

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**VALOR PRONÓSTICO DE LOS RECEPTORES DE ANDRÓGENOS
EN EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.**

IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS.

Marta Eguía Larrea

Director

Dr. Luis Muñoz Bellvís

TESIS DOCTORAL

**VALOR PRONÓSTICO DE LOS RECEPTORES DE ANDRÓGENOS EN
EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.**

IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS.

Marta Eguía Larrea

Director

Dr. Luis Muñoz Bellvís



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

D. Francisco Santiago Lozano Sánchez, Director del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el Trabajo Doctoral titulado “Valor pronóstico de los receptores de andrógenos en el cáncer de mama triple negativo. Implicaciones terapéuticas”, del que es autora Dña. Marta Eguía Larrea, reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador para optar al **Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.**

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Salamanca a 3 de junio de 2019

Fdo. Dr. Francisco Santiago Lozano Sánchez

D. Luis Muñoz Bellvís, doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Cirugía y Jefe de Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el Trabajo Doctoral realizado bajo mi dirección por doña Marta Eguía Larrea titulado “Valor pronóstico de los receptores de andrógenos en el cáncer de mama triple negativo. Implicaciones terapéuticas”, reúne las condiciones de originalidad y cumple los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador para optar al **Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.**

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Salamanca a 3 de junio de 2019

Fdo. Dr. Luis Muñoz Bellvís

**COMPLEJO
ASISTENCIAL
UNIVERSITARIO
DE SALAMANCA**

Paseo de San Vicente, 58-182

37007 Salamanca

Comité Ético de Investigación Clínica
Teléfono: 923 29 11 00 – Ext. 55 515



E-mail: comite.etico.husa@saludcastillayleon.es

**EL COMITE DE ETICA DE LA INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL AREA
DE SALUD DE SALAMANCA,**

INFORMA

Que el Proyecto de Investigación presentado por D. LUIS MUÑOZ BELLVÍS, D.^a MARTA EGUÍA LARREA y D.^a CARMEN PARRA PÉREZ,

Titulado:

**“VALOR PRONÓSTICO DE LOS RECEPTORES DE ANDRÓGENOS EN EL
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO. POSIBLES IMPLICACIONES
TERAPÉUTICAS”.**

Que presentan como Investigadores, SE AJUSTA A LAS NORMAS ÉTICAS Y DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA, establecidas para tales estudios.

Referencia CEIC: PI9810/2017

Y para que conste lo firma e.n Salamanca con fecha 26 de octubre de 2017.

Agradecimientos.

Quiero agradecer al Dr. Muñoz Bellvís, director de la tesis, su disponibilidad, su exigencia y su capacidad para mejorar la estructura del trabajo para hacerlo más comprensible.

Igualmente a la Dra. Carmen Parra, codirectora, por introducirme en el mundo de la Anatomía Patológica, por su supervisión y disponibilidad siempre para las correcciones.

A D^o Angustias Pérez del IBSAL, por su diligencia para preparar la inmunohistoquímica de las muestras.

A la Dra. María Teresa Cabero Morán, del departamento de Estadística por su aportación a el análisis de los resultados.

A la Dra. Isabel Silva Benito, concedora de los entresijos de la Universidad de Salamanca, por su orientación y consejos.

A mi marido Rafa, por su paciencia, su visión geométrica de los estudios y su colaboración en la maquetación del trabajo.

A mis hijas, Ana y Elena por su paciencia y por haberme permitido estar un poco “ausente” este último par de años.

A mis padres, José Ignacio y Ana María, por haberme transmitido la ilusión de seguir siempre adelante a pesar de las dificultades.

