recibieron 8 ciclos de epirrubicina-cisplatino-paclitaxel logrando una RCp del 62% (83); 10 pacientes con BRCA1 mutado recibieron cisplatino neoadyuvante obteniendo una RCp del 90% y una RPP (respuesta parcial patológica) del 10% (84); 28 pacientes triple negativo recibieron 4 ciclos de cisplatino neoadyuvante alcanzando un 22% de RCp y un 64% de RPP (85). En el año 2014 se publicó un metanálisis ratificando el beneficio de incluir cisplatino o carboplatino en el tratamiento neoadyuvante, obteniendo de este modo elevadas tasas de respuestas completas patológicas, en torno al 45% (86).

La administración de quimioterapia en dosis densas (definido como menor intervalo de tiempo entre cada ciclo de tratamiento) es una opción prometedora tanto en neoadyuvancia (87) como en adyuvancia (88).

Un estudio demuestra cierta resistencia a taxanos y alcaloides de la vinca en tumores triple negativo BRCAness (con expresión disminuida de BRCA) (89).

Quimioterapia adyuvante

La quimioterapia adyuvante ha demostrado beneficio en pacientes triple negativo con tumores $\geq 0,5$ cm o con ganglios positivos (independientemente del tamaño) (45). Sobre tumores $< 0,5$ cm no existe recomendación de quimioterapia adyuvante debido a la falta de datos prospectivos.

En un estudio realizado en 6.644 mujeres con carcinoma de mama con ganglios positivos en las que se administró quimioterapia adyuvante comparando aquellas con receptores hormonales negativos frente a receptores hormonales positivos se observó una reducción del riesgo de 55% frente al 26% respectivamente, con un aumento en la supervivencia libre de enfermedad del 23% frente al 7% y de la supervivencia global del 17% frente al 4% (90).

Aunque no existe un régimen de quimioterapia adyuvante estándar la combinación de antraciclinas y taxanos es lo más utilizado (65, 91, 92). Dentro de la familia de los taxanos la utilización de paclitaxel semanal ha demostrado ser la mejor opción (93). La incorporación de capecitabina adyuvante a las antraciclinas y taxanos aumenta la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global a 5 años en este subgrupo (94).

El subtipo triple negativo es el que más se beneficia de la quimioterapia adyuvante en dosis densas (88), (95).

Quimioterapia paliativa

El uso de antraciclinas y taxanos en este contexto suele estar limitado al haberse utilizado previamente en adyuvancia o neoadyuvancia. No existe evidencia de beneficio de ningún agente en particular para este subgrupo en la enfermedad metastásica. La combinación de ixabepilona y capecitabina es una opción activa especialmente en tumores triple negativo (96). A diferencia de lo que ocurre en neoadyuvancia, las sales de platino en enfermedad avanzada no han demostrado, hoy por hoy, suficiente beneficio. En un estudio realizado en 53 pacientes triple negativo estadio IV se comparó la combinación de docetaxel-cisplatino versus docetaxel-capecitabina, demostrando un aumento en la tasa de respuestas (63% vs 15,4%), en la supervivencia libre de progresión (10,9 vs 4,8 meses) y en la supervivencia global (32,8 vs 21,5 meses) de la combinación con platino (97). En otro estudio realizado en 143 pacientes con cáncer de mama metastásico (93 triple negativo y 50 no triple negativo) que se trataron con una combinación con platino tras progresión a antraciclinas y taxanos, la tasa de respuestas fue superior en las pacientes con tumores triple negativo (33,3% vs 22%), pero no se objetivaron diferencias en supervivencia libre de progresión ni en supervivencia global (98).

Terapias biológicas

Numerosas dianas están siendo objeto de estudio en los últimos años (99), entre ellas cabe destacar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la angiogénesis, poli(ADP-ribosa)polimerasa, src, deacetilasas, death receptor 5 (DR5), receptor de andrógenos y PI3K.

A continuación enumero los principales avances en cada una de las principales dianas terapéuticas:

- EGFR

EGFR se sobreexpresa en los tumores de mama triple negativo. Actualmente disponemos de dos clases de agentes anti-EGFR: los anticuerpos monoclonales (cetuximab y panitumumab) y los inhibidores tirosina-quinasa (gefitinib, erlotinib, afatinib). Se han realizado ensayos clínicos fase II con cetuximab en combinación con platinos (carboplatino y cisplatino) con modesta actividad: un incremento en la tasa de respuestas del 10% (100, 101). La administración de inhibidores tirosina-quinasa como gefitinib y erlotinib en monoterapia o en combinación con quimioterapia tampoco ha demostrado ningún beneficio (102, 103).

- Antiangiogénicos

Datos preclínicos han mostrado un aumento de los niveles intratumorales del factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF) tanto en tumores triple negativo como en tumores basal like (104). Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que inhibe VEGF-A; en combinación con quimioterapia en tumores de mama metastásico ha demostrado un aumento en la tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión, sin incremento en la supervivencia global (105-108). Sunitinib es un inhibidor múltiple tirosina-quinasa (PDGF-R, VEGF-R, KIT, RET, CSF-1R) que ha sido evaluado en monoterapia y en combinación en cáncer de mama sin obtener resultados positivos (109).

- Inhibidores de PARP

Poli ADP ribosa polimerasa (PARP) es una molécula implicada en la reparación del daño celular a través del sistema de escisión de pares de bases (Base excision repair, BER). PARP1 es el miembro más importante de esta familia. Cuando se inhibe, el daño en la doble cadena de ADN se acumula y se repara vía BRCA1 por recombinación homóloga. Con la hipótesis de que los tumores triple negativo, dada la similitud con tumores asociados a BRCA1, tendrán dañada la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga, este subgrupo ha sido el blanco para la investigación de la combinación de inhibidores de PARP con agentes quimioterápicos que dañan el ADN.

Estudios con inhibidores de PARP como Olaparib han demostrado una supervivencia libre de progresión de 6 meses en pacientes con cáncer de mama avanzado con déficit de BRCA1 o BRCA2 (110). Iniparib logró un aumento en la tasa de respuesta, supervivencia libre de progresión y supervivencia global en

combinación con carboplatino y gemcitabina en un fase II en cáncer de mama triple negativo avanzado (111). El estudio fase III publicado en 2014 que comparó carboplatino-gemcitabina con/sin iniparib tras \leq 2 líneas de quimioterapia no alcanzó los objetivos primarios de supervivencia libre de progresión y supervivencia global, sin embargo en el análisis exploratorio sí se objetivó beneficio al administrarse en segunda y tercera línea (112). Veliparib alcanzó una tasa de respuestas del 37% en combinación con temozolamida en un fase II realizado en tumores de mama con BRCA mutado (113).

- Inhibidores del proto-oncogén Src

Dasatinib demostró en un fase II beneficio clínico en tumores de mama triple negativo (114).

- Inhibidores de acetilasa de histonas como vorinostat (115) o panobinostat (116).
- Inhibidores DR5 (death receptor 5).

Son anticuerpos monoclonales agonistas que inducen directamente la apoptosis de células tumorales. Tigatuzumab ha mostrado efecto sinérgico con los quimioterápicos abraxane y doxorubicina (117).

- Inhibidores de andrógenos.

La bicalutamida puede ser eficaz en un subgrupo de tumores triple negativo descrito por Lehmann, denominado luminal receptor de andrógeno (LAR) (118).

- Inhibidores PI3K.

Estos fármacos pueden ser eficaces en el subgrupo luminal receptor de andrógeno (LAR) de los tumores triple negativo, en los que el oncogén PIK3CA suele estar mutado (119-121).

3.6 Pronóstico

Los tumores triple negativos se caracterizan por un curso clínico más agresivo. Aparecen a edades más tempranas, presentan mayor tasa de recaída (especialmente en los tres primeros años, disminuyendo rápidamente después) y de metástasis viscerales y cerebrales, con una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (74).

3.7 Seguimiento

Las guías internacionales recomiendan el mismo seguimiento que los otros subtipos de cáncer de mama (45).

4 Basal like

4.1 Expresión genómica

El subgrupo denominado “basal like” se caracteriza por la expresión de genes presentes en las células mioepiteliales de la capa basal de los ductos mamarios, como los que codifican las citoqueratinas 5/6, 14 y 17.

4.2 Epidemiología

Representan el 15% de todos los tumores de mama. La gran mayoría de ellos (en torno al 75%) son tumores triple negativo. Las pacientes portadoras de mutaciones de BRCA1 presentan este fenotipo en un 60-80%. Estos tumores están sobrerrepresentados en mujeres premenopáusicas y en mujeres afroamericanas.

4.3 Características histopatológicas

Suelen ser carcinomas ductales infiltrantes, aunque en algunos casos son metaplásicos, medulares o adenoides quísticos. Normalmente presentan alto grado, elevada tasa de mitosis, necrosis central e infiltrado linfocitario estromal (122).

4.4 Características inmunohistoquímicas

Si bien en un principio la clasificación de los diferentes subtipos de cáncer de mama se realizó mediante microarrays de ADN complementario, los trabajos posteriores de Perou y Nielsen demostraron que la selección de este subtipo de tumores podía realizarse mediante la positividad inmunohistoquímica para CK5/6 y/o EGFR y la negatividad para receptores de estrógenos, progesterona y HER2, alcanzando una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100% (123, 124).

Han existido otros intentos de clasificación inmunohistoquímica de tumores basal like como la negatividad de receptores de estrógenos, progesterona y HER2 y la positividad para varias citoquinas (CK5/6, CK14, CK17) (125, 126), aunque estas definiciones parecen menos exactas y son menos utilizadas.

Se ha comprobado que más del 50% de los tumores basal like presentan mutaciones en p53 (el cual es un factor independiente pronóstico negativo) (127), frente al 20% que se observa en tumores de mama no seleccionados (47). El gen p53 (denominada “el guardián del genoma”) genera una proteína que desempeña un importante papel en el reconocimiento y reparación del daño celular, en la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S y G2/M y en la activación de la apoptosis. La mutación de p53 genera una proteína mutada más estable, con mayor vida media (que es detectada por inmunohistoquímica) e ineficaz, favoreciendo la acumulación de daño en el ADN y el consecuente desarrollo de tumores.

El 60% de los tumores basal like sobreexpresa EGFR (factor de mal pronóstico) (128, 129) frente al 8% de los tumores no basal like. También sobreexpresan VEGFR (130) y c-KIT (el 30% de los tumores basal like frente al 11% de tumores no basal like) (123, 131).

4.5 Clínica

Los tumores basal like debutan con menor afectación ganglionar que otros subgrupos aunque tienen mayor riesgo de recaída local y regional; y metastatizan con mayor frecuencia en cerebro y pulmón, y con menor frecuencia en hueso e hígado (62, 63).

4.6 Tratamiento

En la práctica los tumores basal like se tratan igual que los tumores triple negativo. La quimioterapia neoadyuvante tiene un papel trascendental en este subgrupo al alcanzar un alto porcentaje de respuestas completas patológicas. Se benefician de tratamiento de quimioterapia alquilante intensiva (87) y el uso de taxanos en estas pacientes aporta un beneficio incluso en los casos sin enfermedad ganglionar. Aunque muchos de estos tumores sobreexpresan EGFR, los inhibidores de este receptor no han demostrado aumento de supervivencia (100, 101).

4.7 Pronóstico

Son tumores agresivos y con mal pronóstico, con una mediana de supervivencia global de 6 meses tras el diagnóstico de metástasis (62).

5 Distinción entre triple negativo y basal like

Los tumores de mama triple negativo se definen por inmunohistoquímica, mientras que los tumores basal like se definen por expresión genética. Como hemos visto previamente, se ha buscado una definición inmunohistoquímica de basal like partiendo de la negatividad para receptores hormonales y HER2, pero en realidad existe un solapamiento de ambas entidades.

El porcentaje de tumores triple negativo no basal like oscila entre el 25 y el 50% (74, 77). Prat et al. clasificaron genéticamente una amplia muestra de tumores triple negativo: el 39-54% como basal like, el 25-39% como claudin low, el 7-14% como HER2, el 4-7% como luminal B, el 4-5% como luminal A y el 1% como normal like (57). En el año 2011 Lehmann et al. publicaron un estudio de expresión génica de 587 tumores triple negativos, dividiéndolos en seis subgrupos: basal-like 1 y basal-like 2, inmunomodulador, mesenquimal, célula madre mesenquimal y luminal receptor de andrógenos; en este estudio el 47% se clasificó como basal like, el 17% luminal A, el 12% normal like, el 6% HER2, el 6% luminal B y el 12% no se logró clasificar (132). En el año 2013 se publicó otro estudio molecular realizado en 412 tumores triple negativo, de los cuales el 78,6% fueron basal like, un 7,8% HER2, un 7% normal like, un 4,4% luminal B y un 2,2% luminal A (56).

Por otro lado el 15-30 % de los tumores basal like no serán triple negativo (expresarán receptores hormonales o serán positivos para HER2) (77, 133).

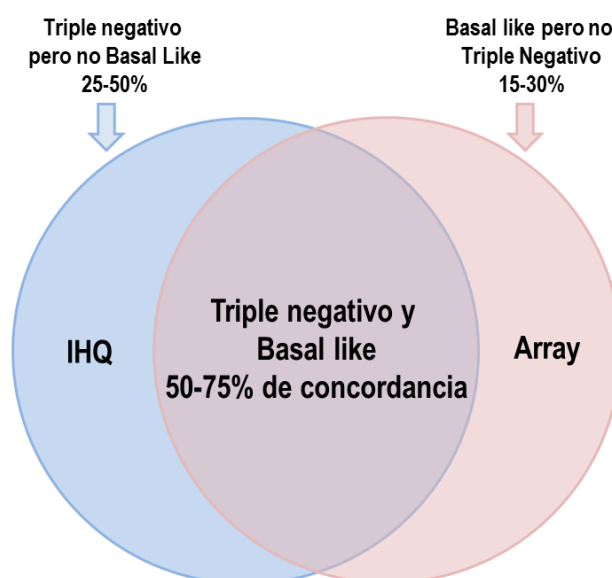


Figura 4: Solapamiento de los tumores triple negativo y basal like.

6 Triple negativo no basal

Los tumores triple negativo no basal se definen por inmunohistoquímica como receptores hormonales negativos, HER2 negativo, CK5/6 negativa y EGFR negativo (63).

Tiene una frecuencia inferior al subgrupo basal like, rondando el 20-30% de los triple negativo (74, 77). En una revisión de 10.159 cánceres de mama pertenecientes a 12 estudios se encontró una frecuencia de triple negativo no basal del 7% (683 tumores) frente al 9% (962 tumores) de basal like (66).

Existe controversia acerca de si este subgrupo realmente conforma una entidad aparte o si se trata de una mezcla de otros subtipos mal clasificados: HER2, luminal, claudin low y normal like (56).

Varios estudios demuestran mayor supervivencia que el subtipo basal like (66, 124).

En cuanto al patrón de lugar de metástasis presentan, igual que los tumores basal like, una alta tasa de metástasis cerebrales, pulmonares y adenopatías a distancia, y una baja tasa de metástasis óseas (62).

7 Gen BRCA1

7.1 Descripción

BRCA1 (BReast CAncer gene 1) es un gen supresor de tumores con herencia autosómica dominante, alta penetrancia y baja frecuencia.

Historia

En 1990 Hall et al. identificaron en Berkeley el ligamiento del cáncer de mama de inicio precoz con un punto específico del cromosoma 17, siendo confirmado por Claus et al. en 1991 (134). Posteriormente, Narod y col. mostraron la relación del cáncer de mama y de ovario hereditario con este locus 17q12-q23 (135). En 1994 Miki et al. clonaron el gen de este locus (136) y Albertsen et al. construyeron un mapa genético de alta resolución de la región 17q21 (137, 138).

Estructura

La región codificante del gen BRCA1 está formada por 5,5 kb (5.592 nucleótidos) que se extienden a lo largo de 120 kb de ADN genómico, desde el par de bases 38.429.551 hasta el par de bases 38.551.283. Consta de 24 exones (22 codificantes y dos no codificantes).

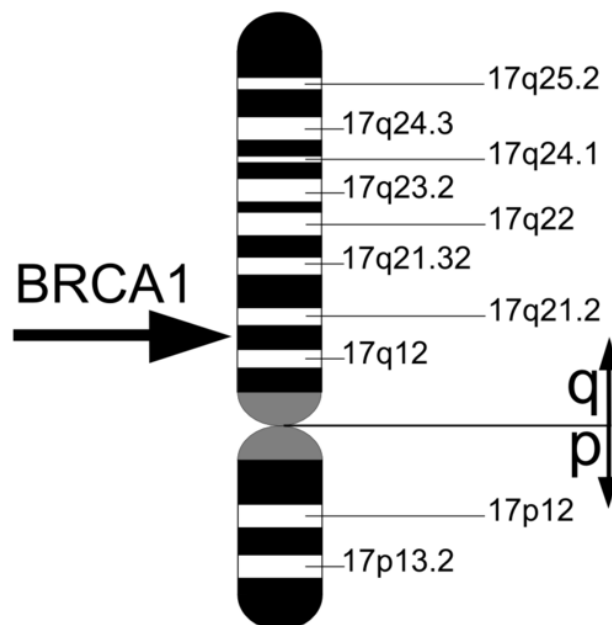


Figura 5: Imagen de la estructura del cromosoma 17.

7.2 ARN mensajero

El ARN mensajero de BRCA1 está constituido por 7,8 Kb. La transcripción es máxima en fase G1 tardía y permanece elevada durante la fase S (BRCA1 participará en la síntesis de ADN). En fase S tardía y en G2 disminuye la transcripción. Los mecanismos moleculares de regulación de la transcripción del gen no están claros, se conocen algunos inhibidores como Id4 o la expresión de p53.

7.3 Proteína

BRCA1 es una proteína de 1.863 aminoácidos. Su localización intracelular ha sido un tema de controversia. Actualmente se sabe que se localiza en el núcleo y que se expresa en la mayoría de los tejidos, por lo que su implicación preferente en cáncer de mama y ovario no está determinada por su patrón de expresión.

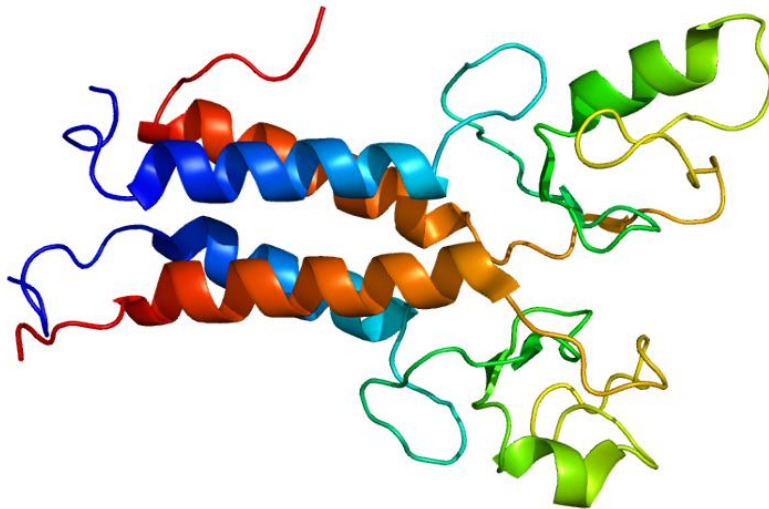


Figura 6: Estructura de la proteína BRCA1. Imagen obtenida del banco de datos de proteínas (PDB).

La proteína tiene 4 dominios:

- Anillo de zinc: situado en el extremo N-terminal (codificado por los exones 2 a 5). Esta región facilita las interacciones de proteínas con el ADN (136) y de proteínas entre sí (p.ej. con la proteína BARD1) (139). Además el anillo de zinc posee actividad ubiquitin E3 ligasa.
- Dominio de agrupación de serinas (Serine cluster domain): es una región codificada por los exones 11-13 y donde se producen frecuentes mutaciones. En este dominio se lleva a cabo la fosforilación de BRCA1 por las ATM (ataxia telangiectasia mutada) kinasas, las cuales se activan al producirse el daño de ADN.

- Dos dominios BRCT (BRCA1 carboxi-terminal). Están codificados por los exones 16 a 24. Tienen una importante función en la reparación del ADN (interaccionan con BRCA2) (140) y en la activación de la transcripción de otros genes (como el p21) (141).

La proteína BRCA1 interacciona con las siguientes proteínas:

- Componentes de la maquinaria de transcripción: ARN polimerasa II.
- Factores activadores de transcripción (Brg1, p300) y represores de transcripción (CtIP).
- Supresores de tumores: p53, RB1, BRCA2.
- Receptor de estrógenos alfa.
- Proteínas reparadoras de ADN: Rad51, Rad50.
- Proteínas reguladoras del ciclo celular: BARD1 (BRCA1 associated ring domain protein), E2F1.

En la figura 7 se muestran los lugares de interacción de BRCA1 con las proteínas:

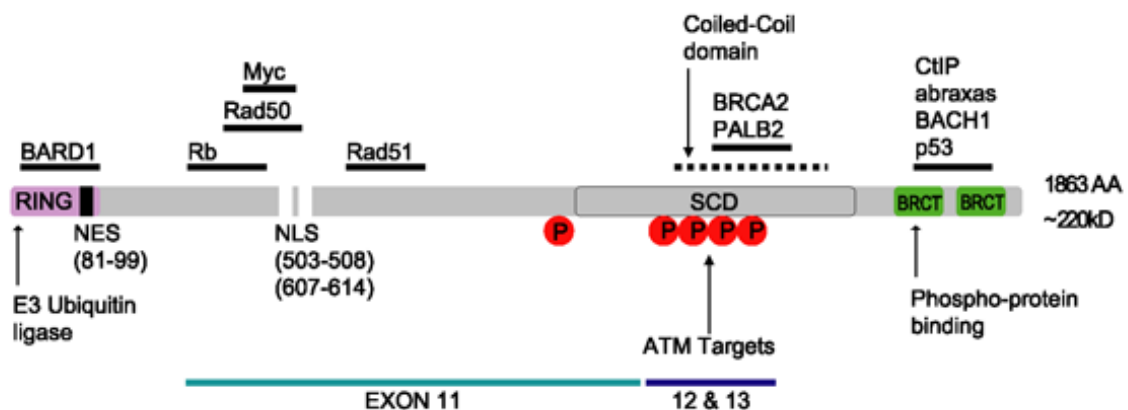


Figura 7: Imagen obtenida de <http://journals.sfu.ca/rncsb/index.php/csbj/article/view/csbj.201204005/65>.

7.4 Inmunohistoquímica

Se han diseñado numerosos anticuerpos frente a los diferentes dominios de la proteína BRCA1: frente al extremo aminoterminal (MS110, MS13, D-20, K-18, etc.), frente al exón 11 (8F7, 17F8) y frente al extremo carboxiterminal (AP16, I-20, C-20) (142, 143). Entre todos ellos, MS110 (Ab-1) ha demostrado ser el mejor para tejidos en parafina (144). Cuando el gen BRCA1 está mutado puede generarse una proteína truncada que altere la tinción por inmunohistoquímica. La región que con más frecuencia se pierde es el extremo carboxiterminal, por eso es importante el lugar de unión de los anticuerpos (145).

En cáncer de mama la distribución de la tinción de BRCA1 es variable, el 66% presentan exclusivamente tinción nuclear, el 33% tinción nuclear y citoplasmática (confiere un peor pronóstico) y un 1% sólo citoplasmática. La tinción que se considera positiva es la nuclear y la gradación más utilizada es por el porcentaje de tejido teñido (0 corresponde a ninguna tinción nuclear en el tejido, +1 a tinción nuclear en < 20% del tejido, +2 entre 20 y 80% y +3 > 80%) (142, 146).

La expresión de BRCA1 está aumentada en el tejido mamario normal y disminuida en el 20% de cáncer de mama esporádico y en el 80% de cáncer de mama triple negativo (144, 147). Con estos datos se puede intuir el papel trascendental de BRCA1 en este subgrupo.

7.5 Funciones

La proteína BRCA1 forma parte del sistema de detección y reparación de daños del ADN, desempeñando un importante papel en la reparación de la ruptura de la doble cadena de ADN a través de la recombinación homóloga. El ADN está sometido a agentes exógenos y endógenos que pueden modificarlo. Existen procesos como la replicación que también pueden provocar alteraciones en su estructura debido a la introducción de errores durante la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Para mantener la integridad del genoma existen diversos mecanismos de reparación del ADN. Los mecanismos más importantes de reparación (148) son:

- Recombinación homóloga (HDR: homology directed repair): consiste en reparar el ADN realizando una copia de una secuencia de ADN a partir de la cromátida hermana, de un cromosoma homólogo o del mismo cromosoma. La recombinación homóloga depende fundamentalmente de tres proteínas: ATM (ataxia telangiectasia mutada), BRCA1 y BRCA2. ATM se activa en respuesta al daño de ADN, fosforilando BRCA1, el cual activa la recombinación homóloga en cooperación con BRCA2 y RAD51 (complejo proteico conocido como BASC: BRCA1-associated genome surveillance complex) (149). Las células que carecen de BRCA1 son incapaces de reparar los daños de ADN, favoreciendo la inestabilidad genómica y el desarrollo de tumores. La recombinación homóloga se realiza fundamentalmente en las fases S y G2 del ciclo celular y es uno de los procesos más importantes en la resistencia a daños realizados por agentes quimioterápicos (alquilantes e inhibidores de topoisomerasa).

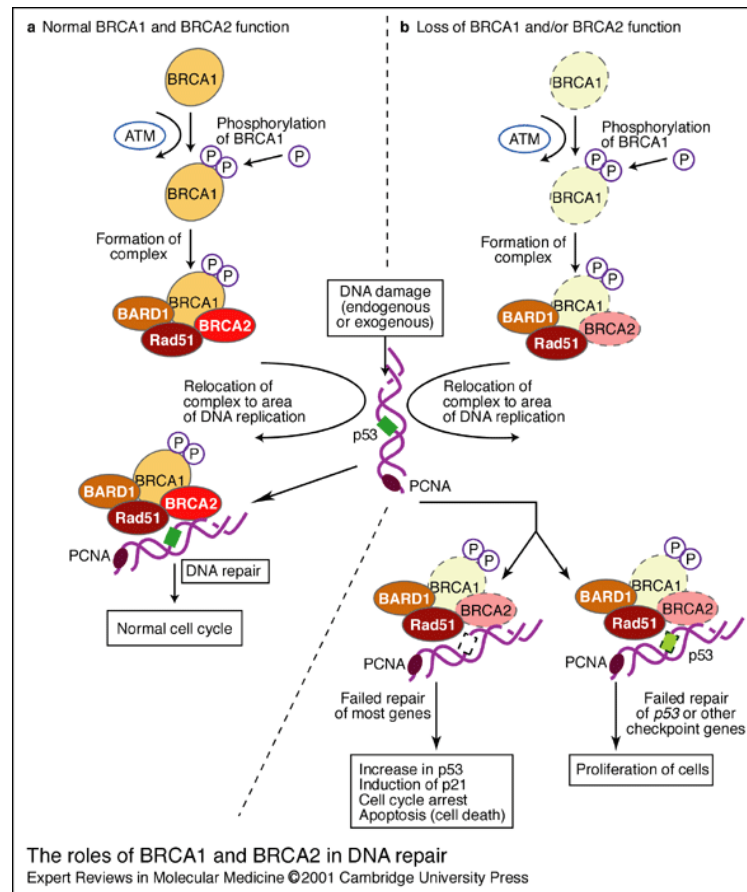


Figura 8: Esquema de las funciones de las proteínas BRCA1 y BRCA2. Obtenido de Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001.