Índice

<i>Índice</i>	3
ABREVIATURAS	4
GLOSARIO	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	16
CLASIFICACIÓN MOLECULAR POR SUBTIPOS INTRÍNSECOS DE CÁNCER DE MAMA (Perou)	16
CLASIFICACIÓN SUBROGADA INMUNOHISTOQUÍMICA UTILIZADA EN LA CLÍNICA	18
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS	31
COHORTE DE PACIENTES	31
INMUNOHISTOQUÍMICA	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
1.- ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA EXISTENCIA DE RA Y DIVERSAS VARIABLES	38
2.- RELACIÓN ENTRE RA, VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y ESTADO DE LA ENFERMEDAD	46
3.- ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN GANGLIONAR.....	56
4.- RELACIÓN ENTRE ESTADO DE RA, KI67 Y EDAD.....	58
5.- ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA	59
DISCUSIÓN	68
1.- TNBC TIPO LAR: PROPUESTA DE MODELO DE TNBC RA+ PARA MODULACIÓN SELECTIVA DE RA	69
2.- RELACIÓN ENTRE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE RA CON OTRAS VÍAS: PTEN, PI3K, HER2, FOXA, GATA3 y p53.	74
3.- EXPRESIÓN DE RA, TRANSFORMACIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL Y DESARROLLO DE METÁSTASIS	80
4.- EFECTOS DE LOS MODULADORES SELECTIVOS DEL RA EN EL TNBC RA+	85
5.- QUIMIORRESISTENCIA DE LOS TNBC. QUIMIORRESISTENCIA DEL TNBC RA POSITIVO.	97
CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	101

ABREVIATURAS

ALCAM: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

APOD: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

ARE: elementos de respuesta de los receptores de andrógenos.

AREG: anfiregulina.

BALBC: ratones atímicos.

BET: *bromodomain and extraterminal*.

BLBC: cáncer de mama *basal like*.

BRCA1: *breast cancer 1*. Es un gen supresor tumoral.

BRCA2: *breast cancer 2*.

CAUSA: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

CBR: razón de beneficio clínico.

ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina

CCL5: es un quimiotáctico para células T, eosinófilos y basófilos. Juega un importante papel reclutando leucocitos en la inflamación. Es un factor paracrino, probablemente producido por células mesenquimales, relacionado con la transformación epitelial-mesenquimal que precede a las metástasis.

CD4: los linfocitos T colaboradores maduros siempre expresan su proteína de superficie CD4. Los linfocitos T que expresan activamente su CD4 son entonces llamados linfocitos T CD4+.

CD20: antígeno CD propio de mamíferos que podría regular la actividad de linfocitos B.

CD24: molécula de adhesión intercelular.

CD44: es una glucoproteína de superficie celular involucrada en interacciones célula a célula, adhesión celular y migración.

CK 5/6: citoqueratina 5/6.

CLDN8: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

CR: respuesta completa.

DHT: dihidrotestosterona.

DHCR24: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

DRFS: supervivencia libre de enfermedad a distancia.

D-RA: nivel de andrógenos séricos. El sistema de valoración D-RA refleja el nivel de andrógenos séricos. Actúa como indicador pronóstico en casi todos los tipos de cáncer de mama y predice metástasis.

ERK1/2: señal extracelular regulada por kinasa. Relacionada con la meiosis, mitosis y funciones postmitóticas en células diferenciadas.

EMT: transición/transformación epitelial-mesenquimal.

ERCC: gen proliferativo. Proteína de reparación de la excisión del DNA.

ESMO: European Society of Medical Oncology.

ESR1: RE1 (receptor de estrógeno 1).

ESR2: RE2 (receptor de estrógeno 2).

FASN: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

FKBP5: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

FOXA1: forkhead box protein 1.

GBX2: gastrulation brain homeobox 2.

GATA: los factores de transcripción GATA son una familia de proteínas caracterizada por su capacidad de unirse a la secuencia de ADN GATA (donde G es guanina, A es adenina y T es timina).

GTx-027: SARM (modulador selectivo de los receptores de andrógenos).

GTx-024: SARM (modulador selectivo de los receptores de andrógenos desarrollado en clínica - enobosarm-).

GYP17A1: 17 hidroxilasa (enzima relacionada con el metabolismo de los andrógenos)

H3K4me2: histona H3 lisina 4 metilación.

H3K9me2: histona H3 lisina 9 metilación.

HER 2 neu/ erbB2: receptor de factor de crecimiento epidérmico.

HERB3: otro receptor de tirosin kinasa de la familia del erbB2.

IHQ: inmunohistoquímica

IL3: interleucina 3.

IL4: interleucina 4.

IL5: interleucina 5.