- Recombinación no homóloga (NHEJ: non homologous end joining): se basa en la conexión de dos hebras rotas sin necesidad de que exista homología en la secuencia. Este mecanismo preserva el ADN a expensas de una potencial mutagénesis.
- Reparación por escisión de bases (BER: base excision repair): consiste en reemplazar la base perdida o modificada de ADN por la base correcta. Una glicosidasa escinde la base nitrogenada del nucleótido dañado, generando un sitio apurínico o apirimidínico. El esqueleto pentosa-fosfato residual es eliminado por una endonucleasa y finalmente sustituido por el nucleótido adecuado gracias a la actividad secuencial de ADN polimerasa y ADN ligasa.
- Reparación por escisión de nucleótidos (NER: nucleotide excision repair): consiste en retirar aductos o modificaciones de bases en el ADN y usar la cadena opuesta como plantilla para repararlos.
- Reparación de errores de replicación (MMR: mismatch repair): ocurre durante la replicación de ADN. Consiste en reconocer y eliminar el apareamiento incorrecto de bases y sintetizar esa zona a través de las ADN polimerasas.

Las funciones de BRCA1 son las siguientes:

1. Regulación del ciclo celular: interviene en el punto de control situado en G2/M (150).
2. Mantenimiento de la integridad del genoma a través de la reparación de la doble cadena de ADN mediante el mecanismo de recombinación homóloga (149).
3. Regulación de la transcripción: en parte interaccionando con la maquinaria transcripcional (ARN helicasa A y ARN polimerasa II), con factores activadores de transcripción (Brg1, p300) y con represores de transcripción (CtIP). Inhibe la transcripción de genes como receptor de estrógenos alfa o del oncogen c-Myc, y aumenta la transcripción de otros genes como el gen supresor de tumores p53 (151).
4. Regulación del proteoma: mediante su actividad ubiquitin ligasa y mediante la intervención en respuesta al choque térmico (juega un papel termoprotector activando el promotor de algunas proteínas implicadas en este proceso, como HSP27) (152).
5. Interviene en la diferenciación mamaria: en el paso del progenitor mamario (receptor de estrógenos negativo) a célula luminal (receptor de estrógenos positivo) (17).

7.6 Gen BRCA1 y cáncer

La mutación de BRCA1 produce una proteína truncada incapaz de ejercer su función de reparar el ADN. Esta incapacidad de reparar los daños en el ADN genera una gran inestabilidad genómica y pérdida de heterocigosidad. Se han descrito pérdidas de 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 12q, 16p y 18q y ganancia de 3q, 7p, 8q, 10p, 12p y 17q (153, 154). De este modo aumenta el riesgo de desarrollar tumores, principalmente cáncer de mama, pero también cáncer de ovario, endometrio, cérvix, próstata y páncreas (155).

Tipos de mutaciones:

El 70% de las mutaciones de BRCA1 son inserciones o deleciones puntuales que provocan la aparición de un codón de parada prematuro con el consecuente truncamiento de la proteína (156). También puede alterarse el proceso de eliminación de intrones -denominado splicing-, causando la pérdida completa o parcial de exones o la inserción de secuencias intrónicas.

En menor frecuencia se han descrito reordenamientos, duplicaciones y grandes deleciones (157). En tumores basal like el reordenamiento más frecuente es la duplicación en tándem (158).

Además existen numerosos polimorfismos, que, por definición, no están asociados a patología.

Detección de mutaciones:

Las mutaciones germinales (con la excepción de las mutaciones germinales esporádicas) estarán presentes en cualquier célula nucleada del organismo y podrán detectarse en ADN de linfocitos de sangre periférica. Las mutaciones somáticas sólo estarán presentes en el tumor.

Para determinar mutaciones conocidas consistentes en grandes deleciones y reordenamientos se emplea la técnica Southern Blot, y cuando se trata de mutaciones puntuales se utiliza la técnica de corte enzimático; aunque hoy en día ambas técnicas están en desuso.

Para detectar mutaciones desconocidas se han desarrollado múltiples técnicas. Cuando se buscan pequeños cambios de bases se puede utilizar alguno de los siguientes métodos: DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), SSPC (single-stranded conformation polymorphism), CSGE (conformation sensitive gel electrophoresis), DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography), PTT (protein truncation test), HRM (high resolution melting) o secuenciación.

Cuando buscamos grandes cambios (reordenamientos) como duplicaciones, inserciones o deleciones podemos utilizar MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification), MAPH (multiplex amplification and probe hybridization), QMPSF (quantitative multiplex PCR of shorts fluorescents fragments), HAD (heteroduplex analysis), CGH (comparative genomic hybridization) o NGS (next generation sequencing).

Mutaciones más frecuentes en BRCA1

La mutación 185delAG es la más frecuente en España. Otras mutaciones frecuentes en familias españolas son 243delA y 330A>G (159).

El 2% de los judíos asquenazíes presenta tres tipos de mutaciones: 185delAG, 188del11 o 5382insC del gen BRCA1 (160, 161). Probablemente la presencia en España de la primera mutación se deba a la presencia histórica de los judíos en la península.

7.7 Mutación de BRCA1 y cáncer de mama

7.7.1 Mutación de BRCA1 en cáncer de mama hereditario

La mutación de BRCA1 es responsable del 2-3% de los cánceres de mama (162). Se han detectado más de mil mutaciones de BRCA1 en los casos de cáncer hereditario (163).

Ser portadora de la mutación de BRCA1 confiere un riesgo de padecer cáncer de mama del 60-85% y cáncer de ovario del 15-40%. Dada la complejidad y la laboriosidad del estudio de este gen, así como su escasa prevalencia, se deben seleccionar los individuos y las familias a las que realizar dichos estudios.

Existen algunos criterios que discriminan aquellas pacientes en las que es más probable encontrar la mutación de BRCA1 (164):

- Un caso de cáncer de mama menor o igual a 40 años.
- Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en el mismo individuo.
- Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales menor de 50 años o bilateral.
- Un caso de cáncer de mama a edad menor o igual a 50 años o bilateral y un caso de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de primer o segundo grado.
- Dos casos de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Un caso de cáncer de mama en un varón y un familiar de primer o segundo grado con cáncer de mama u ovario.

Entre las mujeres menores de 50 años diagnosticadas de cáncer de mama se estima que el 10% tendrán mutación de BRCA (1 y 2), y en mujeres del subgrupo triple negativo menores de 50 años y/o con historia familiar de cáncer de mama y de ovario la prevalencia de mutación de BRCA1 ascenderá al 20% (165, 166).

El manejo de las mujeres sanas portadoras de la mutación BRCA1 requiere un manejo especializado y contempla las siguientes opciones (167):

- Cirugía de mama con carácter preventivo: mastectomía total.
- Vigilancia con resonancia magnética mamaria anual y examen mamario trimestral o semestral, comenzando el cribado entre los 25 y 30 años.
- Dado el alto riesgo de padecer un cáncer de ovario la salpingooforectomía bilateral preventiva es aconsejable después de los 35 años (si han cumplido sus deseos reproductivos). Esta intervención también reduciría el riesgo de cáncer de mama.

El cáncer de mama asociado a BRCA1 tiene peor pronóstico que el cáncer de mama esporádico, una edad de inicio más temprana y una mayor incidencia de cáncer de mama contralateral. Además el 80% de los tumores asociados a BRCA1 serán triple negativo y un alto porcentaje pertenecerá al subtipo basal like (168).

7.7.2 Mutación de BRCA1 en cáncer de mama esporádico

La mutación germinal de BRCA1 en cáncer de mama sin historia familiar es poco frecuente (169). Recientemente Couch et al. han publicado el estudio de 17 genes en 1.824 pacientes triple negativo sin historia familiar de cáncer de mama y ovario, detectando mutación de BRCA1 en el 8,5% (170).

Las mutaciones somáticas de BRCA1 en tumores esporádicos también son escasas (171, 172). En un estudio realizado en 77 pacientes triple negativo esporádico se describió tan sólo una mutación somática de BRCA1 (173).

La similitud histopatológica entre los tumores basal like esporádicos y los tumores encontrados en portadores de mutación en BRCA1 hizo pensar que este gen pudiera estar implicado en la patogénesis de los mismos, inactivándose por alguna vía distinta a la mutación. Corroborando esta teoría se evidenció una menor expresión del gen en estos tumores: la cantidad de ARN mensajero de BRCA1 era dos veces menor en el subtipo basal like que en el resto de subtipos (174).

Contrariamente a los tumores hereditarios, en los tumores esporádicos la mutación de BRCA1 parece conferir un mejor pronóstico con un menor riesgo de recaída y una mayor supervivencia global (173).

7.8 Hipermetilación del promotor

7.8.1 Epigenética

El término epigenética fue acuñado en 1939 por Conrad H. Waddington para referirse a “las interacciones casuales entre genes y sus productos lo cual da al fenotipo su ser” (175). Posteriormente fue definido como los cambios hereditarios en la expresión del gen que no se deben a alteraciones en la secuencia del ADN (176). Estas alteraciones moleculares son estables y heredables en las divisiones de las células somáticas.

Existen tres mecanismos principales de regulación genética: la metilación de ADN, la modificación de histonas y el ARN no codificante (177). El primero es el más conocido y lo desarrollaremos en el siguiente capítulo.

Modificación de histonas

Las histonas son proteínas implicadas en la compactación y empaquetamiento del ADN en el núcleo celular. El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina y está constituido por ocho histonas (octámero), dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Cada nucleosoma está rodeado por 1,7 vueltas de ADN.

La modificación de proteínas de la histona se refiere a los procesos de acetilación, metilación y fosforilación. La metilación puede darse en diversos grados (monometilación, dimetilación y trimetilación). Estos procesos se dan sobre los aminoácidos lisina (Lys), arginina (Arg) y serina (Ser) (178). Las consecuencias de la metilación de histonas dependen del residuo metilado y del sitio específico de metilación. La acetilación de lisinas en histonas está asociada con la activación transcripcional (179). Las células tumorales sobreexpresan histona deacetilasas, disminuyendo la transcripción de determinados genes supresores de tumores. Existen inhibidores de histona deacetilasas como vorinostat, el cual ha demostrado aumento en la tasa de respuestas de algunos tumores, como en el carcinoma no microcítico de pulmón en combinación con carboplatino y paclitaxel (180, 181).

ARN no codificante

El ARN de interferencia es una molécula pequeña (en torno a 20-25 nucleótidos) que silencia un gen de manera postranscripcional al unirse a un ARN mensajero complementario y degradarlo. Existen 3 tipos de ARN de interferencia: micro ARN, ARN interferente pequeño (siRNA) y ARN asociado a piwi. El número de genes inactivados por este mecanismo está aumentando en los últimos años (182).

7.8.2 Metilación de ADN

La metilación de ADN consiste en la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-metionina, a través de la familia de enzimas DNMT (DNA-citosín-metiltransferasas).

En el ser humano la metilación de ADN está restringida a la citosina (en el carbono 5) de los dinucleótidos CpG (citosina guanina enlazados por fosfatos), aunque también se ha descrito en CXG y CXX (siendo X: C, T o A). La metilación de citosina permite la conformación cerrada de la cromatina y la consecuente represión transcripcional.

Las regiones del genoma que se pueden afectar son cuatro:

1. Islas CpG: son regiones de ADN de más de 200 pares de bases que agrupan dinucleótidos CpG con al menos un 50% de nucleótidos C y G y un promedio de CpG observado/esperado mayor de 0,6. Normalmente no están metiladas y son un sitio de regulación de genes, de hecho el 60% de los promotores de genes contienen islas CpG.
2. Islas CpG shores: son regiones de menor densidad de C y G que las islas CpG. Se encuentran cerca de las islas CpG. Su metilación también está relacionada con la inactivación transcripcional.
3. Cuerpo del gen: la metilación en estas regiones favorecen la expresión del gen.

4. Secuencias repetitivas: protegen la integridad cromosómica, previniendo la inestabilidad cromosómica, la translocación y la disrupción génica.

Los patrones de metilación son establecidos durante el desarrollo germinal; en ocasiones se producen patrones de metilación erróneos que generan enfermedades como el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Angelman y el síndrome del cromosoma frágil X. A su vez, este patrón de metilación está modulado por factores ambientales como la dieta (la metionina, la colina, el ácido fólico y las piridoxinas añaden grupos metilo) o la exposición a carcinógenos. Durante el desarrollo tumoral también se modifica este patrón de metilación.

El primer hallazgo fue la hipometilación global de ADN en tumores humanos (183), a éste le siguió la identificación de inactivación de genes supresores de tumores y más tarde la regulación de genes de microARN.

La metilación de ADN juega dos papeles importantes en el cáncer. Por un lado contribuye a mutaciones puntuales en CpG de muchos genes reguladores (p53, RB1, NF1, BRCA1) y, por otro lado, suprime la expresión de genes como BRCA1.

Actualmente disponemos de dos grupos de fármacos inhibidores de la metilación: los análogos de nucleósidos (184) y los no análogos de nucleósidos. Los análogos de nucleótidos se intercalan en el ADN y de este modo inhiben la actividad de las DNMTs. A este grupo pertenecen 5-Azacitidina, Decitabina, SGI-110 y Zebularina. 5-Azacitidina (5-Aza-CR; Vidaza®) es un análogo del nucleósido citidina, a dosis bajas produce hipometilación al ser secuestrado por enzimas demetilantes, revirtiendo la metilación de ADN e impidiendo el silenciamiento genético; a dosis altas es citotóxico y tiene indicación en síndrome mielodisplásico de alto riesgo, leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica (185). 5-Aza-2-deoxicitidina (5-AzaCdR, decitabina; Dacogen®) (186), SGI-110 (187) y Zebularina (188) también poseen actividad en enfermedades hematológicas como la leucemia mieloide aguda. Los no análogos de nucleósidos no se incorporan al ADN y tienen una acción demetilante por mecanismos no bien conocidos; a este grupo pertenecen hidralazina, procainamida y flavonoides (189).

La metilación se puede medir en plasma. Es conocido el hecho de que los tumores liberan a sangre ADN por necrosis celular o por apoptosis (190). Más del 90% del ADN circulante en plasma procede del tejido tumoral. En un estudio que comparaba la metilación de ADN circulante en plasma de 10 genes supresores de tumores (APC, BIN1, BMP6, BRCA1, CST6, ESR-b, GSTP1, P16, P21 y TIMP3) en pacientes con cáncer de mama y en controles normales, se encontró mayor metilación en 7 de los genes supresores de tumores (APC, BIN1, BMP6, BRCA1, CST6, ESR-b, GSTP1, P16 y TIMP3) en pacientes con cáncer de mama en comparación con controles, y se demostró concordancia entre la metilación de ADN circulante en plasma y ADN tumoral. De este modo cambios en la metilación en plasma y en suero

podrían ser útiles para valorar el riesgo de cáncer, para realizar un diagnóstico precoz y para la monitorización durante o tras el tratamiento (191, 192).

En el cáncer de mama se han estudiado patrones de metilación en 30 líneas celulares, encontrando tres clústeres. Aunque de momento no se ha encontrado correlación significativa entre estos tres patrones de metilación y los distintos subgrupos de expresión génica en general, sí se ha descrito una relación entre el subtipo basal y dos clústeres de metilación (II y III), lo que induce a pensar que el patrón de metilación sí se correlacionará con los subtipos genómicos y que podrá ser el futuro de nuevas estrategias de tratamiento (193).

7.8.3 Hipometilación y cáncer

En los tumores existe una extensa hipometilación en regiones pobres en genes (183, 194) y ésta hipometilación aumenta conforme la lesión tumoral progresa (195).

La hipometilación produce en la célula tumoral:

- Inestabilidad cromosómica: la cual favorece la recombinación y conduce al desarrollo de deleciones, translocaciones y reordenamientos (196).
- Reactivación de transposones dentro del ADN, como las secuencias Alu (197).
- Disminuye la impronta genómica (198).

El ADN de los leucocitos es un biomarcador de la metilación del genoma, y se ha relacionado la hipometilación en leucocitos de sangre periférica como factor independiente de cáncer de colon (199), vejiga (200) y cabeza y cuello (201).

7.8.4 Hipermetilación

7.8.4.1 Hipermetilación del promotor y cáncer

Como hemos descrito anteriormente, el 60% de los promotores de genes humanos se asocian a islas CpG. La metilación del promotor consiste en la metilación de más del 50% de los dinucleótidos CpG y, al producirse en regiones reguladoras de genes supresores de tumores, contribuye a su inactivación y consecuentemente al desarrollo de tumores. Este hecho se ha demostrado en cáncer de vejiga (202), ovario y pulmón (203). Los genes afectados pueden estar implicados en el ciclo celular, en la reparación de ADN, en el metabolismo de carcinogénesis, en la interacción célula a célula, en la apoptosis y en la angiogénesis (204).

Los patrones de hipermetilación son específicos de cada tipo de cáncer. Por ejemplo: los gliomas pueden tener hipermetilación del promotor de los genes MGMT (O6-metil-guanin-DNA-metiltransferasa), EMP3

(proteína de membrana epitelial 3) o THBS1 (trombospondina 1); y los tumores de colon pueden tener hipermetilación de hMLH1, p16, p14, RARB2, SFRP1 y WRN.

El primer gen en el que se reportó hipermetilación del promotor fue el del retinoblastoma (205), y posteriormente se reportó en los genes VHL (206), p16 (207), hMLH1 (184) y BRCA1.

La hipermetilación del promotor puede ocurrir tanto en tumores esporádicos como en tumores hereditarios. En estos últimos actuaría como segundo evento (second hit) según el modelo de Knudson, como ocurre en cáncer gástrico hereditario con el gen CDH1, en donde la pérdida de heterocigosidad es infrecuente (208).

La hipermetilación en muchos casos indica peor pronóstico. La hipermetilación de p16 en el mieloma múltiple confiere una menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global (209). En el cáncer de ovario la hipermetilación del promotor de BRCA1 indica peor pronóstico que la inactivación del gen por mutación: Chiang et al. estudiaron la metilación y mutación de BRCA1 en 63 pacientes con cáncer de ovario, encontrando unas diferencias muy significativas en supervivencia libre de enfermedad (9,8 meses en pacientes con hipermetilación de BRCA1 frente a 39,5 meses en pacientes con BRCA1 mutado) y en supervivencia global (35,6 meses frente a 78,6 meses) (210).

Determinar la hipermetilación del promotor puede tener muchas utilidades futuras en los siguientes campos:

- Diagnóstico: sirva de ejemplo la hipermetilación de GSTP1 (glutatión S-transferasa) en el 80-90% de los carcinomas de próstata, permitiendo diferenciarlos así de las hiperplasias benignas de próstata (211).
- Pronóstico: la hipermetilación de DAPK confiere un peor pronóstico en el cáncer de pulmón (204).
- Predictor de respuesta al tratamiento: la hipermetilación de MGMT en gliomas predice una buena respuesta al tratamiento con temozolamida (212), la hipermetilación del promotor de BRCA1 puede servir como marcador de sensibilidad a inhibidores de PARP en tumores de mama y de ovario (213).
- Seguimiento: la hipermetilación de p15 en leucemia mieloide aguda.

7.8.4.2 Hipermetilación del promotor y cáncer de mama

En el cáncer de mama se ha demostrado metilación de las islas CpG en múltiples genes: BRCA1, APC, BIN1, BMP6, CST6, ESR-b, GSTP1, P16 y TIMP3 (191).

7.8.4.3 Hipermetilación de BRCA1

La hipermetilación es un mecanismo de inactivación de BRCA1 que puede actuar como primer o como segundo evento según la teoría de Knudson (214).

Como primer evento siendo el segundo evento una reducción de las copias de BRCA1 o aneusomía del cromosoma 17, que ocurriría como consecuencia de la hipermetilación (215-217).

Como segundo evento, siendo el primero una mutación germinal. Este supuesto es infrecuente, ya que cuando hay mutación germinal de BRCA1 normalmente el segundo alelo está delecionado (pérdida de heterocigosidad) (218).

La hipermetilación de BRCA1 se limita al cáncer de mama y ovario, infrecuentemente aparece en cáncer de pulmón (219) y de cérvix (220) y no se detecta en tejido mamario normal ni en otros tumores (colon (221), cavidad oral, etc.)

La hipermetilación de BRCA1 en cáncer de mama se ha asociado a tumores de alto grado (222), sin expresión de receptores de estrógenos y progesterona, HER2 negativo (223) y con peor pronóstico (224, 225).

7.8.4.3.1 Hipermetilación de BRCA1 en cáncer hereditario de mama

Se ha descrito hipermetilación del promotor de BRCA1 en cáncer de mama hereditario sin mutación de BRCA1/BRCA2 con mayor frecuencia que en esporádico. Honrado et al. estudiaron 50 pacientes con cáncer de mama hereditario sin mutación de BRCA1/BRCA2 detectando hipermetilación de BRCA1 en el 42% (215). Tapia et al. analizaron 47 biopsias de cáncer de mama hereditario sin mutación de BRCA1/BRCA2 encontrando hipermetilación de BRCA1 en el 51% (226).

La coexistencia de mutación germinal de BRCA1 e hipermetilación de BRCA1 es infrecuente (218). En la práctica podría decirse que son excluyentes (227); de hecho existen propuestas de analizar la hipermetilación del promotor de BRCA1 antes de realizar el complejo estudio mutacional en pacientes con criterios de estudio genético, de tal modo que si encontrásemos hipermetilación obviaríamos el estudio mutacional.

7.8.4.3.2 Hipermetilación de BRCA1 en cáncer de mama esporádico

La metilación de BRCA1 está descrita en el 9-30% de carcinomas de mama esporádicos (216, 217, 222, 224, 227, 228) y se encuentra en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama (174, 229).

Algunos tipos histológicos de cáncer de mama poco frecuentes tienen un mayor porcentaje de hipermetilación de BRCA1, como es el caso de los tumores medulares (en los que se encuentra hipermetilación en el 67%), los metaplásicos (en el 63% (174)) o los mucinosos (en el 55% (228)). Normalmente estas histologías se encuadran dentro del subtipo basal like.

7.9 Otros mecanismos de inactivación de BRCA1

BRCA1 puede encontrarse inactivado por otros mecanismos distintos a la metilación, como la inactivación de la transcripción por la sobreexpresión de Id4 (174, 230), la inactivación de ARN mensajero por microARN, la ubiquitinización de la proteína (231), la modificación de histonas o la inactivación de la proteína BRCA1 a través de la vía c-Akt (232) o de HMGA1 (233).

7.10 Concepto BRCAness

El concepto de tumores BRCAness surge al advertir la similitud que guardan algunos tumores que no presentan mutación de BRCA con tumores que sí presentan mutación en este gen. Este fenotipo incluye las siguientes características: receptores de estrógenos negativos, infiltración linfocítica, expresión de EGFR, amplificación de c-myc, mutación de TP53, pérdida de la formación de RAD51, inestabilidad genómica y sensibilidad a agentes que causan daño en la cadena de ADN.

El concepto BRCAness, por tanto, comprende todos los tumores en los que existe pérdida de función BRCA1/2 sin que exista mutación, y que comparten las características fenotípicas de los tumores BRCA mutado. Los tumores BRCAness en su mayoría son tumores triple negativo (234).

JUSTIFICACIÓN DEL **ESTUDIO**

Los tumores triple negativo suponen el 20% de todos los tumores de mama, en España el porcentaje descrito es del 13% (8). Estos tumores tienen un comportamiento agresivo, conllevan un mal pronóstico (62) y no disponemos de tratamientos específicos como en otros subtipos (no son útiles la hormonoterapia ni las terapias dirigidas antiHER2).

Por inmunohistoquímica los tumores triple negativo se pueden subdividir en tumores basal like (más frecuentes y con peor pronóstico) y tumores triple negativo no basal (66).

Los tumores triple negativo presentan un fenotipo similar a los tumores con mutación germinal de BRCA1 (168). En mujeres con tumores triple negativo con historia familiar de cáncer de mama y ovario y/o edad menor de 50 años el porcentaje de mutaciones germinales de BRCA1 descrito es del 20% (165, 166), y en mujeres con tumores triple negativo sin historia familiar ese porcentaje ronda el 8% (169, 170, 173). Sabemos que la mayoría de los tumores triple negativo (hasta un 80%) tienen disminuida la expresión de la proteína BRCA1 (144, 147). Este último hecho no se puede justificar exclusivamente por la mutación del gen, por lo que deben existir otros mecanismos distintos de inactivación de BRCA1, entre los que se encontraría la hipermetilación del promotor.

Existen pocos estudios que describan el porcentaje de metilación de promotor de BRCA1 en tumores triple negativo, y estos porcentajes son discordantes (entre el 15 y el 75%) (223, 235-238).

En este trabajo pretendemos realizar un estudio exhaustivo de los tumores triple negativo diagnosticados en nuestro medio, caracterizando por inmunohistoquímica los subgrupos basal like y triple negativo no basal, así como cuantificar la hipermetilación del promotor de BRCA1 en todos ellos ante la heterogeneidad de resultados existentes en la literatura.

OBJETIVOS

- Seleccionar dentro del grupo de pacientes diagnosticados de cáncer de mama en el Hospital Universitario de Salamanca, aquellos tumores triple negativo y estudiar mediante inmunohistoquímica la expresión de CK5/6, CK17 y EGFR, para determinar aquellos que pertenecen al subtipo basal like y al subtipo triple negativo no basal.
- Caracterizar los tumores determinando la expresión de Ki-67, c-KIT y p53.
- Comparar las variables clínicas (edad al diagnóstico, tamaño tumoral, grado histológico, índice de proliferación, ganglios afectados, presencia de metástasis, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y tratamientos recibidos) en los casos de cáncer de mama subtipo basal like y triple negativo no basal.
- Estudiar la hipermetilación del promotor de BRCA1 de todos los tumores.
- Comparar las variables clínicas entre los tumores triple negativo con metilación del promotor de BRCA1 y sin ella; y buscar asociación entre metilación y otras variables.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

Se han seleccionado todas las pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama subgrupo triple negativo en el Hospital Universitario de Salamanca entre los años 1997 y 2011, en total 91 pacientes.

2. Tipo de estudio

Es un estudio descriptivo retrospectivo. Hemos recogido los siguientes datos clínicos de las pacientes: fecha de diagnóstico, edad al diagnóstico, estado menstrual, tipo histológico, TNM clínico y patológico, Ki67, tipo de cirugía, tratamiento de radioterapia y de quimioterapia (neoadyuvante-adyuvante-paliativa y esquema utilizado), fecha de recaída, lugar de recaída o de metástasis y estado actual.

3. Muestras

Se ha utilizado tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina de todos los tumores. Las muestras se encontraban almacenadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Salamanca.

4. Inmunohistoquímica

En la muestra del tumor se ha determinado la expresión de las siguientes moléculas mediante inmunohistoquímica: citoqueratina 5/6, citoqueratina 17, EGFR, Ki-67, c-KIT y p53.

Hemos utilizado los siguientes anticuerpos de la compañía Dako:

- Citoqueratina 5/6: anticuerpo murino IgG1 M7327, con una dilución 1/50 y 20 minutos de incubación.
- Citoqueratina 17: anticuerpo murino IgG2 M7046, con una dilución 1/40 y 30 minutos de incubación.
- EGFR: anticuerpo murino IgG1 M3563, con una dilución 1/200 y 20 minutos de incubación.
- Ki-67: anticuerpo murino IgG2a M7249, con una dilución 1/150 y 20 minutos de incubación.
- c-KIT o CD117: anticuerpo A4502, con una dilución 1/750 y 20 minutos de incubación.
- p53: anticuerpo murino IgG2b M7001, con una dilución 1/200 y 20 minutos de incubación.

De esta manera hemos podido clasificar los tumores en basal like (receptores hormonales negativos, HER2 negativo y CK5/6 y/o EGFR positivos) y triple negativo no basal (receptores hormonales negativos, HER2 negativo, CK5/6 negativa y EGFR negativo).

5. Estudio de hipermetilación del promotor

5.1 Extracción de ADN tumoral de tejidos parafinados

Los tumores estaban fijados en formalina y embebidos en parafina para su análisis histológico. De esta manera la estructura de los tejidos y las proteínas se mantienen en buen estado, pero los ácidos nucleicos sufren modificaciones químicas y son difíciles de extraer.

Hemos utilizado el Kit de extracción de parafina QIAamp DNA Minikit.

En el procedimiento hemos seguido los siguientes pasos:

- **Desparafinado**
 - Colocar cortes de tejido en tubos Eppendorf de 2 ml.
 - Añadir 1.800 µl de xileno (en campana) seguido de vórtex.
 - Centrifugar a la máxima potencia durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Eliminar el sobrenadante mediante pipeteo.
 - Añadir 1.800 µl de xileno al pellet y de nuevo vórtex.
 - Centrifugar a la máxima potencia durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Eliminar el sobrenadante mediante pipeteo.
 - Repetir los lavados con xileno hasta comprobar la desaparición de la parafina, normalmente con tres lavados con xileno fue suficiente.
 - Posteriormente añadir 1.800 µl de etanol absoluto al pellet y vórtex.
 - Centrifugar a la máxima potencia durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Eliminar el sobrenadante mediante pipeteo.
 - Repetir el lavado con 1.800 µl de etanol absoluto un mínimo de 3 veces (tantos como lavados con xileno).
 - Eliminar el sobrenadante mediante pipeteo.
 - Incubar a 37° durante 30-60 minutos con los tubos abiertos para eliminar cualquier resto de etanol.
- **Extracción de ADN**
 - Resuspender el pellet seco en 180 µl de buffer ATL y añadir 20 µl de proteinasa K (libera el ADN de las proteínas que tiene asociadas), seguido de vórtex breve.
 - Incubar a 56° durante toda la noche para realizar un lisado completo.
 - Centrifugar brevemente para recoger todo lo evaporado.
 - Añadir al producto lisado 200 µl de buffer AL. Mezclar bien con pipeteo y con vórtex durante 15 segundos.
 - Incubar a 70°C durante 10 minutos.
 - Centrifugar brevemente para recoger todo lo evaporado.
 - Añadir 200 µl de etanol absoluto. Mezclar por pipeteo y por vórtex durante 15 segundos.

- Traspasar la mezcla del Eppendorf de 2 ml a columnas de purificación.
- Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar lo filtrado y añadir 500 µl de buffer AW1 a la columna.
- Centrifugar de nuevo a 8.000 rpm durante 1 minuto y eliminar lo filtrado.
- Añadir 500 µl de buffer AW2 a la columna y centrifugar a la máxima potencia durante 3 minutos.
- Eliminar lo filtrado y repetir la centrifugación 1 minuto para eliminar cualquier posible resto.
- Colocar la columna en un tubo Eppendorf nuevo y eluir el ADN en 50 µl de buffer AE.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1-5 minutos y después centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
- Cuantificación del ADN mediante NanoDrop 2.000 y congelar a -70°C.

5.2 Métodos para la medición de la metilación del promotor

Los métodos para la medición de la metilación del promotor han experimentado un importante desarrollo durante la década pasada. Hoy ya se puede analizar la metilación de todo el genoma (denominado metiloma) con una resolución de un par de bases. En la figura 9 se ilustran los métodos de análisis de metilación de ADN (239):

Pretreatment	Analytical step			
	Locus-specific analysis	Gel-based analysis	Array-based analysis	NGS-based analysis
Enzyme digestion	<ul style="list-style-type: none"> • <i>HpaII</i>-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Southern blot • RLGS • MS-AP-PCR • AIMS 	<ul style="list-style-type: none"> • DMH • MCAM • HELP • MethylScope • CHARM • Mmass 	<ul style="list-style-type: none"> • Methyl-seq • MCA-seq • HELP-seq • MSCC
Affinity enrichment	<ul style="list-style-type: none"> • MeDIP-PCR 		<ul style="list-style-type: none"> • MeDIP • mDIP • mCIP • MIRA 	<ul style="list-style-type: none"> • MeDIP-seq • MIRA-seq
Sodium bisulphite	<ul style="list-style-type: none"> • MethyLight • EpiTYPER • Pyrosequencing 	<ul style="list-style-type: none"> • Sanger BS • MSP • MS-SNuPE • COBRA 	<ul style="list-style-type: none"> • BiMP • GoldenGate • Infinium 	<ul style="list-style-type: none"> • RRBS • BC-seq • BSPP • WGSBS

AIMS, amplification of inter-methylated sites; BC-seq, bisulphite conversion followed by capture and sequencing; BiMP, bisulphite methylation profiling; BS, bisulphite sequencing; BSPP, bisulphite padlock probes; CHARM, comprehensive high-throughput arrays for relative methylation; COBRA, combined bisulphite restriction analysis; DMH, differential methylation hybridization; HELP, *HpaII* tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR; MCA, methylated CpG island amplification; MCAM, MCA with microarray hybridization; MeDIP, mDIP and mCIP, methylated DNA immunoprecipitation; MIRA, methylated CpG island recovery assay; Mmass, microarray-based methylation assessment of single samples; MS-AP-PCR, methylation-sensitive arbitrarily primed PCR; MSCC, methylation-sensitive cut counting; MSP, methylation-specific PCR; MS-SNuPE, methylation-sensitive single nucleotide primer extension; NGS, next-generation sequencing; RLGS, restriction landmark genome scanning; RRBS, reduced representation bisulphite sequencing; -seq, followed by sequencing; WGSBS, whole-genome shotgun bisulphite sequencing.

Figura 9: Métodos de análisis de metilación de ADN (239).

En función del número de islas CpG analizadas en cada genoma y del número de muestras que se pueden estudiar a la vez, obtenemos la siguiente figura (239):

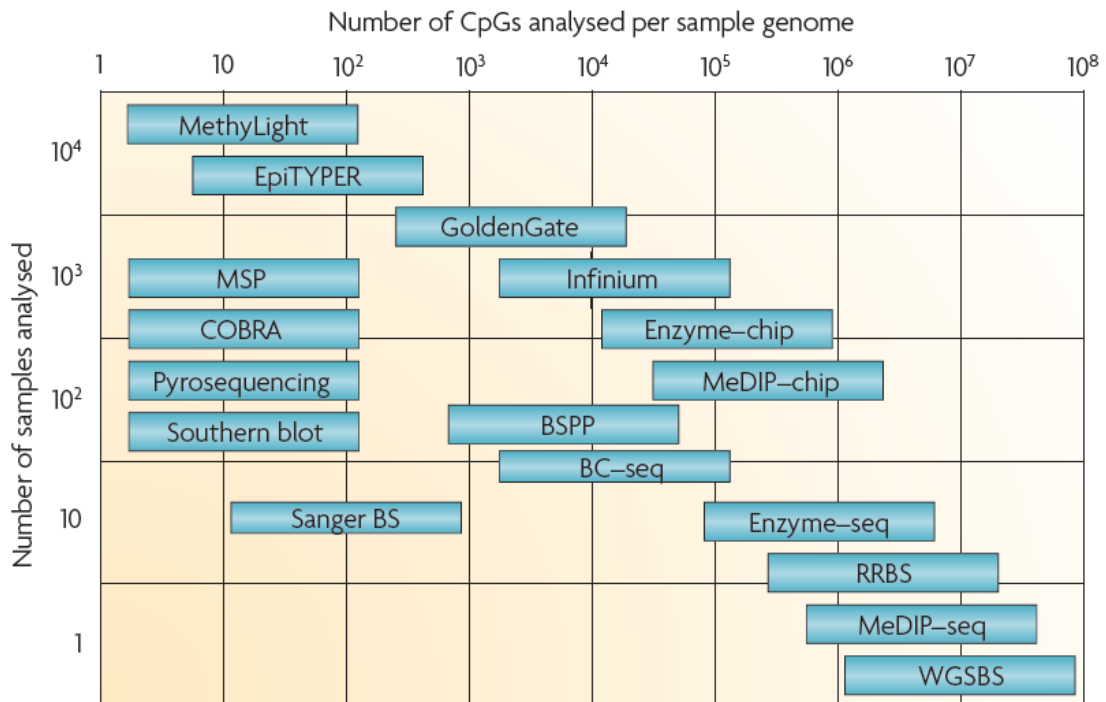


Figura 10: Gráfico de los métodos de análisis de metilación de ADN en función del número de islas CpG metiladas y del número de muestras que se pueden estudiar a la vez (239).

Existen tres formas de medir la metilación del promotor: por endonucleasas de digestión, por anticuerpos específicos o por conversión del bisulfito.

- Endonucleasas de digestión:

Consiste en realizar la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción (como las enzimas HpaII y la SmaI). Cada enzima de digestión va acompañada de una ADN metiltransferasa que protege el ADN endógeno. Algunas enzimas de digestión son inhibidas por las citosinas metiladas. Posteriormente se realiza un gel de electroforesis y se hibrida en Southern blot (240) o PCR. Aunque son técnicas sencillas tienen el problema de que requieren grandes cantidades de ADN y del alto número de falsos positivos debido a la incompleta digestión del ADN.

La evolución de estas técnicas se condensa en el método DMH (Differential Methylation Hybridization) que utiliza la tecnología de microarrays y que puede medir simultáneamente el estado de metilación de todas las islas CpG (241).

- Anticuerpos específicos de regiones metiladas:

Utilizan anticuerpos específicos de citosinas metiladas (242).

- Técnica del bisulfito:

Esta técnica surgió al evidenciar que tratando el ADN con bisulfito sódico seguido de un tratamiento alcalino se producía la desaminación del residuo no metilado de la citosina no metilada convirtiéndola en uracilo (UpG), mientras que la citosina metilada quedaba intacta (mCpG) (243). De este modo una diferencia epigenética se transformaba en una diferencia genética. (Figura 11).



Figura 11: Estructura molecular de citosina, citosina metilada y uracilo (producto de la desaminación de la citosina no metilada al ser tratada con bisulfito sódico).

Las secuencias alteradas son analizadas por PCR con primers que reconocen las zonas de ADN alteradas por el bisulfito. Estas técnicas requieren mucha menos cantidad de ADN (permitiendo el estudio de tumores conservados en parafina) y son técnicas relativamente rápidas. Entre las técnicas que utilizan el método del bisulfito se encuentran:

- MS-PCR (Methylation-Specific PCR) (244).
- MethyLight: fue descrito en el año 2.000 por Eads et al. (245). Es un método muy sensible capaz de detectar alelos metilados en presencia de más de 10.000 veces de exceso de alelos no metilados. Tras la conversión por el bisulfito, el ADN es amplificado por PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando primers que llevan sondas de oligonucleótidos con tinciones fluorescentes 5'FAM y 3'TAMRA. Las nucleasas TaqADN rompen la sonda y liberan la sustancia fluorescente, que es captada por un detector láser (ABI Prism). Tras cruzar un umbral la amplificación por PCR muestra una señal fluorescente proporcional a la cantidad del producto de PCR generado.
- QAMA (Quantitative Analysis of Methyalted Alleles). Fue descrito en el año 2.004 por Zeschngk et al. (246). Es una versión cuantitativa de MethyLight. Utiliza las sondas TaqMan, que son muy específicas, discriminando cambios incluso en un par de bases. Se utilizan unos primers que amplifican alelos metilados y no metilados tras ser tratados con la técnica del bisulfito, y una

sonda fluorescente de metilado (VIC) y no metilado (FAM). La cantidad de fluorescencia de FAM y VIC es medida tras cada ciclo.

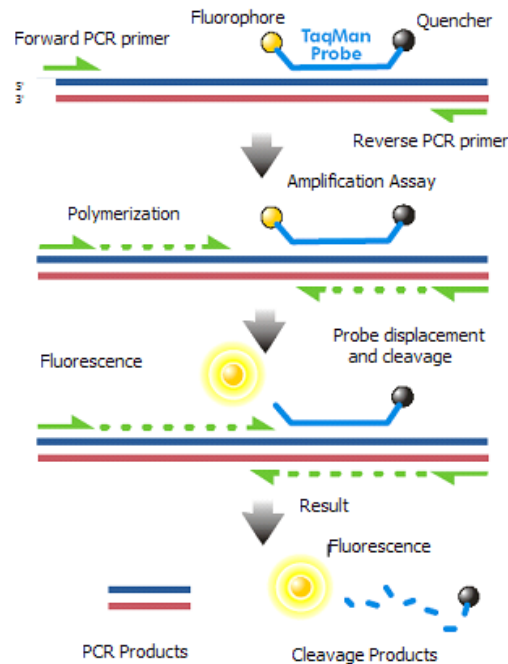


Figura 12: Esquema de funcionamiento de QAMA (246).

El número de ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral de detención es llamado ciclo umbral (Ct, cycle threshold). La diferencia de ambos Ct (llamado ΔCt) se calcula como $Ct-FAM - Ct-VIC$. Con el ΔCt cuantificamos el ratio metilado - no metilado, obteniendo una curva sigmoideal similar a la de la figura 13 (192).

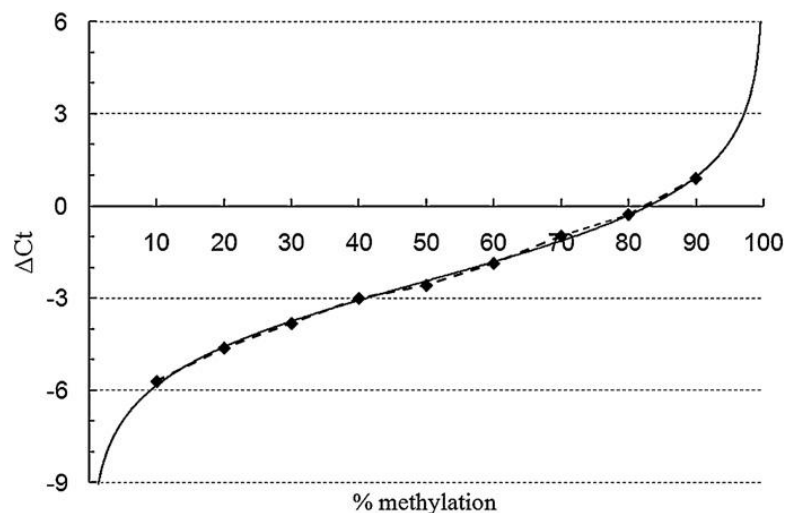


Figura 13: Curva de porcentaje de metilación en función del ΔCt (192).

- EpiTYPER: no hibrida ni secuencia, detecta la metilación con la técnica del bisulfito por espectrometría de masas (MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight). Realiza un análisis cuantitativo de múltiples CpG de muchos genes (247).

5.3 Modificación de ADN por la técnica de bisulfito

Reactivos utilizados

- Bisulfito sódico 4M pH 5 (7,6 g de bisulfito sódico + 20 ml H₂O + 500 µl NaOH 10M). Casa Sigma-Batch o24K0119. Produce la desaminación en las citosinas no metiladas.
- Hidroxiquinona 16.4 mM (90 mg en 50 ml). Es un agente antioxidante que evita la pérdida de efectividad y las roturas de las cadenas de ADN. Casa Sigma_096K1246.
- NaOH 3M (1,2 g en 10 ml de H₂O Braun). Permite la desnaturalización de ADN, ya que la desaminación se produce en la cadena sencilla de ADN.

La modificación de ADN por la técnica de bisulfito consta de los siguientes pasos:

○ **Modificación de ADN**

- Poner 1 µg de DNA en 50 µl de H₂O en un Eppendorf. Utilizar un control que es H₂O.
- Añadir 5,7 µl de NaOH 3M e incubar 10-15 minutos a 37°C.
- Añadir 33 µl de hidroxiquinona 20 mM y después 530 µl de bisulfito sódico.
- Incubar a 50°C tapado durante 16-17 horas.

○ **Purificación con sistema de vacío.**

Se ha utilizado el Kit Promega (ref #A7280).

- Añadir 1 ml de resina, abrir el sistema de vacío y añadir la muestra.
- Cuando el contenido haya bajado, añadir al Eppendorf 1 ml de Isopropanol al 80% y, cuando haya bajado otra vez el contenido, volver a añadir 1 ml de Isopropanol al 80%.
- Poner las columnas en los Eppendorf que ya teníamos y centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm (para eliminar los restos de Isopropanol).
- Añadir 50 µl de agua Braun a 50°C y eluir el contenido de la columna en un Eppendorf nuevo.
- Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.

○ **Precipitación**

- Añadir a los tubos con el ADN purificado 5,7 µl de NaOH 3M e incubar durante 10-15 minutos a 37°.
- Añadir 1 µl de glucógeno 10 mg/ml y después 17 µl de AcNH₄ 10M.
- Precipitar con etanol absoluto frío (450 µl) e incubar a -70°C durante 2,5 horas.
- Centrifugar durante 20 minutos a 12.000 rpm a 4°C.
- Tirar el sobrenadante.

- Lavar con etanol 70% frío (450 μ l).
- Centrifugar durante 20 minutos a la máxima velocidad.
- Eluir el sobrenadante.
- Secar el pellet durante toda la noche y resuspender en 30 μ l de H₂O Braun.
- Obtenemos una determinada concentración de ADN que medimos con el espectrofotómetro NanoDrop 2.000.

5.4 Medición de la metilación del promotor de BRCA1

El método de medición de la metilación del promotor que hemos utilizado es el QAMA (Quantitative Analysis of Methylated Alleles). El volumen final utilizado en la PCR ha sido de 20 μ l (10 μ l de TaqMan Master Mix, 2 μ l de ADN tratado con bisulfito, 2,5 U de AmpliTaq (polimerasa), 2,5 μ M de cada uno de los primers y 150 nM de sonda fluorescente de metilado y no metilado).

Se realiza una PCR con la desnaturalización a 95°C durante 10 minutos para activar AmpliTaq polimerasas, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C de 15 segundos y reconocimiento y extensión a 60°C durante 1 minuto.

Hemos usado VIC MGB TaqMan para hibridar con la secuencia derivada del alelo metilado y FAM MGB TaqMan para unirse a la secuencia generada por el alelo no metilado.

La cantidad de fluorescencia de FAM y VIC ha sido medida tras cada ciclo usando un sistema de PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real (también llamada PCR cuantitativa en tiempo real, RTQ-PCR) amplifica y cuantifica simultáneamente el ADN. El producto de la PCR en tiempo real se duplica en cada ciclo, y las sondas que se unen al ADN de doble cadena emiten fluorescencia, que es recogida por el termociclador. La gráfica que representa esta fluorescencia con respecto al número de ciclos da una curva sigmoideal, con una parte lineal entre 10 y 90% de ADN metilado. El punto en el que la fluorescencia comienza a incrementarse rápidamente se denomina ciclo umbral (cycle threshold, Ct). La diferencia de ambos Ct (llamado Δ Ct) se calcula como Ct-FAM – Ct-VIC. Cada muestra ha sido medida por duplicado, y es la media la que se ha usado para posteriores análisis.

La secuencia de los primers del promotor que hemos utilizado ha sido:

Forward primers: 5'-GGAGTTTGGGGTAAGTAGTTTTGTAAG-3'.

Reverse primers: 5'-TTCCCCTACCCCAAACAATT-3'.

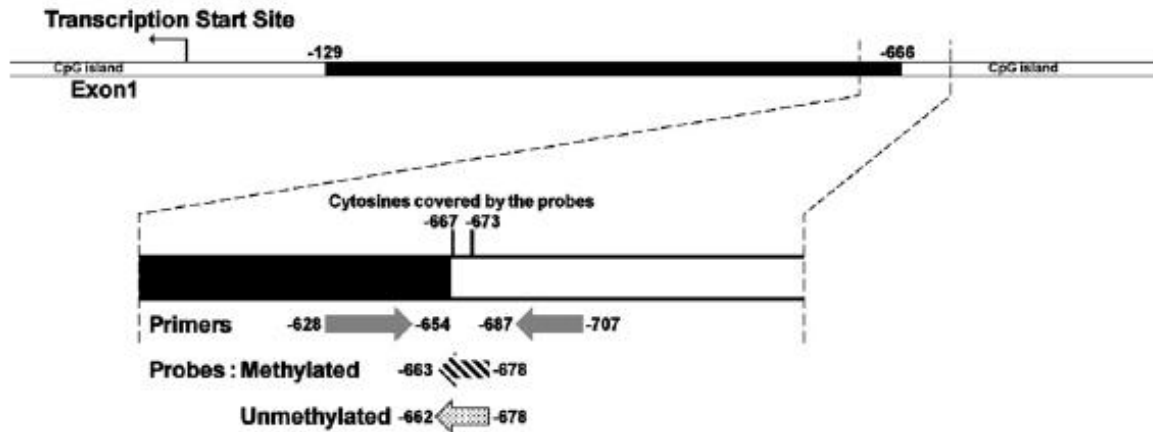


Figura 14: Esquema de la posición de los sitios CpG en el promotor de BRCA1 reconocidos por las sondas de QAMA (192).

Hemos usado tres controles: control bisulfitado metilado, control bisulfitado no metilado y ADN no metilado.

6 Estudio estadístico

Se ha realizado un análisis estadístico de los datos mediante el paquete estadístico SPSS versión 15.0. Hemos utilizado el método Chi-cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher para contrastar frecuencias de variables, curvas de Kaplan-Meier para calcular supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global y el estadístico log-rank para comparar los grupos.

Para estudiar el conjunto de las pacientes hemos utilizado el método MDS (multidimensional scaling), representando en dos dimensiones las diferencias existentes a partir de las variables dicotómicas recogidas, y el análisis de conglomerados (cluster analysis).

La fecha de diagnóstico se ha definido como la fecha del primer análisis anatomopatológico.

La supervivencia libre de enfermedad ha sido calculada con la fecha inicial del diagnóstico y la fecha del evento (recidiva locorregional, aparición de metástasis, aparición de un segundo primario infiltrante o el último contacto en caso de no suceder ningún evento anterior). Se han excluido del análisis los casos con enfermedad diseminada al diagnóstico.

La supervivencia global ha sido calculada con la fecha inicial del diagnóstico y la fecha de evento (fallecimiento o último contacto en caso de no haber fallecido).

RESULTADOS

1. Características de las pacientes

Se han incluido 91 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo en el Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Salamanca entre los años 1997 y 2011.

La división de los tumores triple negativo se ha realizado según la clasificación inmunohistoquímica más utilizada: basal like definido como receptores hormonales negativos, HER2 negativo y CK5/6 y/o EGFR positivo; y triple negativo no basal definido como receptores hormonales negativos, HER2 negativo, CK5/6 negativa y EGFR negativo (63). Con esta definición las 91 pacientes han sido agrupadas del siguiente modo: 46 pacientes con tumores basal like (50,5%) y 45 pacientes con tumores triple negativo no basal (49,5%).

Empleando otras clasificaciones menos frecuentes como basal like CK5/6 y/o EGFR y/o CK17 positivo (80) aumenta el número de basal like a 69 pacientes (75,8%) y desciende el de triple negativo no basal a 22 pacientes (24,2%). La tabla 2 expone la distribución de los tumores triple negativo según la clasificación inmunohistoquímica que utilizamos:

Tabla 2: Inmunohistoquímica para distinguir tumores basal like y tumores triple negativo no basal.

	Total	Basal like n (%)	Triple negativo no basal n (%)
CK5/6 y/o EGFR	91	46 (50,5)	45 (49,5)
CK5/6, EGFR y/o CK17	91	69 (75,8)	22 (24,2)

La mediana de edad de las pacientes de la muestra fue 57 años (rango 31-89) y la edad media de 57,89 años con una desviación típica de 14,85. 32 mujeres (35,2%) eran menores de 50 años y 59 (64,8%) \geq 50 años. (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Edad de las pacientes: mediana y rango.

Edad	Total n: 91	Basal like n: 46	TN no basal n: 45
Mediana	57	57,5	57
Rango	31-89	33-89	31-86

Tabla 4: Edad de las pacientes.

Edad	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
< 50 años	32 (35,2)	16 (34,8)	16 (35,6)
\geq 50 años	59 (64,8)	30 (65,2)	29 (64,4)

El 65,9% de las mujeres eran postmenopáusicas al diagnóstico. (Tabla 5).

Tabla 5: Estado menstrual al diagnóstico de las pacientes. Chi cuadrado, $p=0,88$.

Estado menstrual	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
Premenopáusica	31 (34,1)	16 (34,8)	15 (33,3)
Postmenopáusica	60 (65,9)	30 (65,2)	30 (66,7)

19 pacientes tenían realizado el estudio genético de BRCA1 y BRCA2 por cumplir criterios de historia familiar de cáncer de mama y ovario y/o edad menor de 40 años. En seis pacientes se encontró mutación de BRCA1 (tres tumores basal like y tres tumores triple negativo no basal) y en dos pacientes mutación de BRCA2 (uno basal like y uno triple negativo no basal).

2. Características de los tumores

De los 91 tumores incluidos en el estudio, 80 (87,9%) fueron carcinomas ductales infiltrantes, 3 (3,3%) carcinomas lobulillares infiltrantes, 3 (3,3%) carcinomas medulares infiltrantes, 3 (3,3%) carcinomas metaplásicos y 2 (2,2%) carcinomas mixtos (ductal/lobulillar infiltrantes). No existen diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 6).

Tabla 6: Tipos histológicos. Chi cuadrado, $p=0,42$.

Anatomía patológica	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
Ductal infiltrante	80 (87,9)	42 (91,3)	38 (84,4)
Lobulillar infiltrante	3 (3,3)	0 (0)	3 (6,7)
Medular	3 (3,3)	2 (4,3)	1 (2,2)
Metaplásico	3 (3,3)	1 (2,2)	2 (4,4)
Mixto	2 (2,2)	1 (2,2)	1 (2,2)

El 80% de los tumores eran T1-2 al diagnóstico. No encontramos diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 7).

Tabla 7: Frecuencia de tumores en función del T. Chi cuadrado, $p=0,10$.

T	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
T1	29 (31,9)	10 (21,7)	19 (42,2)
T2	45 (49,5)	25 (54,3)	20 (44,4)
T3	8 (8,8)	4 (8,7)	4 (8,9)
T4	9 (9,9)	7 (15,2)	2 (4,4)

El 63% de los tumores no tenían afectación ganglionar inicial. Observamos que el número de ganglios afectados (N) es superior en los tumores basal like que en los tumores triple negativo no basal (diferencia que alcanza la significación estadística, $p=0,002$) (tabla 8); sin embargo cuando agrupamos la afectación ganglionar según ganglios positivos o negativos (sin tener en cuenta el número) las diferencias dejan de ser estadísticamente significativas (tabla 9).

Tabla 8: Frecuencia de tumores en función del N. Chi cuadrado, $p= 0,002$

N	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
N0	58 (63,7)	32 (69,6)	26 (57,8)
N1	19 (20,9)	3 (6,5)	16 (35,6)
N2	10 (11)	7 (15,2)	3 (6,7)
N3	4 (4,4)	4 (8,7)	0 (0)

Tabla 9: Frecuencia de tumores en función de la afectación ganglionar. Chi cuadrado, $p= 0,24$.

Afectación ganglionar	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
N negativo	58 (63,7)	32 (69,6)	26 (57,8)
N positivo	33 (36,3)	14 (30,4)	19 (42,2)

Más de la mitad de los tumores (el 53,8%) debutan como estadio II. La distribución queda reflejada en la tabla 10. Al dividirlos en función de basal like o triple negativo no basal no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10: Distribución por estadios al diagnóstico. Chi cuadrado, $p= 0,23$.

Estadio	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
I	18 (19,8)	7 (15,2)	11 (24,4)
II	49 (53,8)	23 (50)	26 (57,8)
III	20 (22)	14 (30,4)	6 (13,3)
IV	4 (4,4)	2 (4,3)	2 (4,4)

En el 84,6% de los tumores el grado histológico de malignidad fue alto (grado 3). No encontramos diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 11).

Tabla 11: Grado histológico. Chi cuadrado, $p= 0,26$.

Grado	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
1	2 (2,2)	0 (0)	2 (4,4)
2	12 (13,2)	5 (10,9)	7 (15,6)
3	77 (84,6)	41 (89,1)	36 (80)

El 88,8% de los tumores presentaban un Ki-67 alto (definido como $\geq 14\%$). No encontramos diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 12).

Tabla 12: Índice de proliferación Ki-67, Chi cuadrado, $p=0,19$.

Ki-67	Total n: 89 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 45 (%)
< 14%	10 (11,2)	3 (6,8)	7 (15,6)
$\geq 14\%$	79 (88,8)	41 (93,2)	38 (84,4)

La expresión mediante inmunohistoquímica de la proteína del gen supresor tumoral p53 mutado fue positiva en un 66%. No encontramos diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 13).