IL6: interleucina 6.

IM cancer: cáncer de mama triple negativo inmunomodulador o inmunoenriquecido.

IPARP: inhibidor de la poliADP ribosa polimerasa.

KLLN: proteína de unión al DNA, involucrada en el control de la apoptosis a través de la apoptosis inducida p53/Tp53.

KRT16: queratina 16.

KRT18: queratina 18, marcador epitelial luminal.

Ki67/ MIB1: molécula que interviene en el ciclo celular, antígeno nuclear humano de naturaleza proteica no histónica presente en todas las células con actividad proliferativa y ausente en las que no están proliferando. Su síntesis se inicia en la fase G1 del ciclo celular y aumenta durante la fase de síntesis (fase S), alcanzando su máxima expresión al final de esta según unos autores o en las fases G2/M según otros. Desde que, en 1983, Gerdes et al. elaboraron un anticuerpo anti-Ki67 útil en tejido congelado, distintos estudios han consolidado el estudio de IHQ como el método de evaluación más rápido y fidedigno de la actividad proliferativa celular en tumores sólidos. Además de su utilidad como marcador de proliferación celular, se ha comprobado también su valor pronóstico.

LAR: cáncer de mama triple negativo subtipo receptor de andrógeno luminal de la clasificación de Lehmann-Pietenpol.

LC: líneas celulares:

BT549 ML: línea celular de origen mamario, triple negativo, tipo mesenquimal *stem cell like*.

CAL-148: modelo de células de TNBC subtipo LAR.

HCC 1806 BL2: línea celular epitelial de origen mamario de un carcinoma de células escamosas acantolítico de grado II, estadio IIB, son representativas de TNBC BL2.

MCF-7: es una línea celular de cáncer de mama aislada en 1970 de una mujer de 69 años de raza caucásica, receptor de estrógenos positivo.

MCF-10 A: es una línea celular epitelial no tumorigénica. Fue producida por cultivo durante un largo periodo de tiempo en medio libre de suero con baja concentración de calcio.

MDA-MB-231: la línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente. Estas células fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad en el Anderson Hospital (Houston, EEUU). Se ha comprobado que estas células presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo poco enriquecidos, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. Poseen abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero paradójicamente no se sobreestimulan con dicho factor. Los estudios bioquímicos y genéticos con estas células han contribuido enormemente a la investigación del cáncer de mama y al desarrollo de fármacos para ayudar a combatirlo. Se utiliza como modelo de TNBC RA+.

MDA-MB-453: línea celular de cáncer de mama que expresa RA, en ausencia de RE y RP. Con frecuencia esta línea celular es erbB2 positiva.

MFM-223: modelo de célula de TNBC subtipo LAR.

SUM185PE: modelo de células TNBC subtipo LAR.

SUM 159PT MSL: es una línea celular modelo de TNBC subtipo mesenchymal stem cell. Las SUM-159PT inyectadas en el subcutáneo de ratones atímicos oforectomizados, son tumorigénicas en ausencia de suplemento de estradiol.

T47D: es una línea celular derivada de la afectación pleural de un carcinoma ductal encontrado en la mama de una paciente añosa.

LnCaP: células de adenocarcinoma de próstata humana sensibles a andrógeno (con receptores de andrógenos) derivadas de una adenopatía metastásica supraclavicular izquierda de un hombre de 50 años caucásico.

LSD1: lisina demetilasa.

MA: molecular apocrino.

MAD1: proteína de control de la mitosis.

MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos.

MDACC: MD Anderson Cancer Center.

MMP3/IL6: factores paracrinos probablemente producidos por células epiteliales, relacionados con la transformación epitelial/mesenquimal.

MMP28: matrixmetallopeptidasa 28.

MSC: mesenchymal stem cell.

ML: mesenchymal like.

Myc: protooncogén Myc.

NCCN: National Comprehensive Cancer Network.

NCT01889238: ensayo clínico de enzalutamida en TNBC RA+ (cáncer de mama triple negativo, receptor de andrógeno positivo) metastásico.

NC01990209: ensayo clínico de enzalutamida en RA+ metastásicos (cáncer de mama receptor de andrógeno positivo metastásico).

NCT02091960: ensayo clínico para evaluar la eficacia y seguridad de la enzalutamida con trastuzumab en pacientes erbB2 positivos, RA positivos y cáncer de mama localmente avanzado.

NCT02368691: ensayo clínico de enobosarm en TNBC RA+ (cáncer de mama triple negativo receptor de andrógeno positivo metastásico).

NCT02689427: ensayo clínico de enzalutamida y paclitaxel en cáncer de mama triple negativo, receptor de andrógeno positivo, como tratamiento sistémico primario.

NCT02750358: ensayo clínico de la enzalutamida en pacientes en estadio inicial TNBC RA+ (cáncer de mama triple negativo receptor de andrógeno positivo).

NCT00468715: ensayo clínico fase II de la bicalutamida para tratamiento de cáncer de mama metastásico RA+, RE-, RP-.

NQ01: gen que codifica la enzima NAD(P)H deshidrogenasa.

NVP-BEZ235: inhibidor de tirosin kinasa.

OPG: osteoprotegerina

P53: gen supresor tumoral.

PALB2: el gen PALB2 recibe el nombre de socio y localizador del gen BRCA2.

pCR: respuesta patológica completa.

PDGFR beta: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PFS: supervivencia libre de progresión.

PIP: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

PI3K/AKT/mTOR: fosfatidil inositol 3 quinasa/ protein quinasa/ blanco mamífero de la rapamicina.

PR: respuesta parcial.

QNBC: cáncer de mama cuádruple negativo.

RA: receptor de andrógeno.

RA F876L: mutación de RA que lleva a la resistencia a antiandrógenos.

RCB: residual cancer burden. Carga tumoral residual.

RE: receptor de estrógeno.

RFS: supervivencia libre de recurrencia.

RP: receptor de progesterona.

SARM: moduladores selectivos de los receptores de andrógenos.

SD: enfermedad estable.

shRNA: short hairpin de RNA.

siRNA: RNA sintético.

SPDEF: marcador coactivador de cáncer de mama triple negativo subtipo LAR (luminal receptor de andrógenos).

TCF7L2: proteína de factor de transcripción.

TGF alfa: factor de crecimiento de transformación alfa.

TNBC: cáncer de mama triple negativo.

TMH-BCM: Methodist Hospital, Baylor College of Medicine.

TRAIL: ligando que induce apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral.

UNS: cáncer de mama triple negativo inestable de la clasificación de Lehmann-Pietenpol.

VEGFR2: gen relacionado con la angiogénesis.

Wnt/ beta catenina: vía de señalización de la WNT/ beta catenina.

WNT11: la familia de genes WNT están relacionados con proteínas de señalización secretadas. Estas proteínas se han implicado en la oncogénesis y en varios procesos de desarrollo, incluida la regulación del destino celular y el patrón durante la embriogénesis.

XBP1: marcador luminal.

ZEB1: factor de transcripción.

GLOSARIO

Abiraterona: inhibidor de la 17 hidroxilasa.

Aurora quinasa: las proteínas de la familia Aurora quinasa son un grupo de enzimas con gran relevancia en el proceso de división celular. Estas enzimas fueron descritas en una gran variedad de organismos y han mostrado estar altamente conservadas en la evolución. El número de miembros de esta familia varía entre organismos y van desde uno en levaduras hasta tres en mamíferos. Entre los procesos donde están involucradas se destacan la maduración y división del centrosoma, condensación de la cromatina, ensamblado del huso mitótico, corrección de errores en la unión de los microtúbulos al cinetocoro e iniciación de la citocinesis.

Antraciclina: las antraciclinas son un grupo de medicamentos que se emplean en el tratamiento del cáncer. Son agentes citostáticos obtenidos a partir de cultivos de *Streptomyces*. Los más utilizados son doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina e idarrubicina.

Caspasa: las caspasas son una familia de enzimas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas). Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis, la muerte celular programada, de especial relevancia en los procesos morfogénicos del desarrollo embrionario. Algunas caspasas también están implicadas en procesos de maduración proteica como en el caso de mediadores del sistema inmune del tipo de las interleucinas. Por estos motivos, fallos en los procesos mediados por caspasas son algunos de los principales responsables del desarrollo de tumores y enfermedades autoinmunes, así como una excesiva activación se cree vinculada con enfermedades como el Alzheimer.