Tabla 13: Expresión inmunohistoquímica de p53, Chi cuadrado, $p=0,30$.

p53	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
Negativo	31 (34,1)	18 (39,1)	13 (28,9)
Positivo	60 (65,9)	28 (60,9)	32 (71,1)

Al realizar el análisis en función de los niveles de expresión de p53 tampoco encontramos diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 14).

Tabla 14: Niveles de expresión inmunohistoquímica de p53. Chi cuadrado, $p=0,49$.

p53	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
-	31 (34,1)	18 (39,1)	13 (28,9)
+	7 (7,7)	4 (8,7)	3 (6,7)
++	17 (18,7)	6 (13)	11 (24,4)
+++	36 (39,6)	18 (39,1)	18 (40)

El receptor de membrana c-KIT fue positivo en el 30,8% de los tumores. No encontramos diferencias significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal. (Tabla 15).

Tabla 15: Expresión del receptor de membrana c-KIT. Chi cuadrado, $p=0,15$.

c-KIT	Total n: 91 (%)	Basal like n: 46 (%)	TN no basal n: 45 (%)
Negativo	63 (69,2)	35 (76,1)	28 (62,2)
Positivo	28 (30,8)	11 (23,9)	17 (37,8)

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fue positivo en 39 tumores (42,9%). Todos ellos pertenecientes al subgrupo basal like por definición. (Tabla 16).

Tabla 16: Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

EGFR	Total n: 91 (%)
Negativo	52 (57,1)
Positivo	39 (42,9)

Dentro de los tumores basal like el 85% expresaban EGFR y el 24% CK5/6. (Tabla 17).

Tabla 17: Inmunohistoquímica de los tumores basal like.

	Basal like n: 46 (%)
CK5/6 +, EGFR -	7 (15,2)
CK5/6 -, EGFR +	35 (76,1)
CK5/6 +, EGFR +	4 (8,7)

3. Características del tratamiento

3.1 En pacientes estadio I-III (n: 87)

El 97,7% de las pacientes estadios I-III fueron sometidas a intervención quirúrgica. El 61% de las intervenciones fueron conservadoras y el 39% mastectomías. Aunque el porcentaje de mastectomías es superior en los tumores triple negativo no basal no se alcanza la significación estadística. (Tabla 18).

Tabla 18: Tratamiento quirúrgico realizado en las pacientes en estadios I-III. Chi cuadrado, $p=0,09$.

	Total n: 87 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 43 (%)
No cirugía	2 (2,3)	2 (4,5)	0 (0)
Cir. conservadora	52 (59,8)	29 (65,9)	23 (53,5)
Mastectomía	33 (37,9)	13 (29,5)	20 (46,5)

79 pacientes (90,8%) recibieron tratamiento de quimioterapia. De las 79 pacientes, 66 (83,5%) recibieron quimioterapia adyuvante y 13 (16,5%) quimioterapia neoadyuvante. No encontramos diferencias significativas entre los subgrupos basal like y triple negativo no basal. (Tablas 19 y 20).

Tabla 19: Tratamiento de quimioterapia recibido en las pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, estadístico de Fisher, $p=0,48$.

Quimioterapia	Total n: 87 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 43 (%)
No	8 (9,2)	3 (6,8)	5 (11,6)
Sí	79 (90,8)	41 (93,2)	38 (88,4)

Tabla 20: Tipo de quimioterapia recibido en las pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, $p=0,88$.

Quimioterapia	Total n: 79 (%)	Basal like n: 41 (%)	TN no basal n: 38 (%)
Neoadyuvante	13 (16,5)	7 (17,1)	6 (15,8)
Adyuvante	66 (83,5)	34 (82,9)	32 (84,2)

70 de las 79 pacientes que recibieron quimioterapia incluyeron antraciclinas (88,6%), 37 pacientes taxanos (46,8%) y 35 pacientes antraciclinas y taxanos (44,3%). No encontramos diferencias significativas entre los subgrupos basal like y triple negativo no basal. (Tablas 21, 22 y 23).

Tabla 21: Tratamiento con/sin antraciclinas administrado en las pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, estadístico de Fisher, $p= 1$.

Quimioterapia	Total n: 79 (%)	Basal like n: 41 (%)	TN no basal n: 38 (%)
No antraciclinas	9 (11,4)	5 (12,2)	4 (10,5)
Antraciclinas	70 (88,6)	36 (87,8)	34 (89,5)

Tabla 22: Tratamiento con/sin taxanos administrado en las pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, $p= 0,71$.

Quimioterapia	Total n: 79 (%)	Basal like n: 41 (%)	TN no basal n: 38 (%)
No taxanos	42 (53,2)	21 (51,2)	21 (55,3)
Taxanos	37 (46,8)	20 (48,8)	17 (44,7)

Tabla 23: Tratamiento conjunto de antraciclinas y taxanos administrado en las pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, $p= 0,70$.

Quimioterapia	Total n: 79 (%)	Basal like n: 41 (%)	TN no basal n: 38 (%)
No antraciclinas y taxanos	44 (55,7)	22 (53,7)	22 (57,9)
Antraciclinas y taxanos	35 (44,3)	19 (46,3)	16 (42,1)

De las 13 pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante se objetivaron siete respuestas parciales patológicas (53,8%) y una respuesta completa patológica (7,7%). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos basal like y triple negativo no basal. (Tabla 24).

Tabla 24: Tipo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Chi cuadrado, corrección de Monte-Carlo, $p= 1$.

Respuesta a la QT neoadyuvante	Total n: 13 (%)	Basal like n: 7 (%)	TN no basal n: 6 (%)
Respuesta completa	1 (7,7)	1 (14,3)	0 (0)
Respuesta parcial	7 (53,8)	4 (57,1)	3 (50)
Estabilidad	3 (23,1)	1 (14,3)	2 (33,3)
Progresión	2 (15,4)	1 (14,3)	1 (16,6)

67 pacientes (77%) con estadios I-III recibieron tratamiento de radioterapia adyuvante. Los tumores triple negativo no basal recibieron menos tratamiento de radioterapia adyuvante (sin significación estadística), probablemente debido a que el número de mastectomías en este subgrupo fue mayor. (Tabla 25).

Tabla 25: Tratamiento de radioterapia adyuvante recibido en las pacientes estadio I-III. Chi cuadrado, $p= 0,11$.

Radioterapia	Total n: 87 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 43 (%)
No	20 (23)	7 (15,9)	13 (30,2)
Sí	67 (77)	37 (84,1)	30 (69,8)

3.2 En pacientes estadio IV

Sólo 4 pacientes (el 4,4%) debutaron como enfermedad metastásica, dos fueron tumores basal like y dos triple negativo no basal. Dos pacientes (50%) fueron operadas del tumor primario. Tres pacientes (75%) recibieron tratamiento de quimioterapia y la otra paciente fue derivada directamente a paliativos tras el diagnóstico.

4 Situación actual de las pacientes

A la hora de cerrar el estudio, con una mediana de seguimiento de 37 meses, el 65,5% de las pacientes estadios I-III estaba viva sin enfermedad, el 27,6% había fallecido y el 6,9% había recaído pero aún seguían vivas. No encontramos diferencias significativas entre los subgrupos basal like y triple negativo no basal. (Tabla 26).

Tabla 26: Situación actual de las pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, $p=0,71$.

Situación actual	Total n: 87 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 43 (%)
Viva sin enfermedad	57 (65,5)	28 (63,6)	29 (67,4)
Viva con enfermedad	6 (6,9)	4 (9,1)	2 (4,7)
Fallecida	24 (27,6)	12 (27,3)	12 (27,9)

27 de las 87 pacientes (31%) estadios I-III recayeron, sin que existieran diferencias significativas entre los subtipos basal like y triple negativo no basal. (Tabla 27).

Tabla 27: Recaídas en pacientes estadios I-III. Chi cuadrado, $p=0,27$.

Recaída	Total n: 87 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 43 (%)
No	60 (69)	28 (63,6)	32 (74,4)
Sí	27 (31)	16 (36,4)	11 (25,6)

En cuanto al tipo de recaída, la mayoría de las pacientes presentaron exclusivamente metástasis a distancia (52%), seguido de recaída locorregional y a distancia (37%) y de recaída exclusivamente locorregional (11,1%). (Tabla 28).

Tabla 28: Tipo de recaída. Chi cuadrado, corrección de Monte Carlo, $p=0,85$.

Tipo de recaída	Total n: 27 (%)	Basal like n: 16 (%)	TN no basal n: 11 (%)
Locorregional	3 (11,1)	2 (12,5)	1 (9)
A distancia	14 (51,9)	9 (56,3)	5 (45,5)
Locorregional y a distancia	10 (37)	5 (31,2)	5 (45,5)

Las localizaciones de las recaídas a distancia quedan reflejadas en la tabla 29. El 12,6% de las pacientes estadio I-III desarrollaron metástasis pulmonares, seguidos en frecuencia por cerebro (11,5%), hueso (11,5%), hígado (8%) y afectación ganglionar a distancia (6,9%). Aunque no existen diferencias significativas entre los subtipos basal like y triple negativo no basal, se observa una mayor frecuencia de afectación pulmonar y dérmica en el subgrupo basal like.

Tabla 29: Lugar de asiento de metástasis de las pacientes estadios I-III.

Lugar de metástasis	Total n: 87 (%)	Basal like n: 44 (%)	TN no basal n: 43 (%)	p (Fisher)
Pulmón	11 (12,6)	8 (18,2)	3 (7)	0,19
Cerebro	10 (11,5)	6 (13,6)	4 (9,3)	0,73
Hueso	10 (11,5)	4 (9,1)	6 (14)	0,52
Hígado	7 (8)	4 (9,1)	3 (7)	1
Ganglios a distancia	6 (6,9)	2 (4,5)	4 (9,3)	0,43
Dermis	3 (3,4)	3 (6,8)	0 (0)	0,24
Pleura	2 (2,3)	1 (2,3)	1 (2,3)	1
Otros	1 (1,1)*	1 (2,3)*	0 (0)	1
Desconocido	1 (1,1)	0 (0)	1 (2,3)	0,49

*El único caso corresponde a una metástasis muscular en el psoas.

La situación en el momento de cerrar el estudio de las cuatro pacientes estadio IV fue de dos pacientes fallecidas y otras dos vivas (en tratamiento activo). El lugar de asiento de las metástasis en las 4 pacientes estadio IV fue del siguiente modo: 3 pacientes presentaban metástasis óseas, 1 paciente presentaba metástasis cerebrales, 1 paciente metástasis hepáticas, 1 paciente metástasis pleurales y, curiosamente, ninguna desarrolló metástasis pulmonares.

5 Supervivencia libre de enfermedad

En las pacientes triple negativo estadios I-III la supervivencia libre de enfermedad a 5 años fue del 60,5%. (Figura 15).

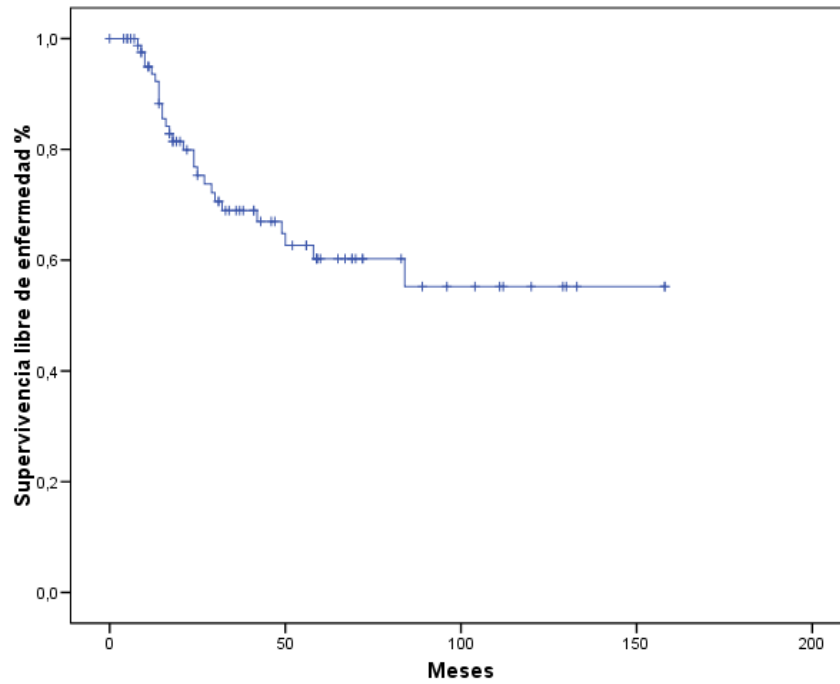


Figura 15: Supervivencia libre de enfermedad en pacientes estadio I-III.

La supervivencia libre de enfermedad a 5 años según el estadio fue del 92,3% para el estadio I; del 65,5% para el estadio II y del 14,3% para el estadio III (diferencias estadísticamente significativas). La mediana sólo fue alcanzada en los estadios III, siendo de 24 meses (IC95% 15,5-32,4). (Figura 16).

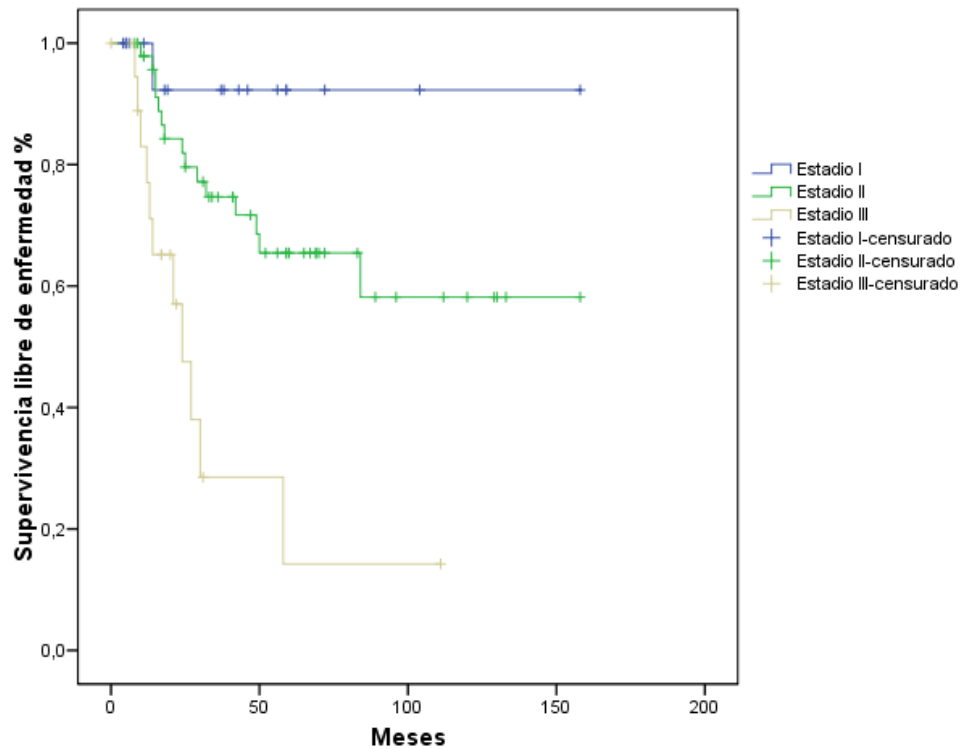


Figura 16: Supervivencia libre de enfermedad por estadios. Log Rank, $p=0,00$.

La supervivencia libre de enfermedad por tamaño (T) y por afectación ganglionar (N) se refleja en las figuras 17 y 18. Observamos diferencias significativas en función del tamaño, y diferencias sin llegar a la significación estadística en función de la afectación ganglionar.

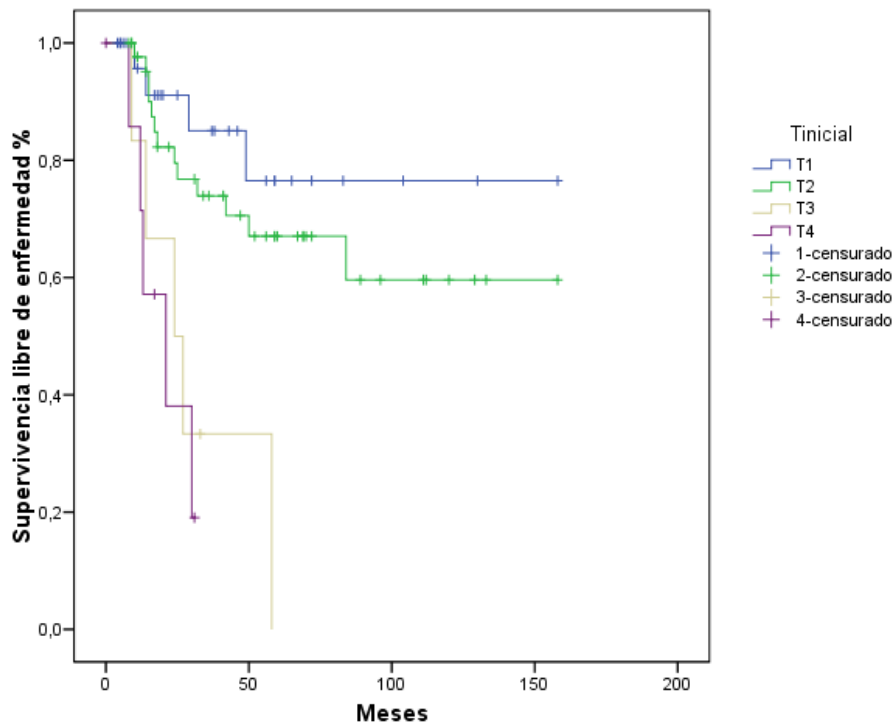


Figura 17: Supervivencia libre de enfermedad en función de T. Log Rank, $p=0,00$.

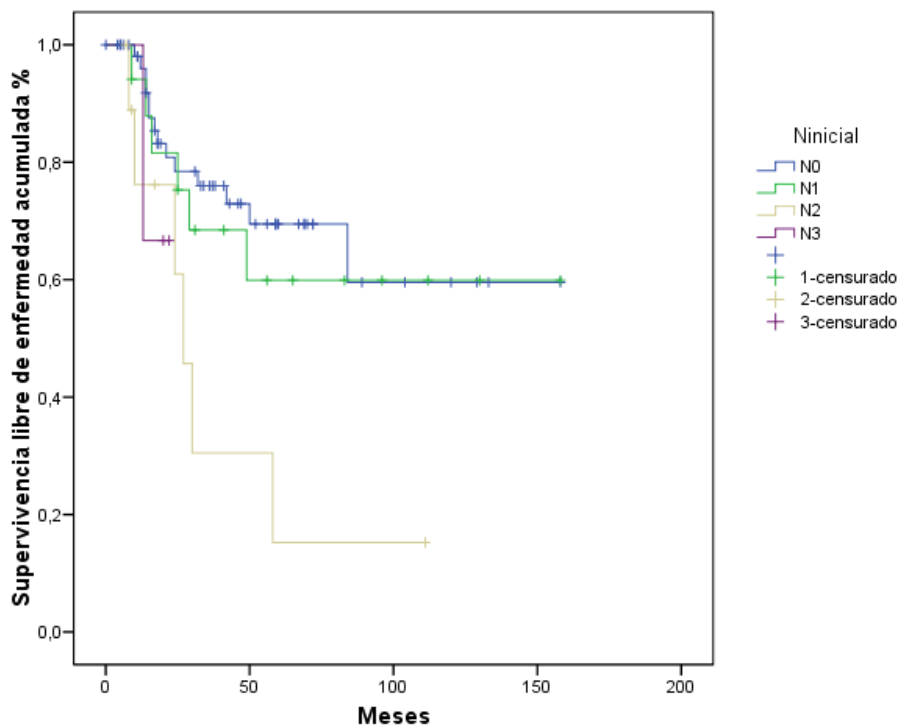


Figura 18: Supervivencia libre de enfermedad en función de N. Log Rank, $p=0,053$.

La supervivencia libre de enfermedad según c-KIT se representa en la figura 19. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en función de c-KIT.

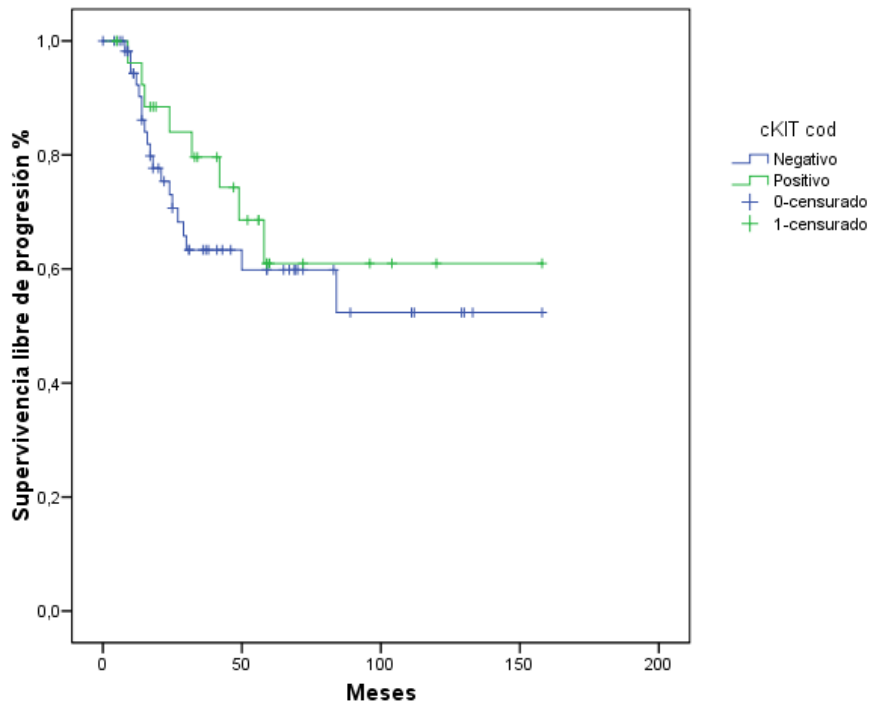


Figura 19: Supervivencia libre de enfermedad según c-KIT. Log Rank, $p = 0,41$.

La supervivencia libre de enfermedad según Ki-67 se ilustra en la figura 20. No encontramos diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al bajo número de pacientes con Ki-67 < 14%.

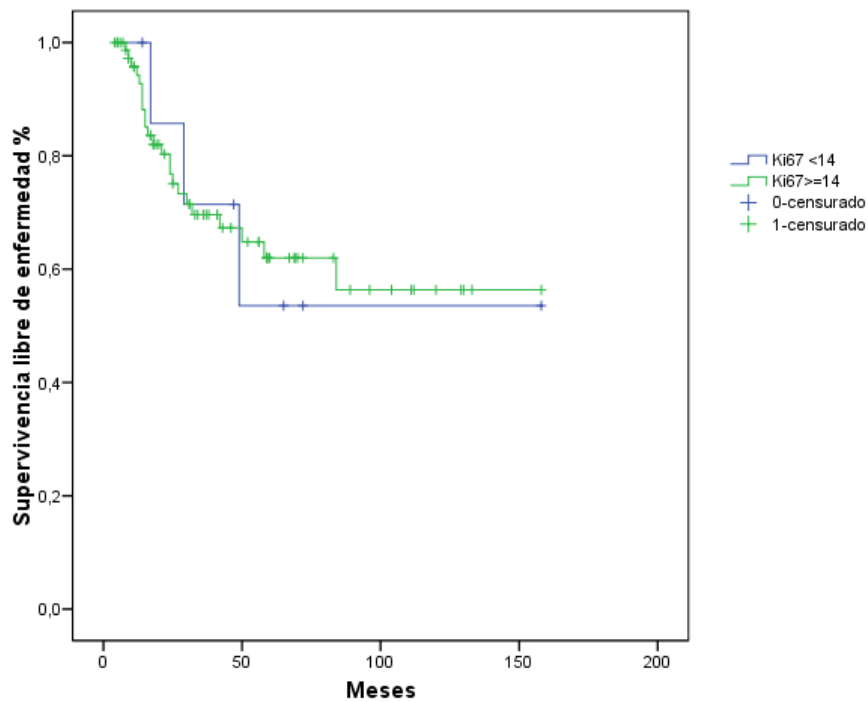


Figura 20: Supervivencia libre de enfermedad según Ki-67. Log Rank, $p = 0,97$.

En la figura 21 se refleja la supervivencia libre de enfermedad según el grado histológico. No encontramos diferencias estadísticamente significativas, seguramente debido al bajo número de pacientes con tumores grados 1 y 2.

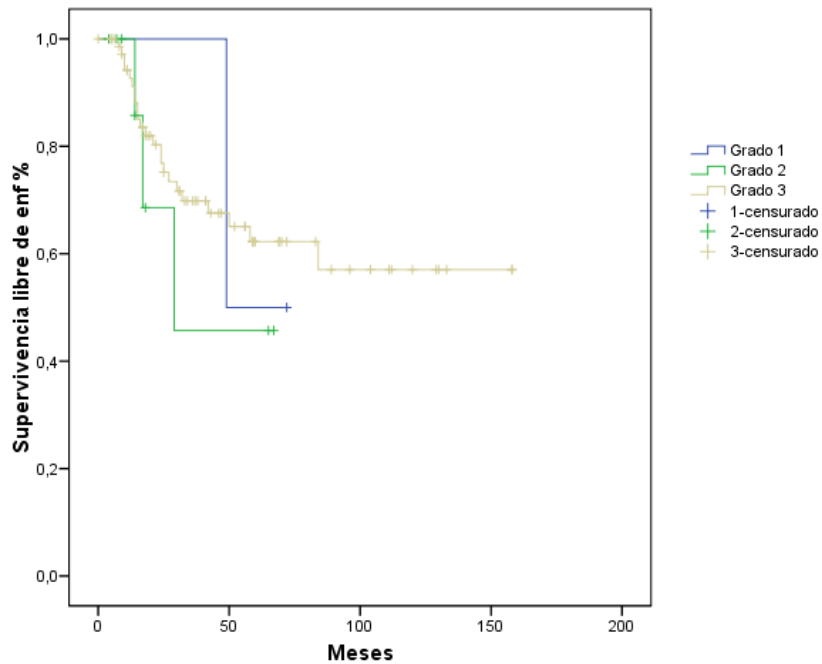


Figura 21: Supervivencia libre de enfermedad según grado histológico. Log Rank, $p=0,74$.

La supervivencia libre de enfermedad según p53 se plasma en la figura 22. No encontramos diferencias estadísticamente significativas, si bien observamos una separación en las curvas a favor de p53 negativo.

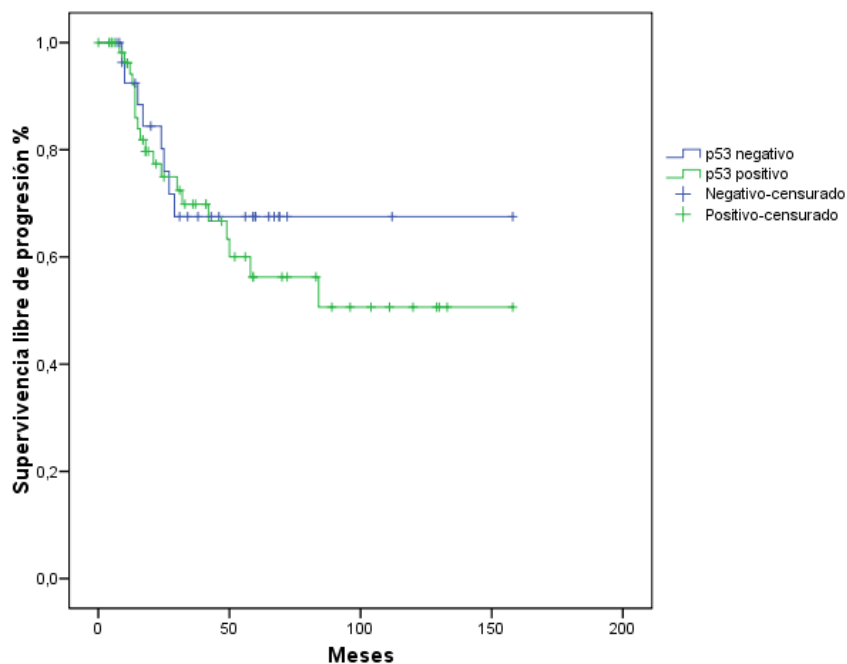


Figura 22: Supervivencia libre de enfermedad según p53. Log Rank, $p=0,56$.

La supervivencia libre de enfermedad en función del tratamiento de quimioterapia recibido se muestra en las figuras 23-27. No administrar tratamiento de quimioterapia disminuye de forma significativa la supervivencia libre de enfermedad (figura 23).

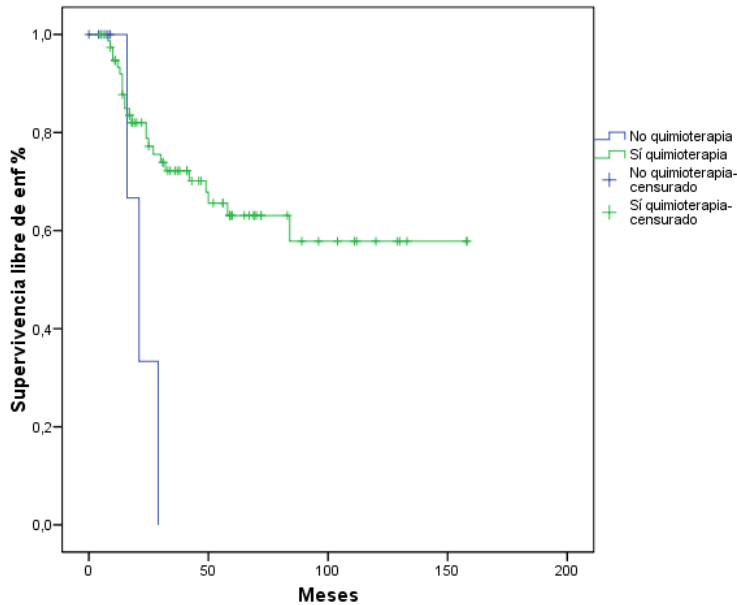


Figura 23: Supervivencia libre de enfermedad según la administración o no de quimioterapia. Log Rank, $p= 0,008$.

La quimioterapia neoadyuvante se asocia a menor supervivencia libre de enfermedad (diferencias estadísticamente significativas), probablemente porque se administra en tumores más avanzados y, por tanto, de peor pronóstico (figura 24).

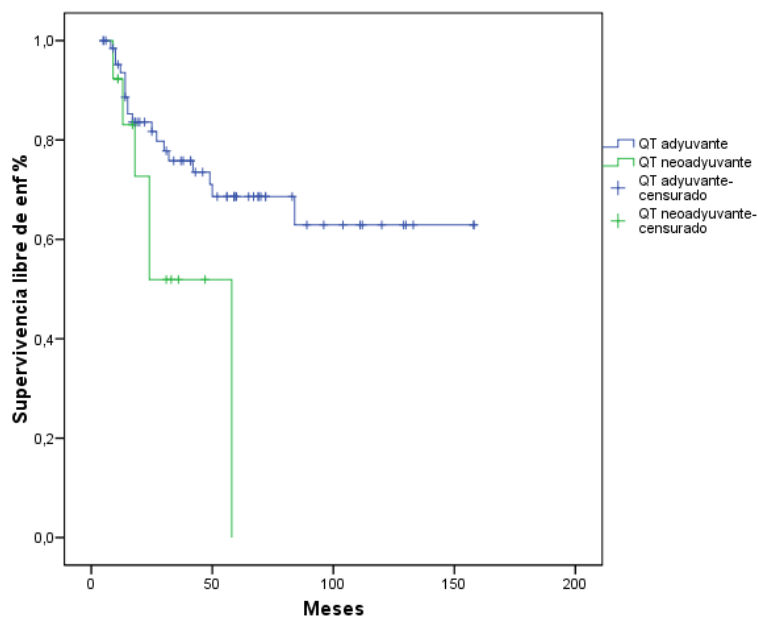


Figura 24: Supervivencia libre de enfermedad según la administración de quimioterapia (adyuvante vs neoadyuvante). Log Rank, $p= 0,039$.

No encontramos diferencias significativas en supervivencia libre de enfermedad según la administración o no de antraciclinas, seguramente debido al bajo número de pacientes que no la reciben (9 pacientes) (figura 25).

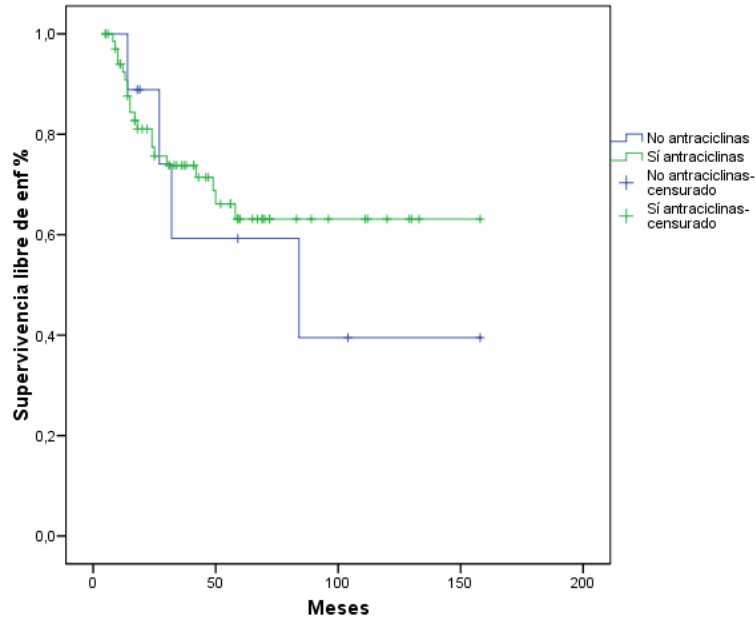


Figura 25: Supervivencia libre de enfermedad según la inclusión o no de antraciclinas en el esquema de quimioterapia. Log Rank, $p=0,62$.

En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad según la administración o no de taxanos observamos separación en las curvas sin significación estadística. Al igual que ocurría con la quimioterapia neoadyuvante, esto probablemente se deba a que los taxanos se administran en tumores más avanzados (figura 26).

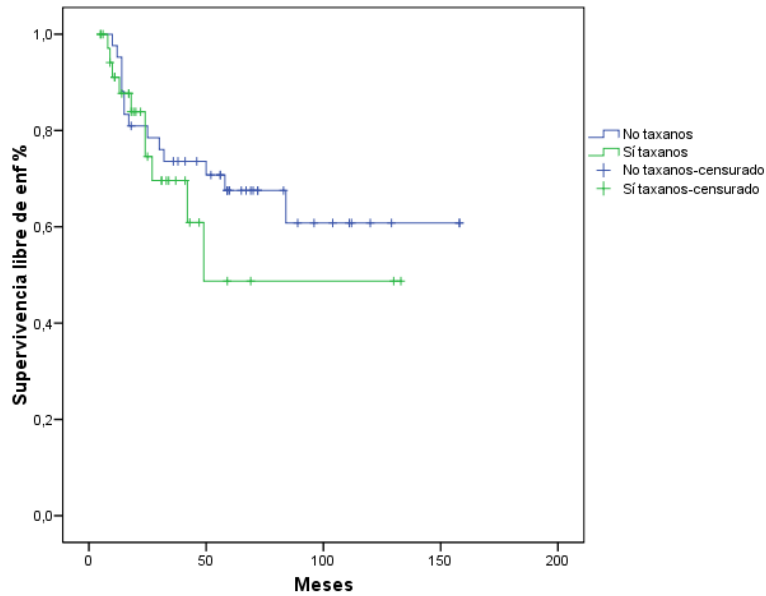


Figura 26: Supervivencia libre de enfermedad según la inclusión o no de taxanos en el esquema de quimioterapia. Log Rank, $p=0,40$.

La supervivencia libre de enfermedad según la administración de la combinación o no de antraciclinas y taxanos se refleja en la figura 27.

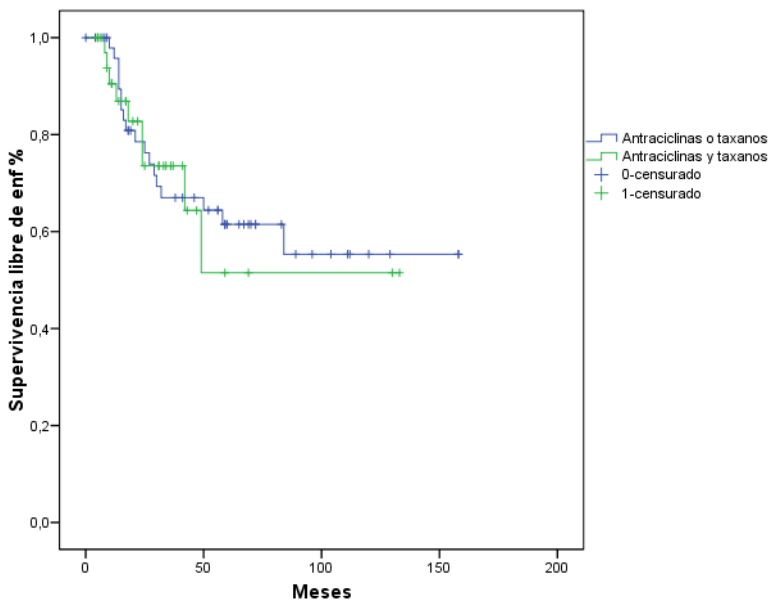


Figura 27: Supervivencia libre de enfermedad según la administración de antraciclinas y/o taxanos en el esquema de quimioterapia. Log Rank, $p=0,58$.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en supervivencia libre de enfermedad entre los subgrupos basal like y triple negativo no basal (figura 28), si bien la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue superior en los tumores triple negativo no basal que en los tumores basal like (66,3% frente a 53,8%, con una mediana no alcanzada frente a 84 meses, IC95%: 33,29-134,70).

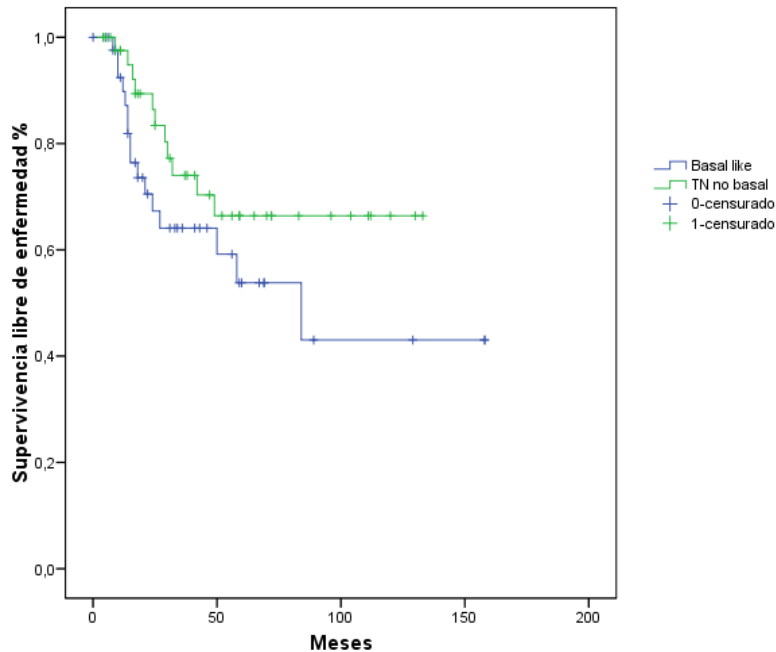


Figura 28: Supervivencia libre de enfermedad de basal like y triple negativo no basal según la definición clásica. Log Rank, $p=0,146$.

Sin embargo, cuando incluimos la citoqueratina 17 en la definición de basal like, las dos curvas se igualan (figura 29).

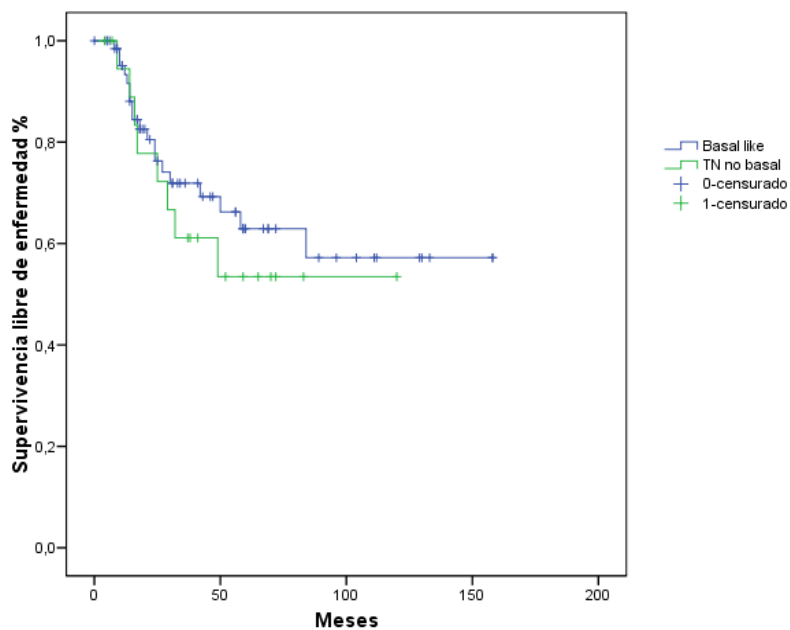


Figura 29: Supervivencia libre de enfermedad de basal like y triple negativo no basal según la definición inmunohistoquímica que incluye CK17. Log Rank, $p=0,51$.

Dentro de los tumores basal like no encontramos diferencias en función de la sobreexpresión de EGFR, de CK5/6 o de ambas (figura 30).

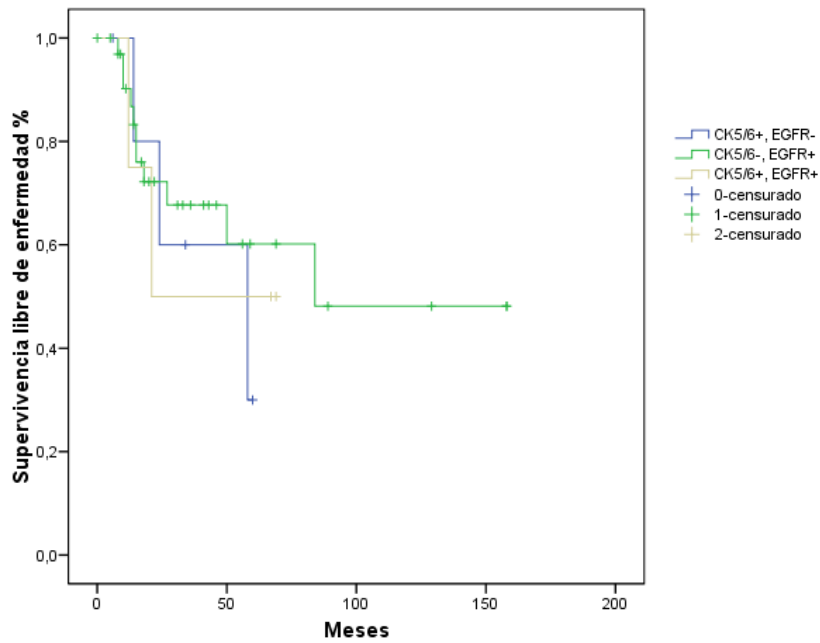


Figura 30: Supervivencia libre de enfermedad de basal like en función de la positividad para CK5/6 y/o EGFR. Log Rank, $p=0,79$.

6 Supervivencia global

La supervivencia global a los 5 años de las pacientes estadios I-IV fue de 67,6% (mediana no alcanzada). (Figura 31).

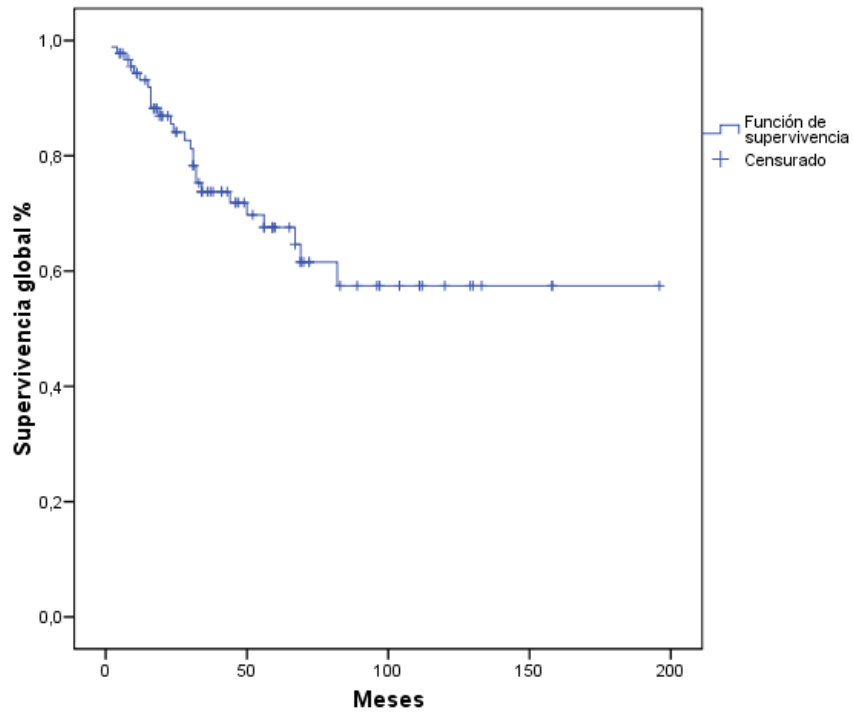


Figura 31: Supervivencia global de las pacientes estadios I-IV.

La supervivencia global a los 5 años fue del 85,4% en estadios I; del 72,9% en estadios II y del 40,3% en estadios III (diferencias estadísticamente significativas).

La mediana de supervivencia se alcanzó en los estadios III y IV, siendo de 31,3 meses (IC95% 24,07-38,59) y de 18,4 meses (IC95%: 4,99-31,87) respectivamente. (Figura 32).

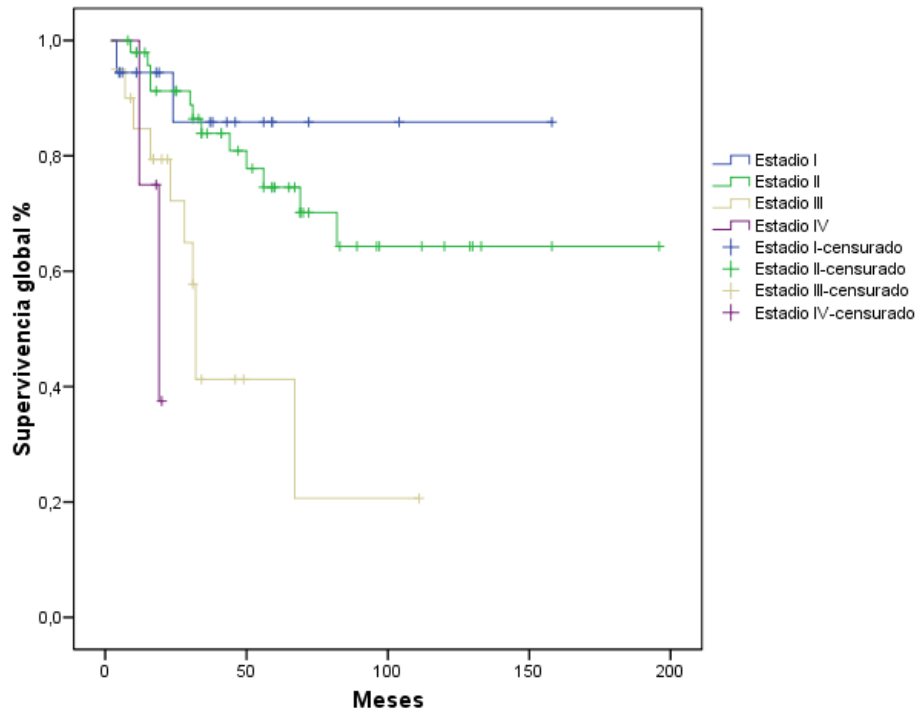


Figura 32: Supervivencia global por estadios. Log Rank, $p=0,001$.

La supervivencia global a los 5 años en las pacientes basal like y triple negativo no basal estadios I-III fue del 71% y 68,5% respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas. (Figura 33).

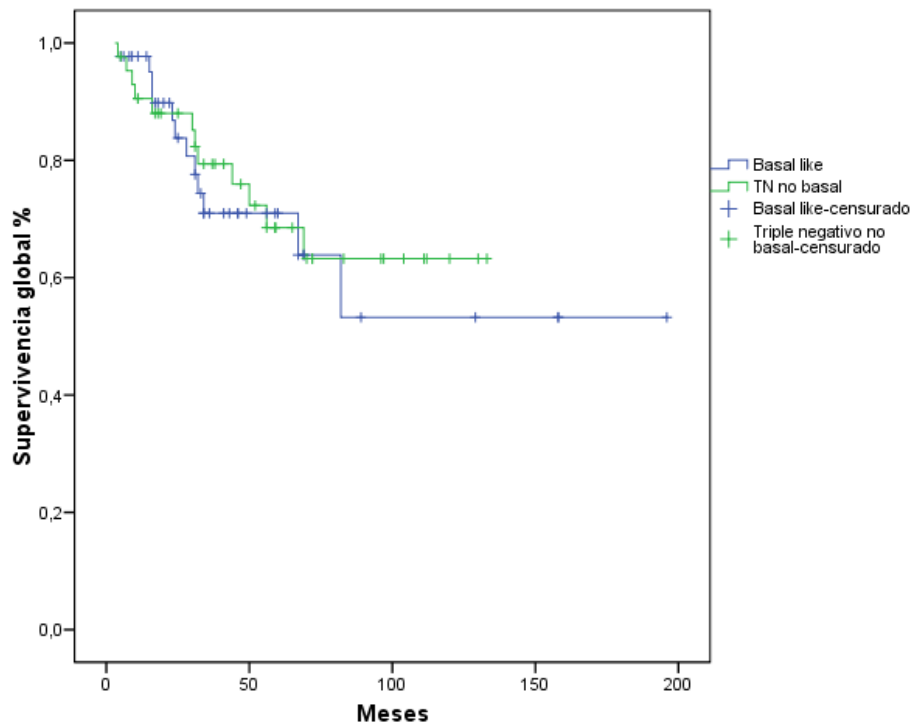


Figura 33: Supervivencia global en Basal like y Triple negativo no basal. Log Rank, $p=0,71$.

7 Resultados del estudio de metilación del promotor de BRCA1

Se realizó el estudio de la metilación del promotor de BRCA1 mediante la técnica QAMA en todas las pacientes excepto en las 6 pacientes con mutación germinal de BRCA1, debido a que la mutación germinal en principio es excluyente de metilación del otro alelo por pérdida de heterocigosidad (227). Los resultados fueron evaluables en 62 casos (73%) de los 85 previstos. Esto fue debido principalmente a problemas en la extracción de ADN de los bloques de parafina. De los 62 casos evaluables, 33 fueron tumores basal like y 29 tumores triple negativo no basal (no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos, chi cuadrado, $p=0,45$).

En 43 muestras obtuvimos dos medidas de ΔCt , utilizando la media para el cálculo de la metilación. En las 19 muestras restantes conseguimos una única medición de ΔCt . (Anexo).

En la figura 34 se muestra el porcentaje de metilación en función del incremento de Ct según la técnica QAMA:

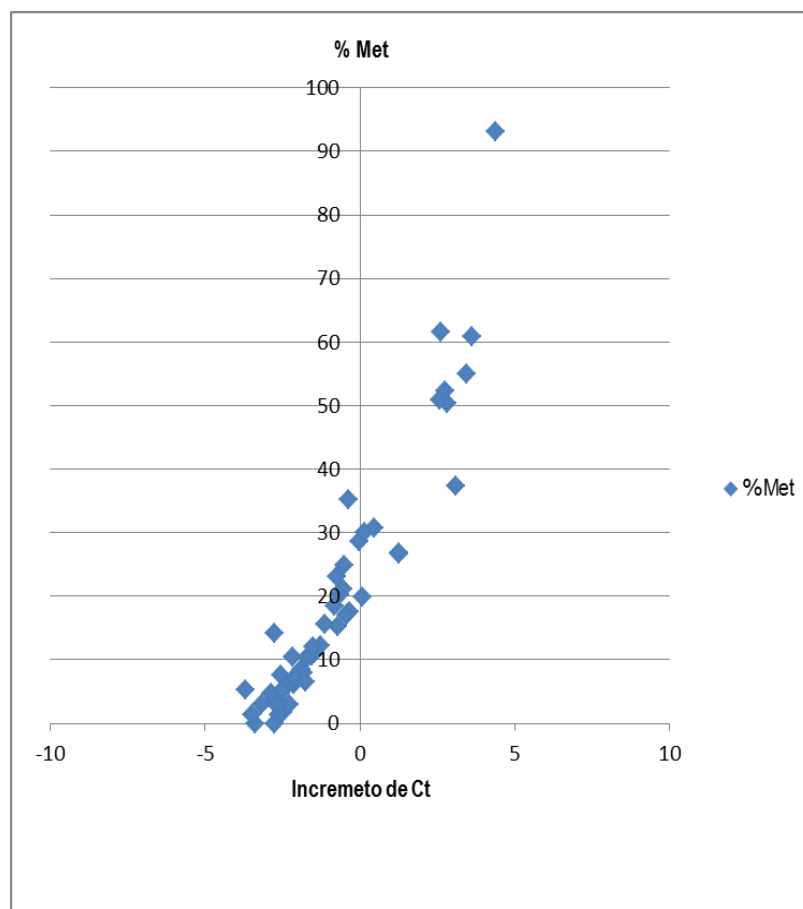


Figura 34: Porcentaje de metilación en función del incremento de Ct.

La mediana de metilación del promotor de BRCA1 fue del 10,39% y la media del 17,36%.

Al dividir la metilación del promotor de BRCA1 por cuartiles observamos que más de tres cuartas partes de los tumores (77%) tienen un porcentaje de metilación $\leq 25\%$; el 15% de los tumores entre el 26 y el 50% de metilación; el 6,5% entre el 51 y 75% y el 1,6% superior al 75% (tabla 30). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal.

Tabla 30: Porcentaje de metilación por cuartiles. Chi cuadrado, corrección de Monte-Carlo, $p=0,84$.

Porcentaje de metilación	Total n: 62 (%)	Basal like n: 33 (%)	TN no basal n: 29 (%)
0-25%	48 (77,4)	27 (81,8)	21 (72,4)
26%-50%	9 (14,5)	4 (12,1)	5 (17,2)
51%-75%	4 (6,5)	2 (6,1)	2 (6,9)
76%-100%	1 (1,6)	0 (0)	1 (3,4)

Cuando agrupamos la metilación en \leq o $>$ 50% observamos que el 92% de los tumores tienen un porcentaje de metilación $\leq 50\%$ (tabla 31). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tumores basal like y triple negativo no basal.

Tabla 31: Porcentaje de metilación \leq o $>$ de 50%. Prueba exacta de Fisher, $p=0,65$.

Porcentaje de metilación	Total n: 62 (%)	Basal like n: 33 (%)	TN no basal n: 29 (%)
0-50%	57 (91,9)	31 (93,9)	26 (89,7)
51%-100%	5 (8,1)	2 (6,1)	3 (10,3)

Considerando la hipermetilación como un porcentaje $> 50\%$ se observan 5 muestras hipermetiladas (8,1%). Las cinco muestras pertenecen a pacientes no metastásicas de inicio y sin historia familiar de cáncer de mama y ovario.

El 80% de las muestras hipermetiladas se observan en pacientes premenopáusicas y menores de 50 años (tablas 32 y 33).

Tabla 32: Estado menstrual en función de la metilación del promotor de BRCA1. Prueba exacta de Fisher, $p=0,069$ (Intervalo de Agresti-Caffo IC 95%: **-0,715; -0,002**).