Cetuximab: anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se une al EGFR, bloquea la unión de los ligandos endógenos al EGFR lo que provoca la inhibición de la función del receptor.

Ciencia epigenómica: estudio de los cambios epigenéticos en una célula. Los cambios epigenéticos son los cambios que se producen en el modo en que los genes se activan o desactivan sin cambiar la secuencia misma del ADN. Estos cambios dependerían de la edad y la exposición

a factores ambientales como el régimen de alimentación, el ejercicio, los medicamentos y las sustancias químicas. Los cambios epigenéticos pueden afectar el riesgo de enfermedades de una persona y pueden pasar de los padres a los hijos.

Ciencia metabolómica: es el estudio científico de los procesos químicos que involucran metabolitos. Específicamente, la metabolómica es el "estudio sistemático de las huellas únicas que dejan los procesos celulares específicos en su paso", es decir, el estudio del perfil de los metabolitos (moléculas pequeñas) de una muestra biológica. El metaboloma representa la colección de todos los metabolitos en una célula, tejido, órgano u organismo que son producto de los procesos celulares. El análisis de los datos de la expresión génica de ARN mensajero y de proteómica revela el conjunto de productos génicos que se están produciendo en la célula y son datos que representan una sola faceta de la función celular. Por el contrario, el perfilado metabólico ayuda a obtener una captura instantánea de la fisiología de la célula. Uno de los retos de la biología de sistemas y la genómica funcional es integrar la información de la proteómica, transcriptómica y metabolómica para proveer un mejor entendimiento de la biología celular.

Ciencia proteómica: es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con genómica, el estudio de los genes. La palabra "proteoma" es la fusión de "proteína" y "genoma", y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994, mientras trabajaba en ese concepto como estudiante de doctorado. El proteoma es la dotación completa de proteínas.

Ciencia transcriptómica: desde la caracterización del genoma humano, han surgido nuevas vías de investigación sobre el análisis global del material genético. Es evidente que no todo el genoma se transcribe y se traduce finalmente en proteínas, lo que ha dado lugar a conceptos objeto de debate, como el de ADN basura, que en realidad únicamente se caracteriza por el desconocimiento científico de muchas de sus funciones. Así pues, un reto consiste en estudiar qué porción del genoma es transcrito a ARN mensajero, es decir, qué material genético es expresado en un tipo celular bajo unas condiciones dadas. Así pues, el concepto de transcriptoma surge para representar todo este ARNm transcrito en ciertas circunstancias, de forma global. Cabe destacar que, aunque se habla del genoma humano, este epíteto no tiene sentido para el transcriptoma humano, puesto que hay infinidad de transcriptomas en función del tipo tisular o las condiciones ambientales incluso para la misma especie.

Cistroma: el término cistroma proviene de cistr (de cistron) y oma (de genoma). Un cistroma es una palabra alternativa a un gen. Se utiliza para enfatizar que los genes exhiben un comportamiento específico en una prueba cis-trans: distintas posiciones o loci dentro de un genoma son cistrónicos.

Claudin low breast cancer: los genes claudin son necesarios para la adhesión célula a célula. Los cánceres de mama claudin low podrían corresponderse con el mesenchymal like de los triples negativos.

Elemento de respuesta a hormonas o HRE: es un elemento de respuesta específico de hormonas, que consiste en una secuencia corta de ADN dispuesta en el promotor de un gen, a la cual puede unirse de forma específica un receptor de hormonas y así regular la transcripción).

Epigenética: conjunto de reacciones químicas que modifican la actividad del DNA sin modificar su secuencia

Gefitinib: inhibidor de factor de crecimiento epidérmico. (EGFR).

Histonas: las histonas son proteínas básicas, de baja masa molecular, y están muy conservadas (en términos evolutivos) entre los eucariotas así como en algunos procariotas. Forman la cromatina, junto con el ADN, sobre la base, entre otras, de unas unidades conocidas como nucleosomas. La cromatina resuelve el problema del tamaño del ADN dentro del núcleo, compactándolo. La cromatina está formada por ADN y varios tipos de proteínas, las principales de las cuales son las histonas.