Estado menstrual	Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
Premenopáusica	20 (35,1)	4 (80)
Postmenopáusica	37 (64,9)	1 (20)

Tabla 33: Distribución de edad según la metilación. Prueba exacta de Fisher, $p=0,148$.

Edad	Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
<50	21 (36,8)	4 (80)
≥50	36 (63,2)	1 (20)

El 60% de las muestras hipermetiladas son estadios III (tabla 34).

Tabla 34: Distribución de estadios según la metilación. Chi cuadrado, corrección de Monte-Carlo, $p=0,21$.

Estadio	Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
I	12 (21,1)	1 (20)
II	31 (54,4)	1 (20)
III	11 (19,3)	3 (60)
IV	3 (5,3)	0 (0)

No observamos asociación entre metilación y tamaño tumoral (tabla 35), ni entre metilación y afectación ganglionar (tabla 36 y 37).

Tabla 35: Distribución de la metilación según el tamaño tumoral T. Chi cuadrado, corrección de Monte-Carlo, $p=0,10$.

T	Metilación 0-50% n: 56 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
T1	20 (35,7)	1 (20)
T2	27 (48,2)	1 (20)
T3	3 (5,4)	2 (40)
T4	6 (10,7)	1 (20)

Tabla 36: Distribución de la metilación según la afectación ganglionar N. Chi cuadrado, corrección de Monte-Carlo, $p=0,59$.

N	Metilación 0-50% n: 55 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
N0	36 (65,5)	2 (40)
N1	11 (20)	2 (40)
N2	6 (10,9)	1 (20)
N3	2 (3,6)	0 (0)

Tabla 37: Distribución de la metilación según la afectación ganglionar. Prueba exacta de Fisher, $p=0,36$.

Ganglios	Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
Negativos	36 (63,2)	2 (40)
Positivos	21 (36,8)	3 (60)

Los cinco tumores hipermetilados (100%) fueron carcinomas ductales infiltrantes, grado 3 y con Ki-67 \geq 14%. Dos tumores hipermetilados (40%) fueron p53 negativo y tres (60%) p53 positivo.

8 Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en función de la metilación del promotor de BRCA1

El número de recaídas en las pacientes estadio I-III según la metilación del promotor de BRCA1 se refleja en la tabla 38.

Tabla 38: Recaídas en pacientes estadios I-III según la metilación. Prueba exacta de Fisher, $p=0,16$.

Recaída	Metilación 0-50% n: 54 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
No	39 (72,2)	2 (40)
Sí	15 (27,8)	3 (60)

La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue del 61,2% en pacientes sin hipermetilación (mediana no alcanzada) y del 26,5% en pacientes con hipermetilación (mediana de 27 meses, IC95%: 12,06-41,93), diferencias estadísticamente significativas (figura 35).

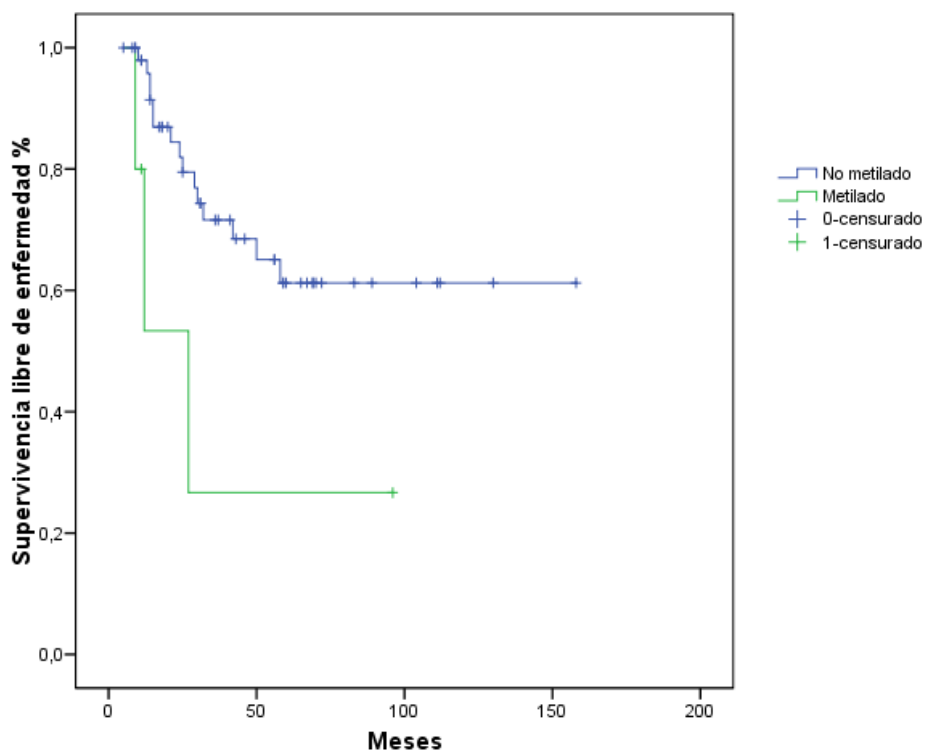


Figura 35: Supervivencia libre de enfermedad en función de la metilación del promotor de BRCA1. Log Rank, $p=0,024$.

El número de recaídas en las pacientes estadio I-III según los cuartiles de metilación se refleja en la tabla 39.

Tabla 39: Recaídas en las pacientes estadio I-III según cuartiles de metilación. $p=0,123$.

Recaída	Met 0-25% n: 45 (%)	Met 26-50% n: 9 (%)	Met 51-75% n: 4 (%)	Met 76-100% n: 1 (%)
No	34 (75,5)	5 (55,5)	1 (25)	1 (100)
Sí	14 (24,5)	4 (44,5)	3 (75)	0 (0)

La supervivencia libre de enfermedad en función del porcentaje de metilación por cuartiles fue del 64,7% en el primer cuartil, del 53,6% en el segundo, del 0% en el tercero y del 100% (sólo una paciente) en el cuarto (figura 36), diferencias también estadísticamente significativas.

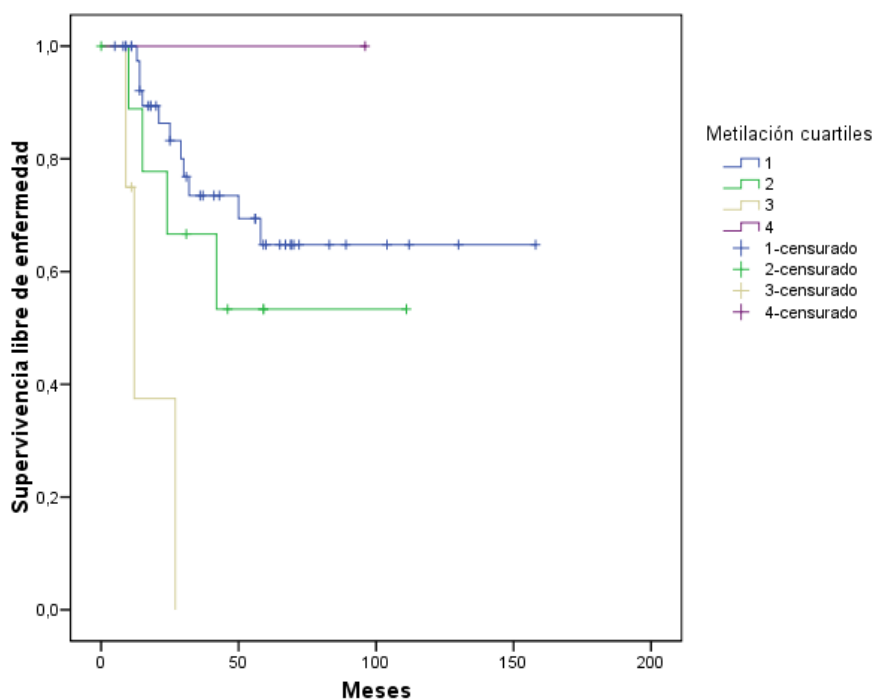


Figura 36: Supervivencia libre de enfermedad según el cuartil de metilación. Log Rank, $p=0,000$.

Al finalizar el estudio el 28,1% de las pacientes sin metilación había fallecido, frente al 60% (3 pacientes) de las pacientes con hipermetilación (tabla 40).

Tabla 40: Estado actual de las pacientes según la metilación. Prueba exacta de Fisher, $p=0,16$.

Estado actual	Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
Viva	41 (71,9)	2 (40)
Fallecida	16 (28,1)	3 (60)

La supervivencia global a los 5 años de las pacientes sin hipermetilación de BRCA1 fue del 72,7% (mediana no alcanzada) frente al 26,5% de las pacientes con hipermetilación (mediana de 32 meses, IC95%: 13,74-50,25). (Figura 37).

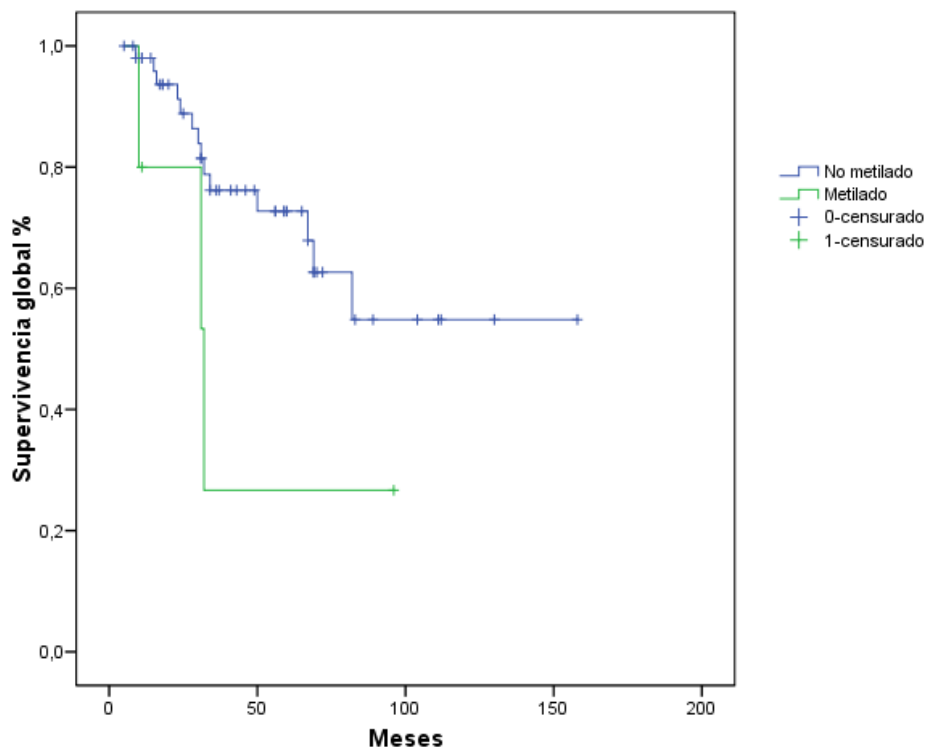


Figura 37: Supervivencia global en función de la metilación del promotor de BRCA1. Log Rank, p= 0,126.

No encontramos diferencias significativas en los tratamientos recibidos que pudieran explicar estas diferencias en supervivencia (tabla 41).

Tabla 41: Tratamientos recibidos en función de la metilación.

Tratamiento		Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)	p*
Radioterapia	No	15 (26,3)	1 (20)	1
	Sí	42 (73,7)	4 (80)	
Quimioterapia	No	6 (10,5)	0 (0)	1
	Sí	51 (89,5)	5 (100)	
Antraciclinas	No	11 (19,3)	1 (20)	1
	Sí	46 (80,7)	4 (80)	
Taxanos	No	36 (63,2)	2 (40)	0,36
	Sí	21 (36,8)	3 (60)	

*Prueba exacta de Fisher

El estado de las pacientes al cerrar el estudio según los cuartiles de metilación se refleja en la tabla 42.

Tabla 42: Situación actual de las pacientes según los cuartiles de metilación.

	Met 0-25% n: 48 (%)	Met 26-50% n: 9 (%)	Met 51-75% n: 4 (%)	Met 76-100% n: 1 (%)
Viva	37 (77,1)	4 (44,5)	1 (25)	1 (100)
Fallecida	11 (22,9)	5 (55,5)	3 (75)	0 (0)

La supervivencia a los 5 años del primer cuartil fue del 78,3%, del segundo cuartil del 41,4%, del tercer cuartil del 0% y del cuarto cuartil del 100% (sólo una paciente que se encontraba viva), diferencias estadísticamente significativas. (Figura 38).

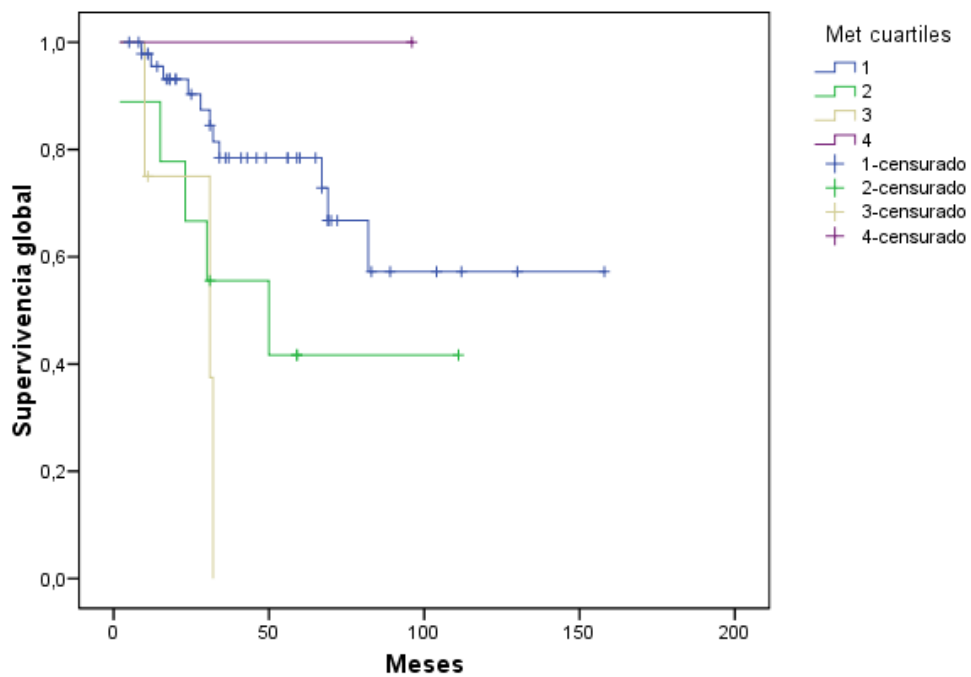


Figura 38: Supervivencia global por cuartiles de metilación. Log Rank, $p=0,006$.

9 Caracterización multivariante de las pacientes según la metilación del promotor de BRCA1

Para estudiar el conjunto de las pacientes hemos representado las diferencias existentes en las variables dicotómicas recogidas en un espacio de baja dimensión mediante MDS (multidimensional scaling). Las variables dicotómicas utilizadas han sido: Ki-67 (< 14% vs \geq 14%), p53 (negativo vs positivo), cKIT (negativo vs positivo), EGFR (negativo vs positivo), CK5/6 (negativo vs positivo), CK17 (negativo vs positivo), edad al diagnóstico (< 50 vs \geq 50), grado (1-2 vs 3), estado menstrual (premenopáusica vs postmenopáusica), afectación ganglionar (negativo vs positivo) y estadio (I-II vs III-IV). De este modo las distancias entre los puntos de la configuración hallada reproducen lo mejor posible en otra escala las diferencias entre las pacientes. La representación bidimensional obtenida y la interpretación de los ejes se plasman en la figura 39.

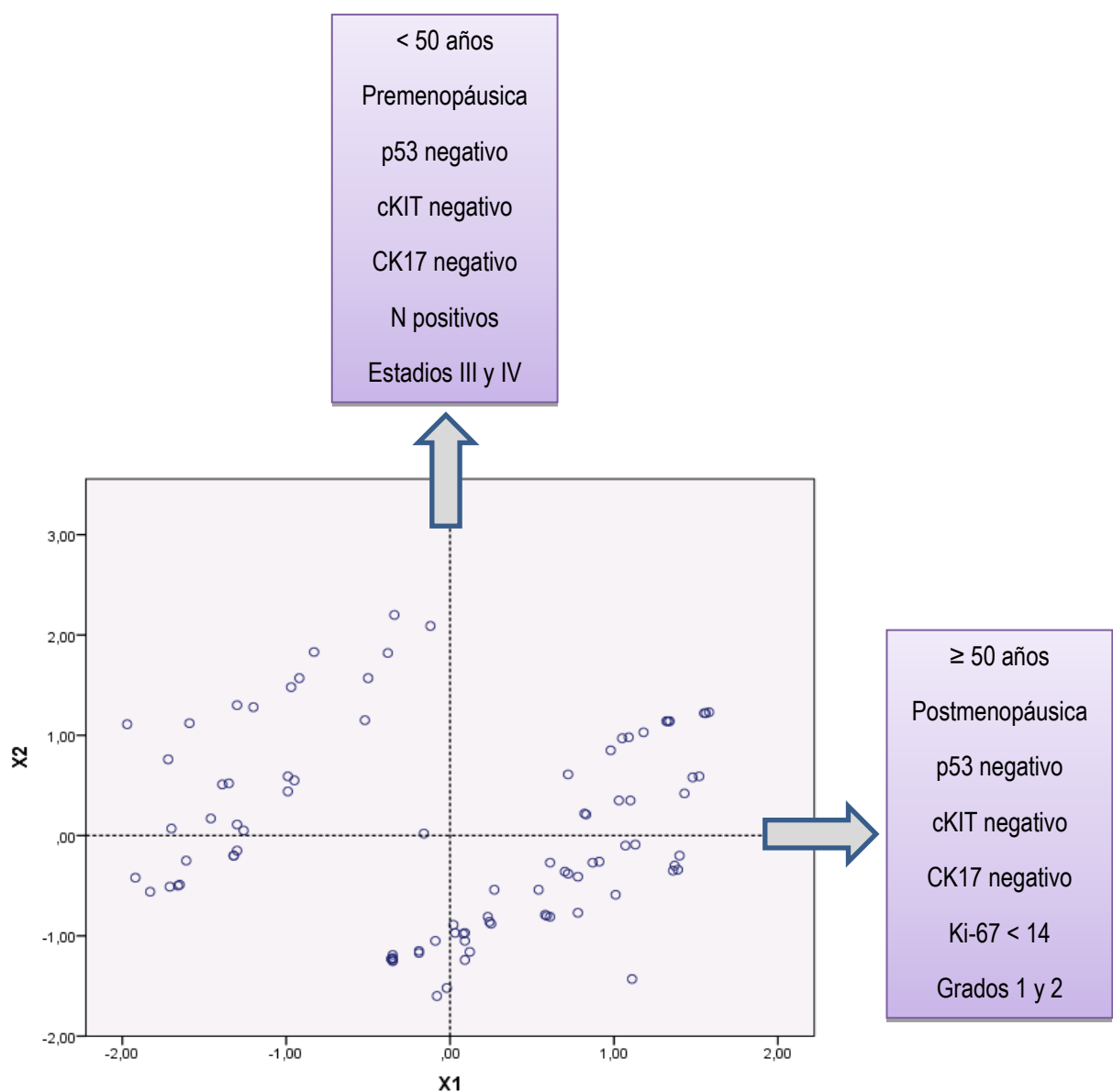


Figura 39: Interpretación de los ejes en la representación de las pacientes según las diferencias en las variables.

Utilizando el análisis de conglomerados (cluster analysis) podemos distinguir dos grupos de pacientes claramente diferenciados. El grupo 1 compuesto por 38 pacientes y el grupo 2 integrado por 24 pacientes. En el grupo 1 el 100% de las pacientes son ≥ 50 años, postmenopáusicas y con un Ki-67 bajo; el 90% grado 1 y 2 y en su mayoría p53 negativo, cKIT negativo y CK17 negativo. Por el contrario el grupo 2 se caracteriza por ser premenopáusicas (100%), < 50 años (96%) y la mayoría con un índice de proliferación Ki-67 ≥ 14 , grado 3 y CK17 positivo (figura 40).

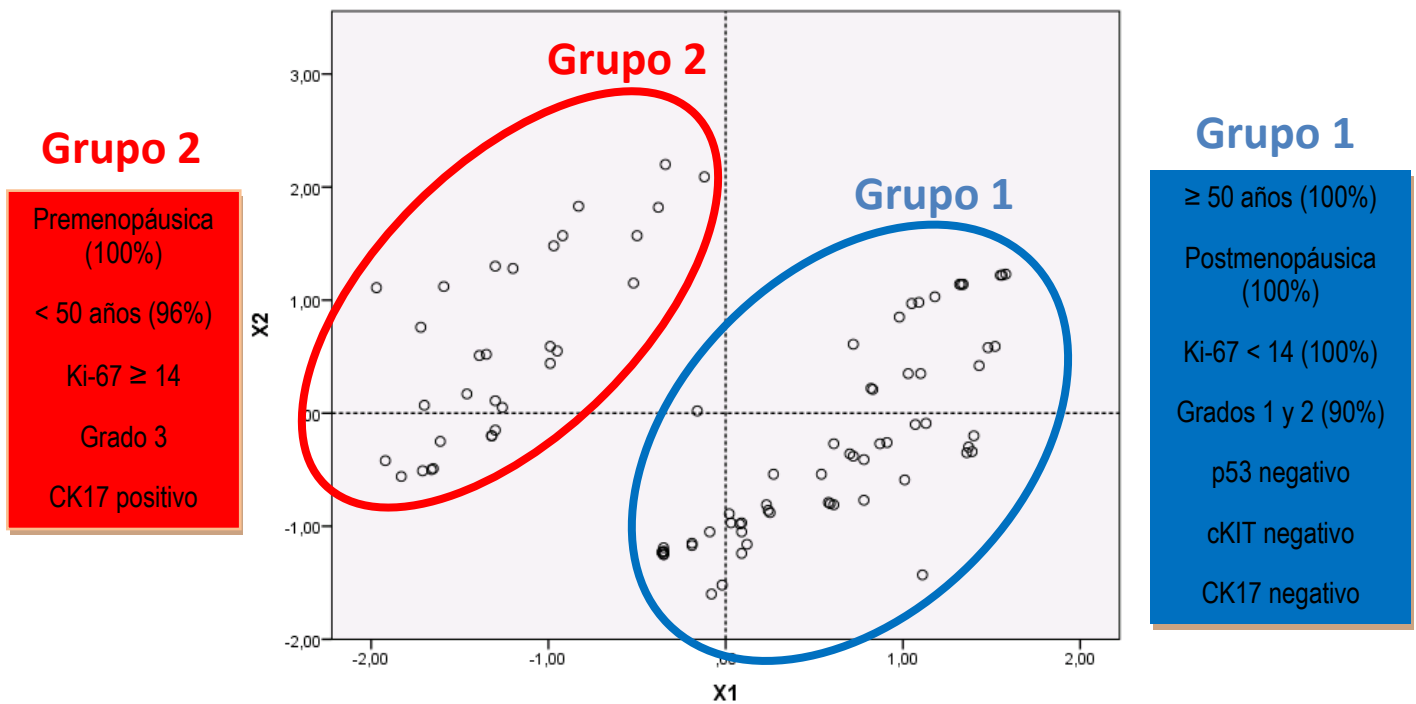


Figura 40: Análisis de conglomerados en la representación de las pacientes según las diferencias en las variables.

Cuando representamos la metilación observamos que cuatro de las cinco pacientes con hipermetilación del promotor de BRCA1 se encuentran en el grupo 2 ($p=0,069$). (Figura 41 y tabla 43).

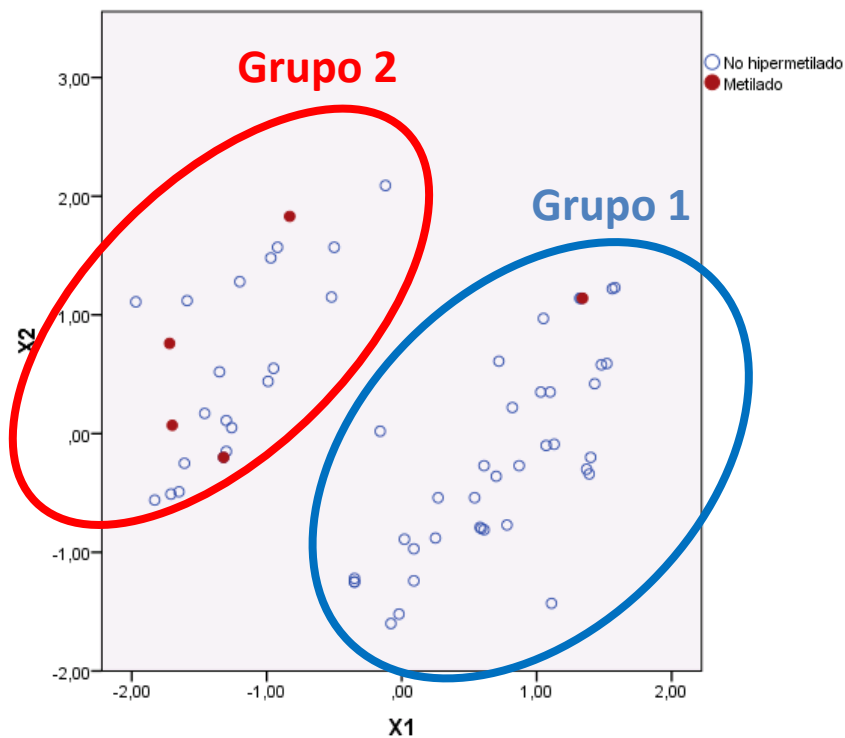


Figura 41: Representación de las pacientes según la metilación del promotor de BRCA1.

Tabla 43: Distribución de la hipermetilación del promotor de BRCA1 en los grupos 1 y 2. $p=0,069$.

	Metilación 0-50% n: 57 (%)	Metilación 51-100% n: 5 (%)
Grupo 1	37 (64,9)	1 (20)
Grupo 2	20 (35,1)	4 (80)

Cuando representamos el porcentaje de metilación de BRCA1 por cuartiles comprobamos que gran parte de las pacientes del cuartil 1 recaen en el grupo 1, mientras que la mayoría de las pacientes de los cuartiles 2, 3 y 4 recaen en el grupo 2, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,024$). (Figura 42 y tabla 44).

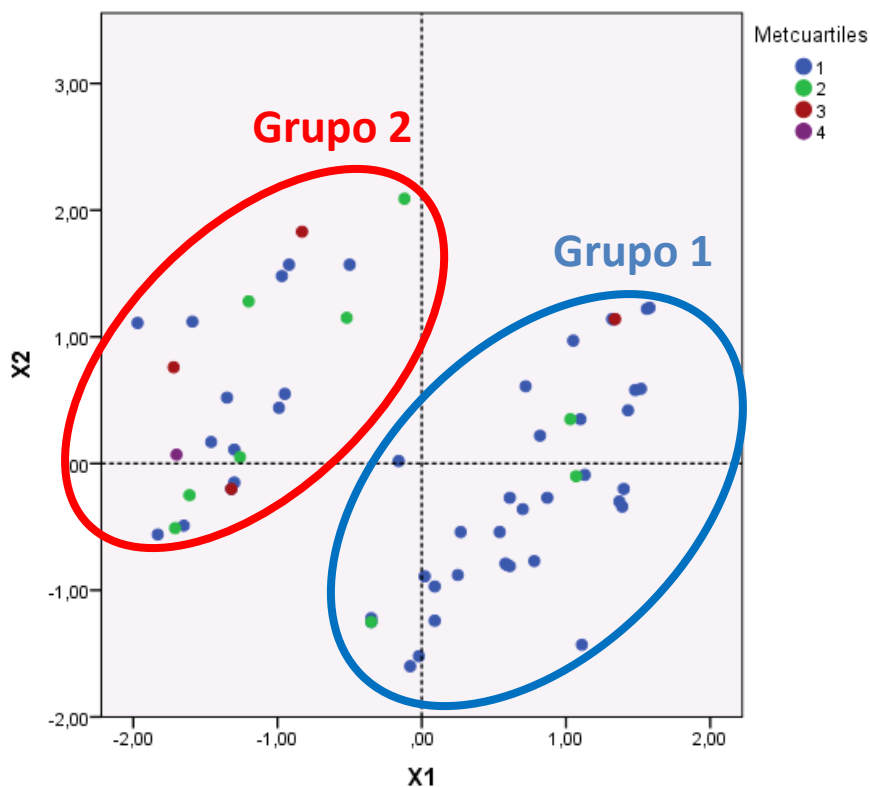


Figura 42: Representación de las pacientes según los cuartiles de metilación del promotor de BRCA1.

Tabla 44: Distribución de los cuartiles de metilación del promotor de BRCA1 en los grupos 1 y 2. $p= 0,024$.

	Met 0-25% n: 48 (%)	Met 26-50% n: 9 (%)	Met 51-75% n: 4 (%)	Met 76-100% n: 1 (%)
Grupo 1	34 (70,8)	3 (33,3)	1 (25)	0 (0)
Grupo 2	14 (29,2)	6 (66,7)	3 (75)	1 (100)

La media del porcentaje de metilación del promotor de BRCA1 en el grupo 2 es superior a la del grupo 1, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (tabla 45).

Tabla 45: Media del porcentaje de metilación del promotor de BRCA1 en los grupos 1 y 2. Prueba de U de Mann-Whitney: $p= 0,022$. IC95% para la diferencia (Bootsrap): (-22,094; -1,519).

	Media de % de metilación
Grupo 1	12,99
Grupo 2	24,28

Por lo tanto la metilación del promotor de BRCA1 se asocia a características de las pacientes del grupo 2, es decir: mujeres premenopáusicas, menores de 50 años y con tumores CK17 positivo, Ki-67 \geq 14 y grado 3.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la supervivencia global de ambos grupos ($p= 0,14$) aunque sí una clara separación de las curvas (figura 43). La mediana de supervivencia global del grupo 2 es de 67 meses frente a una mediana no alcanzada del grupo 1.

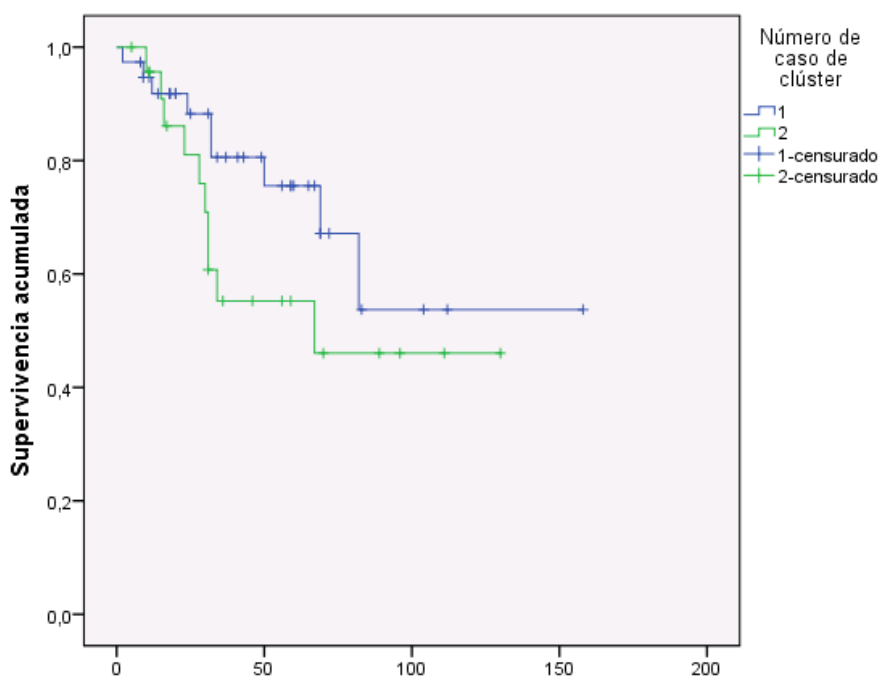


Figura 43: Supervivencia global de los grupos 1 y 2. Estadístico de Breslow, $p= 0,14$.

Cuando analizamos los tratamientos recibidos en ambos grupos observamos que las pacientes del grupo 2 habían recibido más quimioterapia ($p= 0,07$), más antraciclinas ($p= 0,002$), más taxanos ($p= 0,79$) y más radioterapia ($p= 0,077$) (tabla 46). Esto es razonable ya que, al tratarse de pacientes con características iniciales de peor pronóstico (< 50 años, grado 3 y Ki-67 \geq 14), se les considera candidatas a tratamientos más agresivos.

Tabla 46: Tratamientos recibidos en los grupos 1 y 2.

	Grupo 1 n: 38 (%)	Grupo 2 n: 24 (%)	p
Radioterapia	25 (65,8)	21 (87,5)	0,077
Quimioterapia	32 (84,2)	24 (100)	0,073
Antraciclinas	26 (68,4)	24 (100)	0,002
Taxanos	14 (36,8)	10 (41,7)	0,79

DISCUSIÓN

1. Sobre los tumores triple negativo

El primer objetivo de nuestro estudio era seleccionar, dentro de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en el Hospital Universitario de Salamanca, aquellas con tumores triple negativo (91 pacientes), así como analizar sus variables clínicas.

La mediana de edad al diagnóstico en nuestra serie es de 57 años, ligeramente superior a la mediana al diagnóstico de los tumores triple negativo en España (55,2 años) (8).

En nuestro trabajo observamos una asociación entre el tamaño tumoral y el grado histológico (conforme aumenta el tamaño aumenta el grado): el 78% de los tumores T1 son grado 3 frente al 90% de los tumores T2-4. Castaneda et al. describen en su serie de pacientes triple negativo que el 65% de los tumores T1 eran grado 3 frente al 75,4% de los tumores T2-4 (248).

Por otra parte, en nuestra serie el porcentaje de tumores grado 3 es del 84,6%, similar al descrito en otros estudios (75, 77).

Diversos autores relacionan el tamaño tumoral con la afectación ganglionar inicial: Castaneda et al. describen en su serie de pacientes triple negativo que el 21,7% de los tumores T1 tenían ganglios positivos frente al 47,5% de los tumores T2-4 (248). En nuestro estudio la afectación ganglionar inicial es independiente del tamaño tumoral, el 35,7% de los tumores T1 tienen ganglios positivos frente al 33,9% de los tumores T2-4.

Los tumores triple negativo presentan mayor riesgo de recurrencia locorregional que los tumores luminales y menor riesgo de recurrencia locorregional que los tumores HER2 (63). El porcentaje de recaída locorregional en nuestro estudio es del 15% (13 de 87 pacientes), similar al recogido en la literatura (entre el 15 - 20%) (63, 78).

Cuando sumamos las recaídas locorregionales y a distancia en nuestro estudio obtenemos un 31%, dato que concuerda con el descrito en la literatura (en torno al 30%) (8, 78).

En nuestro trabajo el 88% de los tumores tienen un Ki-67 \geq 14%. El elevado índice de proliferación Ki-67 es una característica de los tumores triple negativo y se asocia a un peor pronóstico (76, 249). Nosotros no encontramos diferencias significativas en supervivencia libre de enfermedad, probablemente debido al bajo número de pacientes con Ki-67 $<$ 14% (10 pacientes).

El porcentaje de casos que presentan mutación de p53 por inmunohistoquímica en nuestra serie es del 66%. Sabemos que los tumores triple negativo frecuentemente tienen p53 mutado, pero el porcentaje descrito suele ser inferior, en torno al 45% (77). Aunque conocemos que la mutación de p53 es un factor

independiente pronóstico negativo (127), en nuestro análisis no encontramos diferencias significativas en supervivencia libre de enfermedad.

19 de las 91 pacientes de nuestra serie tenían realizado el estudio genético de BRCA1 y 2 por historia familiar de cáncer de mama y de ovario y/o por edad menor de 40 años, encontrando mutación de BRCA1 en 6 pacientes (el 31%). Robertson et al. describen un porcentaje de mutación de BRCA1 del 20% en pacientes triple negativo con edad <50 años y/o historia familiar, este porcentaje es inferior al de nuestra serie porque incluyen pacientes entre 40 y 50 años (166).

Las pacientes de nuestro estudio en estadios I-III recibieron el tratamiento óptimo para esta patología: cirugía (mastectomía o tumorectomía), quimioterapia (neoadyuvante o adyuvante) y radioterapia. En los últimos años la neoadyuvancia y la adición de taxanos a las antraciclinas ha ido ganando terreno en este subgrupo debido a su alta agresividad (65, 91, 92); en nuestra serie el 15% de las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante y el 40% la combinación de antraciclinas y taxanos.

La quimioterapia neoadyuvante en pacientes triple negativo logra una tasa de respuestas completas patológicas en torno al 20% y de respuestas parciales patológicas del 60% (74, 81). La respuesta patológica completa se correlaciona con una mayor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (42). En nuestro estudio la tasa de respuestas patológicas completas es del 7,7% (inferior a lo encontrado en otras series, probablemente debido al bajo número de casos) y de respuestas parciales del 53,8% (ligeramente inferior al descrito en la literatura). Además en nuestro estudio la quimioterapia neoadyuvante se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad; esto probablemente sea debido a que la neoadyuvancia está indicada en tumores más avanzados, en los que la reducción de tamaño puede conducir a una cirugía más conservadora.

El patrón de asiento de las metástasis en los tumores triple negativo muestra afinidad por las vísceras, especialmente por pulmón y cerebro (62, 79, 80). En nuestro estudio el pulmón es el órgano más frecuentemente afectado (12,5%), seguido del cerebro (11,5%), hueso (11,5%), hígado (8%) y ganglios a distancia (7%). Curiosamente las pacientes con metástasis de inicio no presentaron metástasis pulmonares y sí un alto porcentaje de afectación ósea (3 de 4 pacientes, 75%); al tratarse de tan sólo cuatro pacientes no podemos sacar conclusiones.

La supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global a 5 años en nuestro estudio es del 60,5% y del 67,6% respectivamente; datos que concuerdan con la literatura. Blows et al. describen una supervivencia global a 5 años en 1.645 pacientes triple negativo de Europa, América del Norte y Australia del 70% (66).

2. Sobre las diferencias entre tumores basal like y triple negativo no basal

Otro de los objetivos del estudio era determinar, dentro de los tumores triple negativo, aquellos pertenecientes al subtipo basal like y al subtipo triple negativo no basal. Para caracterizar estos dos subgrupos moleculares mediante inmunohistoquímica hemos seguido la definición más frecuentemente utilizada de tumores basal like (receptores hormonales negativos, HER2 negativo y EGFR y/o CK5/6 positivo) y de tumores triple negativo no basal (receptores hormonales, HER2, EGFR y CK5/6 negativos), la cual ha demostrado una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 100% (63, 123, 124). Aplicando dicha definición el 50,5% de los tumores triple negativo de nuestra serie son basal like y el 49,5% triple negativo no basal. En la literatura la frecuencia de tumores basal like dentro de los tumores triple negativo habitualmente es superior a la de los tumores triple negativo no basal, aunque los porcentajes varían ampliamente desde el 50% hasta el 80% (56, 74, 77). Prat et al. clasificaron mediante microarrays el 39-54% de una amplia serie de tumores triple negativo como basal like y el resto como no basal, distribuyéndose estos últimos en claudin low (25-39%), HER2 (7-14%), luminal B (4-7%), luminal A (4-5%) y normal like (1%) (57). En otros estudios el porcentaje de basal like en tumores triple negativo asciende al 70-80% (56, 74). En una revisión de 10.159 pacientes con cáncer de mama pertenecientes a 12 estudios clasificados mediante inmunohistoquímica se encontró una frecuencia superior de tumores basal like frente a tumores triple negativo no basal (del 9% frente al 7%) (66).

Existen otras definiciones menos utilizadas para determinar por inmunohistoquímica los tumores basal like, como la siguiente: receptores hormonales negativos, HER2 negativo y EGFR y/o CK5/6 y/o CK17 positivo (125, 126). Cuando aplicamos esta definición en nuestro estudio el porcentaje de tumores basal like aumenta al 75,8%.

El porcentaje de sobreexpresión de EGFR en tumores basal like en nuestro estudio asciende al 84,8%. En otras series el porcentaje es más bajo, rondando el 60% (128), frente al 8% de tumores no basal like en general. Está descrito que la sobreexpresión de EGFR es un factor de mal pronóstico (86), nosotros no encontramos diferencias significativas dentro de los tumores basal like según expresen o no EGFR, pero sí observamos una clara separación en las curvas de supervivencia libre de enfermedad con respecto a aquellos tumores que no lo expresan (triple negativo no basal).

c-KIT se sobreexpresa en los tumores basal like (30% frente al 15% de los cánceres de mama en general) (85). En nuestra serie la expresión de c-KIT se da en un 23,9% de los tumores basal like y en un 37,8% de los tumores triple negativo no basal (diferencias no estadísticamente significativas). Este receptor de membrana se considera un factor pronóstico negativo, estando asociado a una disminución en la supervivencia libre de progresión (131). En nuestra serie no objetivamos diferencias en supervivencia libre de enfermedad.

En nuestro trabajo el porcentaje de afectación ganglionar inicial es del 30% en los tumores basal like y del 42% en los triple negativo no basal. Estos datos concuerdan con la literatura: Voduc et al. describen los siguientes porcentajes de afectación ganglionar inicial según subgrupos (de menor a mayor): basal like 35%, triple negativo no basal 39%, luminal A 41%, luminal B 46%, luminal-HER2 54% y HER2 55% (63).

La tasa de recaídas locorregionales que hemos encontrado de los tumores basal like y triple negativo no basal son muy similares: del 16% y 14% respectivamente. Voduc et al. objetivan una mayor tasa de recaídas locorregionales en los tumores basal like frente a los tumores triple negativo no basal (del 26% frente al 15%) (63).

En cuanto al patrón de asiento de metástasis los tumores basal like y triple negativo no basal presentan, frente a otros subtipos moleculares, una alta tasa de metástasis cerebrales, pulmonares y adenopatías a distancia, y una baja tasa de metástasis óseas (62). En nuestro estudio también encontramos una tasa elevada de afectación pulmonar, cerebral y de adenopatías a distancia. Por orden de frecuencia los tumores basal like afectan al pulmón (18%), cerebro (13,5%), hígado (9%), hueso (9%), dermis a distancia (6,8%) y ganglios a distancia (4,5%). Los tumores triple negativo no basal de nuestro estudio afectan a hueso (14%), cerebro (9%), ganglios a distancia (9%), hígado (7%) y pulmón (7%). No encontramos diferencias significativas entre ellos, si bien llama la atención una mayor afectación pulmonar, cerebral y dérmica en los tumores basal like frente a tumores triple negativo no basal; y una mayor afectación ósea y ganglionar a distancia de los tumores triple negativo no basal frente a los tumores basal like. Una posible explicación al aumento de las metástasis óseas en los tumores triple negativo no basal sería la producida por la limitación de identificar los subtipos moleculares mediante métodos inmunohistoquímicos, de modo que en los tumores triple negativo no basal estuviéramos incluyendo otros subtipos con mayor afinidad por el hueso como los luminales o los HER2.

Sabemos que los tumores basal like tienen peor pronóstico que los tumores triple negativo no basal (66, 124). En nuestra serie observamos una menor mediana de supervivencia libre de enfermedad en el subtipo basal like, aunque sin alcanzar la significación estadística.

3. Sobre la metilación del promotor de BRCA1

El último objetivo de nuestro estudio era cuantificar la metilación del promotor de BRCA1 en los tumores triple negativo ante la discordancia de resultados observados en la literatura. La importancia de conocer la metilación del promotor de BRCA1 surge al observar la similitud fenotípica entre los tumores triple negativo y los tumores con mutación de BRCA1. Como sabemos que el porcentaje de mutaciones de BRCA1 en tumores triple negativo hereditarios (165, 166) y esporádicos (169, 170, 173) no justifica el alto porcentaje de tumores triple negativo con disminución de la expresión de la proteína BRCA1 (144, 147), se presupone que deben existir otros mecanismos de inactivación de dicha proteína distintos a la mutación, entre los que se encontraría la hipermetilación del promotor de dicho gen.

En el cáncer de mama esporádico el porcentaje de hipermetilación de BRCA1 se sitúa entre el 9-30% (216, 217, 222, 224, 228), ocurriendo en todos los subtipos moleculares (174, 229).

En los años 2013 y 2014 se han publicado varios estudios de metilación de BRCA1 en el subgrupo triple negativo, encontrando porcentajes de metilación muy dispares (desde el 15 hasta el 75%). Yamashita et al. analizaron la metilación de BRCA1 en 128 pacientes japoneses: 71 triple negativo y 157 no triple negativo, encontrando hipermetilación en 11 pacientes, todos ellos triple negativo (11 de 71, 16%) (235). Hsu et al. estudiaron la metilación en una muestra de tan sólo 21 pacientes taiwaneses triple negativo, encontrando metilación en un alto porcentaje, en 16 pacientes (el 76%) (223). Un estudio chino realizado por Xu et al. en 167 pacientes triple negativo encontró metilación en el 31% (236). En otro estudio realizado por Ignatov et al. en 70 pacientes alemanes triple negativo el porcentaje de metilación fue del 65% (237). Y en un último estudio realizado en Estados Unidos por Sharma et al. el porcentaje de metilación en 39 pacientes triple negativo fue del 30% (238). La mayoría de estos estudios han utilizado el método MSP (methylation specific PCR), mientras que nosotros hemos utilizado el método QAMA (una versión cuantitativa de MethyLight). Los resultados de nuestro estudio muestran metilación > 50% en 5 tumores (el 8,1% de los tumores estudiados).

Este bajo porcentaje de hipermetilación del promotor de BRCA1 encontrado en nuestro trabajo no explicaría la disminución de la proteína BRCA1 descrita en los tumores triple negativo (144, 147). Por este motivo conviene seguir investigando otras formas de inhibición de la transcripción y traducción de la proteína BRCA1, como son la inactivación de la transcripción por la sobreexpresión de Id4, la inactivación de ARN mensajero por microARN o la ubiquitinización de la proteína BRCA1 (174, 230).

En el cáncer de mama hereditario sin mutación de BRCA1/BRCA2 el porcentaje de hipermetilación de BRCA1 descrito es alto, entre el 40-50% (217, 226). En nuestro estudio ninguno de los cinco tumores hipermetilados tenía historia familiar de cáncer de mama y ovario.

En la literatura el porcentaje de metilación de BRCA1 en el subtipo basal like ronda el 15% (174, 235). En nuestra serie, de los cinco tumores hipermetilados, dos fueron basal like (4,3%) y tres triple negativo no basal (6,7%).

Bosviel et al. relacionan la metilación del promotor de BRCA1 con el tamaño tumoral (la metilación aumenta conforme aumenta el tamaño tumoral) (192). En nuestra serie no encontramos esta asociación.

La metilación de BRCA1 se ha vinculado a tipos histológicos poco frecuentes como los carcinomas metaplásicos, medulares y mucinosos, que suelen agruparse dentro de los tumores basal like. Los porcentajes descritos para estos tipos histológicos son los siguientes: 67% para los medulares, 63% para los metaplásicos (174) y 55% para los mucinosos (228). En nuestra serie tenemos tres carcinomas metaplásicos y dos carcinomas medulares, y ninguno de ellos presenta hipermetilación del promotor de BRCA1. Los cinco casos de hipermetilación se dan en el tipo histológico más frecuente en cáncer de mama que es el carcinoma ductal infiltrante.

También se ha relacionado la hipermetilación de BRCA1 con características de agresividad tumoral, como son un alto grado histológico (222), un mayor porcentaje de índice de proliferación Ki-67 (192) y de invasión linfovascular (235). En nuestra serie el 100% de los tumores hipermetilados son grado 3 y poseen un índice de proliferación Ki-67 \geq 14%.

Otras características asociadas a la metilación del promotor de BRCA1 son la edad menor de 55 años y el estado menstrual premenopáusico y perimenopáusico (216). Paradójicamente Bosviel et al. correlacionaron la hipermetilación de BRCA1 con edad superior a 70 años (192). En nuestra serie encontramos asociación entre un mayor porcentaje de metilación con edad menor de 50 años y con estado menstrual premenopáusico (el 80% de las mujeres con tumores hipermetilados son menores de 50 años y premenopáusicas).

Un hecho que llama la atención en nuestro estudio es la relación entre positividad de la citoqueratina 17 y mayor porcentaje de metilación de BRCA1. Esta citoqueratina forma parte de algunas definiciones inmunohistoquímicas de los tumores basal like. No es de extrañar que la citoqueratina 17 se asocie a características de mayor agresividad tumoral, ya que los tumores basal like sí presentan un peor pronóstico. Thike et al. correlacionaron la positividad para la citoqueratina 17 con una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en cáncer de mama triple negativo (250). Sin embargo en nuestra serie, cuando incluimos la citoqueratina 17 en la definición de tumores basal like, observamos que las curvas de supervivencia libre de enfermedad frente a tumores triple negativo no basal se igualan, hecho que iría en contra de ser un factor pronóstico negativo.

La hipermetilación del promotor de BRCA1 en cáncer de mama se ha asociado a un peor pronóstico (224, 225). En un metanálisis publicado en diciembre de 2013 con 3.205 pacientes con cáncer de mama

pertenecientes a nueve estudios, se evidenció una peor supervivencia global en tumores con metilación del promotor de BRCA1, con una hazard ratio de 1,38 (1,04 - 1,84) (225). En nuestra serie observamos diferencias significativas en supervivencia libre de enfermedad (tanto si agrupamos la metilación por cuartiles como por $\leq 50\%$ y $> 50\%$) y en supervivencia global (cuando agrupamos la metilación por cuartiles).

En cuanto a la respuesta a la quimioterapia de los tumores triple negativo con metilación del promotor de BRCA1 existe discrepancia en la literatura. En 2013 se publicaron dos estudios en los que se demostraba que la metilación confería un mejor pronóstico en pacientes que recibían quimioterapia adyuvante. En el primer estudio Ignatov et al. observaron que en las pacientes triple negativo tratadas con quimioterapia basada en antraciclinas (70 pacientes), aquellas con metilación de BRCA1 lograban una mayor supervivencia libre de enfermedad que las pacientes sin metilación (237). En un segundo estudio realizado en 167 pacientes triple negativo tratadas con quimioterapia adyuvante, Xu et al. concluyeron que aquellas con metilación del promotor tenían mejor pronóstico que las pacientes sin metilación (236). Por el contrario, en 2014 Sharma et al. publicaron un tercer estudio donde las pacientes triple negativo con metilación tratadas con quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos tenían un peor pronóstico (238). En nuestra serie coincidimos con este último estudio, ya que la mayoría de las pacientes estadios I-III recibieron tratamiento de quimioterapia neoadyuvante/adyuvante (el 91%) y, como hemos comentado previamente, el pronóstico fue peor en aquellas que presentaban metilación del promotor.

El hecho de que las pacientes triple negativo con metilación del promotor tengan una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia global inferior a las pacientes sin metilación, a pesar de recibir el tratamiento óptimo de quimioterapia, nos conduce a pensar que, quizás, el tratamiento con antraciclinas y taxanos no sea el mejor tratamiento en este subgrupo de pacientes. Sabemos que los tumores con metilación tienen un déficit funcional de BRCA1, y por ello una alteración en el mecanismo de reparación del ADN por recombinación homóloga. Conocemos que el mecanismo de acción de las antraciclinas consiste en la ruptura de la doble cadena de ADN, el cual es reparado mediante recombinación no homóloga (NHEJ) sin intervención de BRCA1; y también sabemos que los taxanos actúan sobre los microtúbulos en la mitosis y tampoco parecen ser útiles en pacientes con déficit de BRCA1 (89). Sin embargo, agentes alquilantes (como las sales de platino) y los inhibidores de PARP dañan el ADN y se reparan por recombinación homóloga. Existen datos de eficacia de platinos en tumores triple negativo (86) y de eficacia de la metilación de BRCA1 como marcador de respuesta a platinos en cáncer de ovario (251). También existen estudios preliminares de la eficacia de inhibidores de PARP en tumores con metilación de BRCA1 (252, 253). Con todos estos datos podría postularse la metilación de BRCA1 en cáncer de mama como biomarcador de sensibilidad a tratamientos con platinos, inhibidores de PARP y agentes demetilantes como los inhibidores de DNMT.

4. Limitaciones del estudio

- Como hemos comentado en la introducción los tumores triple negativo no basal son una entidad difusa, un cajón de sastre que engloba tumores luminales, HER2 y, sobre todo, claudin low. Si hubiésemos determinado la E-cadherina por inmunohistoquímica hubiéramos podido extraer y analizar de los tumores triple negativo no basal el subgrupo claudin low (receptores de estrógenos negativo, HER2 negativo y E-cadherina negativo) (57, 59, 254).
- No hemos estudiado la mutación de BRCA1 en los tumores sin criterios de historia familiar de cáncer de mama y ovario y/o edad mayor de 40 años. En la introducción comentábamos que hay un porcentaje de pacientes triple negativo esporádicos en los que sí existe mutación germinal de genes implicados en la reparación del ADN mediante recombinación homóloga: de BRCA1 (en torno al 8%), de BRCA2 (del 3%) y de otros genes (3,5%) como PALB2, RAD51 o BARD1 (169, 170, 173). Por este motivo en los últimos años se está sugiriendo ampliar los criterios de estudio genético de BRCA1 y 2 a mujeres diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo en general, especialmente en menores de 50 años (169, 255, 256). La mutación germinal de BRCA1 (mutación en tejido normal o en sangre periférica) es excluyente de hipermetilación de promotor de BRCA1 porque se asocia a una pérdida de heterocigosidad por delección del segundo alelo (227). Sin embargo, cuando la mutación de BRCA1 es somática (detectada en el tumor primario y no en tejido normal o en sangre periférica) sí puede coexistir con hipermetilación del promotor de BRCA1 en el otro alelo.
- No hemos estudiado los niveles de ARN mensajero de BRCA1 para posteriormente correlacionarlos con la metilación. Hay estudios que demuestran que la hipermetilación se asocia con una disminución de ARN mensajero (disminución de la transcripción) de BRCA1 (174, 235).
- Tampoco hemos correlacionado la metilación con los niveles de proteína de BRCA1 mediante inmunohistoquímica. Como disculpa cabe decir que obtuvimos el anticuerpo MS110 (Ab-1) frente al extremo aminoterminal de BRCA1, pero tuvimos problemas técnicos con las tinciones. Varios estudios asocian la hipermetilación de BRCA1 con disminución de la expresión de la proteína BRCA1 (166, 187).
- Una última limitación es que en un tercio de los tumores no hemos obtenido resultado de la metilación de BRCA1.

CONCLUSIONES

1. La concordancia entre tumores triple negativo y tumores basal like definidos por inmunohistoquímica es del 50%.
2. El subgrupo basal like tiene peor pronóstico que el subgrupo triple negativo no basal, con una menor mediana de supervivencia libre de enfermedad.
3. La hipermetilación del promotor de BRCA1 ocurre en un pequeño porcentaje de los tumores de mama triple negativo (8%), de modo que este mecanismo no explicaría la disminución de la proteína BRCA1 descrita en estos tumores.
4. La hipermetilación del promotor no se asocia al subgrupo basal like ni triple negativo no basal.
5. La hipermetilación del promotor de BRCA1 se asocia a factores reconocidos de mal pronóstico como son tumores grado 3, Ki67 ≥ 14 , citoqueratina 17 positiva y a mujeres menores de 50 años y premenopáusicas.
6. La hipermetilación del promotor de BRCA1 es un factor de mal pronóstico: conlleva una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global.

ANEXO

Anexo: Resultados de la metilación del promotor de BRCA1 según la técnica QAMA.

Paciente	Ct FAM	Ct VIC	Δ Ct	Media Δ Ct	% met
1	41,539	44,12	-2,581	-2,859	4,62
	42,953	46,09	-3,137		
2	39,281	43,014	-3,733	-3,5085	1,26
	35,815	39,099	-3,284		
3	33,078	35,996	-2,918	-2,856	4,64
	33,496	36,29	-2,794		
4	32,024	35,391	-3,367	-3,173	3
	31,864	34,843	-2,979		
5	42,046	37,675	4,371	4,371	93,11
6	29,339	30,916	-1,577	-1,4805	10,99
	29,935	31,319	-1,384		
7	30,202	30,55	-0,348	-0,346	17,55
	30,901	31,245	-0,344		
8	32,032	31,017	1,015	1,251	26,78
	32,356	30,869	1,487		
9	32,344	34,379	-2,035	-2,1565	7,08
	33,021	35,299	-2,278		
10	33,253	33,16	0,093	-0,7325	15,31
	33,315	34,873	-1,558		
11	36,051	38,25	-2,199	-1,28	12,15
	36,846	37,223	-0,377		
12	30,832	32,673	-1,841	-1,9065	8,53
	31,614	33,586	-1,972		
13	31,309	33,3	-1,991	-2,12	7,29
	30,715	32,964	-2,249		
14	41,21	39,186	2,024	3,0925	37,42
	41,08	36,919	4,161		
15	35,715	38,279	-2,564	-2,564	4,73
16	36,217	39,178	-2,961	-2,792	3,41
	34,953	37,576	-2,623		
17	36,377	36,803	-0,426	-0,426	17,08
18	36,321	37,221	-0,9	-0,405	17,21
	36,199	36,109	0,09		
19	32,63	35,047	-2,417	-2,417	5,58
20	36,356	38,861	-2,505	-2,505	5,07
21	35,745	38,083	-2,338	-1,5455	10,61
	31,979	32,732	-0,753		
22	36,59	35,348	1,242	1,242	26,72
23	38,638	42,056	-3,418	-3,383	0
	36,432	39,78	-3,348		
24	35,837	38,021	-2,184	-2,339	6,03
	35,92	38,414	-2,494		
25	31,578	33,76	-2,182	-2,1265	6,07
	31,675	33,746	-2,071		
26	34,512	36,361	-1,849	-2,032	6,97

	33,84	36,055	-2,215		
27	41,563	43,239	-1,676	-1,676	10,37
28	40,217	43,14	-2,923	-2,629	1,28
	43,757	46,092	-2,335		
29	41,913	35,732	6,181	3,6125	60,78
	36,044	35	1,044		
30	41,811	39,083	2,728	2,728	52,35
31	39,858	37,275	2,583	2,583	50,96
32	40,546	41,101	-0,555	-0,555	21,05
33	43,345	45,371	-2,026	-2,026	7,03
34	30,182	30,543	-0,361	-0,6395	20,25
	30,17	31,088	-0,918		
35	29,129	30,567	-1,438	-1,5095	11,95
	28,874	30,455	-1,581		
36	33,438	35,635	-2,197	-1,6935	10,2
	32,978	34,168	-1,19		
37	33,491	35,856	-2,365	-0,826	18,47
	36,583	35,87	0,713		
38	32,588	32,498	0,09	0,4605	30,73
	33,046	32,215	0,831		
39	30,282	33,264	-2,982	-2,487	2,64
	30,853	32,845	-1,992		
40	34,059	36,823	-2,764	-2,764	0
41	35,052	37,256	-2,204	-2,204	5,33
42	33,824	34,8	-0,976	-1,119	15,68
	33,149	34,411	-1,262		
43	30,241	32,429	-2,188	-2,0505	6,8
	30,611	32,524	-1,913		
44	37,893	38,598	-0,705	0,0625	19,83
	36,601	35,771	0,83		
45	35,739	38,835	-3,096	-2,666	2,69
	36,037	38,273	-2,236		
46	36,106	37,712	-1,606	-1,8185	8,02
	35,573	37,604	-2,031		
47	35,069	37,674	-2,605	-2,622	2,97
	34,857	37,496	-2,639		
48	43,107	45,236	-2,129	-2,129	6,07
49	30,725	32,563	-1,838	-1,743	6,56
	30,304	31,952	-1,648		
50	34,501	36,844	-2,343	-2,272	3,03
	34,21	36,411	-2,201		
51	29,885	32,216	-2,331	-2,4805	1,63
	31,607	34,237	-2,63		
52	35,123	37,462	-2,339	-2,556	7,61
	33,785	36,558	-2,773		
53	47,7	48,074	-0,374	-2,1865	10,41
	38,931	42,93	-3,999		
54	46,086	46,128	-0,042	-0,042	28,52

55	35,028	33,572	1,456	-0,5215	24,87
	34,147	36,646	-2,499		
56	38,889	35,463	3,426	3,426	54,97
57	46,679	46,102	0,577	0,1535	30,01
	41,091	41,361	-0,27		
58	47,815	44,998	2,817	2,817	50,33
59	30,68	31,171	-0,491	-0,766	23
	32,057	33,098	-1,041		
60	35,025	35,55	-0,525	-0,385	35,23
	35,289	35,534	-0,245		
61	45,093	42,482	2,611	2,611	61,52
62	44,714	47,494	-2,78	-2,78	14,21

BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 01/11/2014.
2. Sanchez MJ, Payer T, De Angelis R, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Annals of Oncology*. 2010;21(Supplement 3):iii30-iii6.
3. Pollán M, García-Mendizabal MJ, Pérez-Gómez B, et al. Situación epidemiológica del cáncer de mama en España. *Psicooncología*. 2007;4(2-3):231-48.
4. Curado MP, Edwards BK, Shin HR. Cancer incidence in five continents. Vol IX. IARC Scientific Publication N° 160. Lyon. 2007.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365:1687-717.
6. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, et al. La situación del cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005.
7. Chirlaque M, Salmeron D, Ardanaz E, et al. Cancer survival in Spain: estimate for nine major cancers. *Annals of Oncology*. 2010;21(Supplement 3):iii21-iii9.
8. GEICAM (Grupo Español de Investigación de Cáncer de Mama). Proyecto El Álamo III (1998-2001). ISBN: 84-938762-5-9. 2014.
9. Bradley CJ, Given CW, Roberts C. Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(7):490.
10. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, et al. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*. 1990;46(5):796.
11. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52.705 women with breast cancer and 108.411 women without breast cancer. *Lancet*. 1997;350:1047.
12. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 2000;152(10):950.
13. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, et al. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer*. 2002;86:76-83.
14. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, et al. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(8):515-25.
15. Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, et al. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol*. 2007;176:19-26.
16. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*. 2006;439:84-8.
17. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret C, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(5):1680-5.

18. Tavassoéli FA, Devilee P. Classification of tumours. World Health Organization, IARC. 2003; 4.
19. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*. 2008;113(7):1511.
20. Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann Oncol*. 2012;23(11):2843-51.
21. Liu GF, Yang Q, Haffty BG, Moran MS. Clinical-pathologic features and long-term outcomes of tubular carcinoma of the breast compared with invasive ductal carcinoma treated with breast conservation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;75(5):1304.
22. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E. A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111(3):541.
23. Pezzi CM, Patel-Parekh L, Cole K, et al. Characteristics and treatment of metaplastic breast cancer: analysis of 892 cases from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(1):166.
24. Edge SB, Byrd DR, Compton CC. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edition. Springer. 2010:347-76.
25. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, et al. Predictor of recurrences for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer*. 1995;76(2266-2274).
26. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06: 10 year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*. 1993;71:2507-14.
27. Susan L. Breast. In: *Manual of surgical pathology*. 2^o ed. Elsevier Inc. 2006:263.
28. Fernandes RC, Bevilacqua JL, Soares IC, et al. Coordinated expression of ER, PR and HER2 define different prognostic subtypes among poorly differentiated breast carcinomas. *Histopathology*. 2009;55(3):346-52.
29. Kontzoglou K, Palla V, Karaolani G, et al. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*. 2013;84(4):219-25.
30. Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E, et al. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:112-20.
31. Burstein HJ, Morrow M. Malignant tumors of the breast. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008; 1606-1654.
32. Sotiriou C. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:790-800.
33. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817.
34. Mook S, Knauer M, Bueno-de-Mesquita JM, et al. Metastatic potential of T1 breast cancer can be predicted by the 70-gene MammaPrint signature. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(5):1406-13.

35. Desmedt C, Piette F, Loi S, et al. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res.* 2007;13(11):3207.
36. Chia SK, Bramwell-Wesley V, Tu D, et al. A 50 gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res.* 2012;Aug 15;18(16):4465-72.
37. Parker JS, Mullins M, Cheang M, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology.* 2009;27(8):1160-7.
38. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): Davies C, Godwin J, Gray R et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9793):771.
39. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365(9472):1687.
40. Forbes JF, Dowsett M, Bradley R, et al. Patient-level meta-analysis of randomized trials of aromatase inhibitors (AI) versus tamoxifen (Tam). *J Clin Oncol.* 2014;32(5s):abstr 529.
41. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis J. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* 2005;97(3):188-94.
42. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology.* 1999;17(2).
43. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2008;10(26(5)):778-85.
44. Carrick S, Parker S, Thornton CE, et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;15(2).
45. National Comprehensive Cancer Network guideline. Breast Cancer. Version I. 2014.
46. Perou CM, Sorlie T. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-52.
47. Sorlie T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98(19):10869-74.
48. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(14):8418-23.
49. Vant Veer LJ. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(31):530-6.
50. Sotiriou C. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(18):10393-8.
51. Bertucci F. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Research.* 2005;65(6):2170-8.

52. Calza S, Hall P, Auer G, et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Research*. 2006;8(4):R34.
53. Zhiyuan H, Cheng F, Daniel S, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7(1):96.
54. Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:560-9.
55. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
56. Prat A, Adamo B, Cheang M, et al. Molecular characterization of basal like and non-basal like triple negative breast cancer. *The Oncologist*. 2013;13:123-33.
57. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2010;12(5):R68.
58. Creighton C, Li X, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(33):13820-5.
59. Voduc D. The other triple negative breast cancer: immunohistochemical and clinicopathologic characterization of the claudin low subtype. *J Clin Oncol*. 2011;29(abstr. 1129).
60. Espinosa E. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(29):7278-85.
61. Park S KJ, Kim MS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21(1):50-7.
62. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(20):3271-7.
63. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1684-91.
64. Prat A, Cheang M, Martin M, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined Luminal A breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(2):203-9.
65. Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1168-76.
66. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Medicine*. 2010;7(5):e1000279.
67. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(7):3983-8.

68. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nature Medicine*. 2009;15(8):842-4.
69. Lim E, Vaillant F, Wu D, et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*. 2009;15(8):907-13.
70. Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, et al. BRCA1 Basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):403-17.
71. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805:105-17.
72. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control*. 2009;20(7):1071-82.
73. Amirikia KC, Mills P, Bush J, Newman LA. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women: Implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer*. 2011;117(12):2747-53.
74. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938-48.
75. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52:108-18.
76. Peng Y. Potential prognostic tumor biomarkers in triple-negative breast carcinoma. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2012;44(5):666-72.
77. Carey LA. Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. *The Oncologist*. 2010;15(Supplement 5):49-56.
78. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4429-34.
79. Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108-14.
80. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, et al. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(2):423-8.
81. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(8):1275-81.
82. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(8):2329-34.
83. Frasci G, Comella P, Rinaldo M, et al. Preoperative weekly cisplatin-epirubicin-paclitaxel with G-CSF support in triple-negative large operable breast cancer. *Annals of Oncology*. 2009;20(7):1185-92.
84. Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(2):359-63.

85. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(7):1145-53.
86. Petrelli F, Coinu A, Borgonovo K, et al. The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;144:223-32.
87. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. PREPARE trial: a randomized phase III trial comparing preoperative, dose-dense, dose-intensified chemotherapy with epirubicin, paclitaxel and CMF versus a standard-dosed epirubicin/cyclophosphamide followed by paclitaxel darbeoetin alfa in primary breast cancer-results at the time of surgery. *Annals of Oncology*. 2011;22(9):1988-98.
88. Citron ML. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(8):1431-9.
89. Chalasani P, Livingston R. Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with BRCAness: a review. *The Oncologist*. 2013;18(8):909-16.
90. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*. 2006;295(14):1658.
91. Ellis P, Barrett-Lee P, Johnson L, et al. Sequential docetaxel as adjuvant chemotherapy for early breast cancer (TACT): an open-label, phase III, randomised controlled trial. *Lancet*. 2009;373(9676):1681-92.
92. Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(1):149.
93. Sparano JA, Wang M, Martino S, et al. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1663-71.
94. Kyprianou N, Jiang Y, Wenjin Y, et al. First efficacy results of capecitabine with anthracycline- and taxane-based adjuvant therapy in high-risk early breast cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e32474.
95. GluzO, Nitz UA, Harbeck N, et al. Triple-negative high-risk breast cancer derives particular benefit from dose intensification of adjuvant chemotherapy: results of WSG AM-01 trial. *Annals of Oncology*. 2008;19(5):861-70.
96. Thomas ES, Gomez HL, Li RK, et al. Ixabepilone plus capecitabine for metastatic breast cancer progressing after anthracycline and taxane treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5210-7.
97. Fan Y, Xu BH, Yuan P, et al. Docetaxel-cisplatin might be superior to docetaxel-capecitabine in the first-line treatment of metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(5):1219-25.
98. Staudacher L, Cottu PH, Dieras V, et al. Platinum-based chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer: the Institut Curie experience. *Annals of Oncology*. 2010;22(4):848-56.
99. Mancini P, Angeloni A, Risi E, et al. Standard of care and promising new agents for Triple Negative metastatic breast cancer. *Cancers*. 2014;6:2187-223.

100. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2615-23.
101. Baselga J, Gómez P, Greil R, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(20):2586-92.
102. Green M, Francis PA, Gebski V, et al. Gefitinib treatment in hormone-resistant and hormone receptor-negative advanced breast cancer. *Annals of Oncology.* 2009;20(11):1813-7.
103. Dickler MN, Cobleigh MA, Miller KD, et al. Efficacy and safety of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009:115-21.
104. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(10):1639-46.
105. Miles DW, Chan A, Dirix LY, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(20):3239-47.
106. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:2666-76.
107. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(10):1252-60.
108. O'Shaughnessy J, Miles D, Gray RJ, et al. A meta-analysis of overall survival data from three randomized trials of bevacizumab (BV) and first-line chemotherapy as treatment for patients with metastatic breast cancer (MBC). *ASCO meeting abstracts.* 2010;1005.
109. Crown J, Dieras D, Staroslawska E, et al. Phase III trial of sunitinib (SU) in combination with capecitabine (C) versus C in previously treated advanced breast cancer (ABC). *ASCO meeting abstracts.* 2010;LBA1011.
110. Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376(9737):235-44.
111. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2011;364:205-14.
112. O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA, et al. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(34):3840-47.
113. Isakoff SJ, Overmoyer B, Tung NM. A phase II trial of the PARP inhibitor veliparib (ABT888) and temozolomide for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):Abstract 1019.
114. Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, et al. Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res.* 2011;17(21):6905-13.

115. Lacey M, Minton S, Schmitt M. Phase II trial of the HDAC inhibitor, vorinostat, in combination with tamoxifen for patients with advanced breast cancer who have failed prior antihormonal therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106 (Supplement 1) Abstract 2097.
116. Ha K, Fiskus W, Choi DS, et al. Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget.* 2014;5(14):5637-50.
117. Buchsbaum DJ, Zhou T, Grizzle WE, et al. Antitumor efficacy of TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody alone or in combination with chemotherapy and/or radiation therapy in a human breast cancer model. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3731-41.
118. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center NCIN. Bicalutamide in treating patients with metastatic breast cancer. NIH Web site <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/>. NCT00468715. 2007.
119. Gonzalez-Angulo AM. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(7):2472-8.
120. Stemke-Hale K. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6084-91.
121. Liu X, Gomez-Pinillos A, Ferrari AC. Simultaneous targeting of the androgen receptor and PI3K/mTOR pathway in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *J Clin Oncol.* 2010;28:(suppl; abstr e15049).
122. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology.* 2006;49:22-34.
123. Nielsen T, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-74.
124. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1368-76.
125. Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1991-6.
126. Rakha E, Reis-Filho JS. Basal-like breast carcinoma from expression profiling to routine practice. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:860-8.
127. Friedrichs K, Gluba S, Eidtrann H, et al. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer.* 1993;72(12):3641-7.
128. Turner NC, Reis-Filho J. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene.* 2006;25(43):5846-53.
129. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer.* 2001;37(4):9-15.
130. Perou C. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist.* 2010;15:39-48.
131. Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, et al. C-Kit expression as a prognostic molecular marker in patients with basal-like breast cancer. *British Journal of Surgery.* 2013;100(4):490-6.

132. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2750-67.
133. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, et al. Are triple negative tumours and basal-like breast cancer synonymous?. *Breast Cancer Res* 2007;9:404.
134. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet*. 1991;48(2):232-42.
135. Narod SA. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *The Lancet*. 1991;338:82-3.
136. Miki Y. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266:66-71.
137. Albertsen H, Plaetke R, Ballard L, et al. Genetic mapping of the BRCA1 region on chromosome 17q21. *Am J Hum Genet*. 1994;54(3):516-25.
138. Albertsen HM, Smith SA, Mazoyer S, et al. A physical map and candidate genes in the BRCA1 region on chromosome 17q12-21. *Nat Genet*. 1994;7(4):472-9.
139. Thai TH, Du F, Tsan JT, et al. Mutations in the BRCA1-associated RING domain (BARD1) gene in primary breast, ovarian and uterine cancers. *Hum Mol Genet*. 1998;7(2):195-202.
140. Bork P, Hofmann K, Bucher P, et al. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J*. 1997;11(1):68-76.
141. Monteiro AN, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;26;93(24):13595-9.
142. Yoshikawa K. Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases. *Clin Cancer Res*. 1999;5:1249-61.
143. Wilson CA, Ramos L, Villaseñor MR, et al. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet*. 1999;21(2):236-40.
144. Perez-Valles A, Martorell-Cebollada M, Nogueira-Vazquez E, et al. The usefulness of antibodies to the BRCA1 protein in detecting the mutated BRCA1 gene. An immunohistochemical study. *J Clin Pathol* 2001;54:476-80.
145. Byrne TJ. An antibody assay predictive of BRCA1 mutations in ovarian tumors and normal tissue. *Oncology reports*. 2000;7:949-53.
146. Lambie H, Miremadi A, Pinder EA, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in sporadic breast carcinomas. *The Journal of Pathology*. 2003;200(2):207-13.
147. Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, et al. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human Pathology*. 2008;39(6):857-65.
148. Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(3):193-204.

149. Zhong Q, Chen CF, Li S, et al. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*. 1999;Jul 30;285(5428):747-50.
150. Xu X, Weaver Z, Linke SP, et al. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell*. 1999;3(3):389-95.
151. Welch PL, Lee MK, Gonzalez-Hernandez RM, et al. BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;May 28;99(11):7560-5.
152. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, et al. BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2003;196(1):19-41.
153. Tirkkonen M, Kainu T, Loman N, et al. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;24:56-61.
154. Wessels LF, van Welsem T, Hart AA, et al. *Cancer Res*. 2002;62:7110-7.
155. Thompson D, Easton DF. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(18):1358-65.
156. Langston AA. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med*. 1996;334(3):137-42.
157. Garcia-Casado Z, Romero I, Fernandez-Serra A, et al. A de novo complete BRCA1 gene deletion identified in a Spanish woman with early bilateral breast cancer. *BMC Medical Genetics*. 2011;12(1):134.
158. Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 2009;462(7276):1005-10.
159. Díez O, Osorio A, Durán M, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: A high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Human Mutation*. 2003;22(4):301-12.
160. Whittemore AS, Gong G, Itnyre J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 1997;60(3):496-504.
161. Fitzgerald MG. Germ-line BRCA1 mutations in jewish and non-jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med*. 1996;334(3):143-9.
162. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(23):2339-47.
163. Breast Cancer Information Core (BIC):
http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/.
164. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Cáncer Hereditario, II Edición. Criterios diagnósticos en los síndromes de cáncer hereditario*. 2010:111-2. ISBN: 978-84-614-5232-3.
165. Kwon JS, Gutierrez-Barrera AM, Young D, et al. Expanding the criteria for BRCA mutation testing in breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(27):4214-20.
166. Robertson L, Hanson H, Seal S, et al. BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years. *Br J Cancer*. 2012;106(6):1234-8.

167. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Cáncer Hereditario*, II Edición. Síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario: aspectos clínicos. 2010:431-53. ISBN: 978-84-614-5232-3.
168. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5175-80.
169. Andrés R, Pajares I, Balmaña J, et al. Association of BRCA1 germline mutations in young onset triple-negative breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(3):280-4.
170. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33(4):304-11.
171. E Signori, Bagni C, Papa S, et al. A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. *Oncogene*. 2001;20:4596-600.
172. Khoo US. Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 1999;18:4643-6.
173. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(5):1082-9.
174. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(14):2126-32.
175. Waddington CH. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of drosophila. *Proc Natl Acad Sci*. 1939;25:299-307.
176. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238:163-70.
177. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1424-9.
178. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128:683-92.
179. Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1443-4.
180. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:769-84.
181. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:5459-68.
182. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005;353:1768-71.
183. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301:89-92.
184. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.
185. Müller CI, Rüter B, Koeffler HP, Lübbert M. DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7:315-21.

186. Oki Y, Aoki E, Issa JP. Decitabine —bedside to bench. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;61:140-52.
187. Chuang JC, Warner SL, Vollmer D, et al. S110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010;9(5):1443-50.
188. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, et al. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol*. 2002;321:591–9.
189. Delpu Y, Cordelier P, Cho W, et al. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2013;14:15029-58.
190. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37:646–50.
191. Radpour R, Berekati Z, Kohler C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS Medicine*. 2011;6(1).
192. Bosviel R, Garcia S, Lavediaux G, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiology*. 2012;36(3):e177-e82.
193. Zhenga S, Zhao Z. DNA methylation profiling distinguishes three clusters of breast cancer cell lines. *Chemistry & biodiversity*. 2012;9:848-56.
194. Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37:853-62.
195. Fraga MF, Herranz M, Espada J, et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res*. 2004;64:5527-34.
196. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003;300:455.
197. Bestor TH. Transposons reanimated in mice. *Cell Stem Cell*. 2005;122:322-5.
198. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*. 2003;299:1753-5.
199. Pufulete M. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology*. 2003;124:1240-8.
200. Moore LE. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol*. 2008;9:359-66.
201. Hsiung DT. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:108-14.
202. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res*. 2001;61:8659-63.
203. Tomizawa Y, Kohno T, Kondo H, et al. Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2362-8.

204. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8:286-98.
205. Greger V, Passarge E, Hopping W, et al. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989;83:155-8.
206. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:9700-4.
207. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995;1:686-92.
208. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000;26:16-7.
209. Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, et al. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol.* 2002;118:1034– 40.
210. Chiang JW, Karlan BY, Cass L, et al. BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecologic Oncology.* 2006;101(3):403-10.
211. Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res.* 2001;7:2727-30.
212. Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene.* 2004;23:1-8.
213. Veeck J, Ropero S, Setien F, et al. BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)- ribose polymerase inhibitors. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(29):e563-e4.
214. Knudson AG, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975;72:5116–20.
215. Wei M. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Research.* 2005;65(23):10692-9.
216. Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK, et al. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2006;8(4):R38.
217. Honrado E, Osorio A, Milne RL, et al. Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCAX families. *Modern Pathology.* 2007;20(12):1298-306.
218. Esteller M. DNA methylations patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genomics.* 2001;10(26):3001-7.
219. Marsit CJ. Inactivation of the fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene.* 2004;23:1000-4.
220. Narayan G. Promoter hypermethylation of FANCF: disruption of fanconi anemia-BRCA pathway in cervical cancer. *Cancer Res.* 2004;64:2994-7.

221. Bianco T. Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21:147-51.
222. Miyamoto K. Promoter hypermethylation and postranscriptional mechanisms for reduced BRCA1 immunoreactivity in sporadic human breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2002;32(3):79-84.
223. Hsu NC, Huang YF, Yokoyama KK, et al. Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(2).
224. Catteau A, Harris WH, Xu CF, et al. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene*. 1999;18:1957-65.
225. Wu L, Wang F, Xu R, et al. Promoter methylation of BRCA1 in the prognosis of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;142(3):619-27.
226. Tapia T, Smalley SV, Kohen P, et al. Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics*. 2008;3:3:157-63.
227. Lips EH, Mulder L, Oonk A, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *British Journal of Cancer*. 2013;108(10):2172-7.
228. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(7):564-9.
229. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005;91:179-86.
230. Wen YH, Ho A, Patil S, et al. Id4 protein is highly expressed in triple-negative breast carcinomas: possible implications for BRCA1 downregulation. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(1):93-102.
231. Choudhury AD, Xu H, Baer R. Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. *J Biol Chem*. 2004;279:33909-18.
232. Xiang T, Jia Y, Sherris D, et al. Targeting the Akt/mTOR pathway in Brca1-deficient cancers. *Oncogene*. 2011;30(21):2443-50.
233. Baldassarre G, Battista S, Belletti B, et al. Negative regulation of BRCA1 gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol Cell Biol*. 2003;23:2225-38.
234. Lips EH, Mulder L, Hannemann J, et al. Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2011;22:870-6.
235. Yamashita N, Tokunaga E, Tanaka K, et al. The BRCA1 promoter methylation is one of the mechanisms of the BRCA1 dysfunction of triple-negative breast cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium*. 2013.
236. Xu Y, Diao L, Chen Y, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2013;24:1498-505.
237. Ignatov T, Poehlmann A, Ignatov A, et al. BRCA1 promoter methylation is a marker of better response to anthracycline-based therapy in sporadic TNBC. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;141(2):205-12.

238. Sharma P, Stecklein SR, Kimler FB, et al. The prognostic value of BRCA1 promoter methylation in early stage triple negative breast cancer. *J Cancer Ther Res.* 2014;3(2):1-11.
239. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics.* 2010;11(3):191.
240. Gautier F, Bunemann H, Grotjahn L. Analysis of calf-thymus satellite DNA: evidence for specific methylation of cytosine in C-G. sequences. *Eur J Biochem* 1977;80:175–83.
241. Yan PS, Potter D, Deatherage DE, et al. Differential methylation hybridization: profiling DNA methylation with a high-density CpG island microarray. *Methods Mol Biol.* 2009;507:89-106.
242. Mukhopadhyay R. The binding sites for the chromatin insulator protein CTCF map to DNA methylation-free domains genome-wide. *Genome Res.* 2004;14:1594–602.
243. Frommer M. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:1827–31.
244. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands (DNA methylation/tumor suppressor genes/p16/p15). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9821-6.
245. Eads CA. Methy-Light: a high throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research.* 2000;28(8).
246. Zeschnick M. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Research.* 2004;32(16):e125-e.
247. Radpour R, Kohler C, Haghghi M, et al. Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array. *Oncogene.* 2009;28(33):2969-78.
248. Castaneda C, Andrés E, Bárcena C, et al. Behavior of breast cancer molecular subtypes through tumour progression. *Clin Transl Oncol.* 2012;14:481-5.
249. Falato C, Lorent J, Tani E, et al. Ki67 measured in metastatic tissue and prognosis in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;147(2):407-14.
250. Thike AA, Iqbal J, Cheok PY, et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(7):956-64.
251. Stefansson OA, Villanueva A, Vidal A, et al. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics.* 2012;7(11):1225-9.
252. Ibragimova I, Cairns P. Assays for hypermethylation of the BRCA1 gene promoter in tumor cells to predict sensitivity to PARP-inhibitor therapy. *Methods Mol Biol.* 2011;780:277-91.
253. Cai F, Ge I, Wang M, et al. Pyrosequencing analysis of BRCA1 methylation level in breast cancer cells. *Tumour Biol.* 2014;35(4):3839-44.
254. Romero A, Prat A, García-Sáenz JA, et al. Assignment of tumor subtype by genomic testing and pathologic-based approximations: implications on patient's management and therapy selection. *Clinical and Translational Oncology.* 2014;16(4):386-94.

255. Lu KH, Wood ME, Daniels M, et al. American Society of Clinical Oncology Expert Statement: Collection and Use of a Cancer Family History for Oncology Providers. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;10:833-40.
256. National Comprehensive Cancer Network guideline. Breast and/or ovarian cancer genetic assessment. Version II. 2014.