Matrigel 3D: es un extracto de membrana basal soluble de un tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana reconstituida formada por laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicano principalmente.

Molecular Apocrino: se considera que un cáncer de mama es molecular apocrino, si más del 10% de las células presentan rasgos apocriños: núcleos redondeados, citoplasma granular eosinófilo, vacuolización citoplasmática, nucléolos eosinófilos, ocasionalmente basófilos. Desde un punto de vista inmunohistoquímico pueden ser triples negativos o tumores erbB2 positivos.

Microarray: un chip de ADN (del inglés DNA microarray) es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN. Las superficies empleadas para fijar el ADN son muy variables y pueden ser de vidrio, plástico e incluso de silicona.

Orteronel; es un inhibidor no esteroideo de la 17 hidroxilasa CYP17A1 desarrollado para el tratamiento del cáncer. La 17 hidroxilasa cataliza la conversión de pregnenolona en dehidroepiandrosterona y de progesterona en androstendiona.

Palbociclib: inhibidor altamente selectivo y reversible de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6. La ciclina D1 y las CDK4/6 son factores en los que confluyen múltiples vías de señalización que conducen a la proliferación celular.

Predict AR: biomarcador diagnóstico genómico que predice qué pacientes con cáncer de mama triple negativo avanzado son sensibles al tratamiento con el inhibidor de receptor de andrógenos enzalutamida.

Proteínas Wnt: forman parte de una numerosa familia de glucoproteínas de secreción que se unen a los receptores Frizzled y a proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad, proceso que logra estabilizar la β -catenina e iniciar una compleja cascada de señalización relacionada con diferentes mecanismos de regulación

Stem Cell; las células madre son células que se encuentran en todos los organismos pluricelulares y que tienen la capacidad de dividirse (a través de la mitosis) y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, además de autorrenovarse para producir más células madre. En los mamíferos, existen diversos tipos de células madre que se pueden clasificar teniendo en cuenta su potencia celular, es decir, el número de diferentes tipos celulares en los que puede diferenciarse. En los organismos adultos, las células madre y las células progenitoras actúan en la regeneración o reparación de los tejidos del organismo.

Seviteronel; es un inhibidor no esteroideo de CYP17A1 y actúa inhibiendo la producción de andrógenos y estrógenos en el cuerpo.

Taselisib: (GDC-0032): es un inhibidor de fosfatidil inositol 3 quinasa (PIK3CA).

Valor predictivo negativo (PV-): probabilidad de no tener una enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es negativo.

Valor predictivo positivo (PV+): probabilidad de tener una enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es positivo.

Xenoinjerto: trasplante de un órgano, un tejido o células a un individuo de otra especie.

RESUMEN

Es conocido que los cánceres de mama triple negativo tienen peor pronóstico que otros tipos y que la cirugía y la quimioterapia son las únicas opciones de tratamiento. Planteamos la determinación del receptor de andrógeno como un rasgo de estos tumores que puede asociarse a mejor pronóstico. Para intentar demostrarlo se ha realizado la determinación del receptor de andrógeno en muestras de tumor de pacientes con cáncer de mama triple negativo tratadas en el Complejo asistencial Universitario de Salamanca durante los últimos 14 años.

Como en otros estudios, comprobamos que la positividad del receptor de andrógeno se asocia a tumores más diferenciados (menor grado histológico), a menor índice de proliferación (menor Ki67 /Mib-1) y mayor positividad de la determinación de GATA3, que se asocia a tumores más luminales.

La relación de la vía de señalización del receptor de andrógeno con otras vías de señalización (AREG, PI3K/AKT/mTOR...) abre no sólo la posibilidad de la modulación de los receptores de andrógenos como diana de tratamiento, sino que también la posibilidad de asociar esta terapia con inhibidores de otras vías de señalización relacionadas con el receptor de andrógeno.

Así mismo, la modulación selectiva de los receptores de andrógenos parece que puede bloquear la transformación epitelial-célula stem mesenquimal que precede al desarrollo de las metástasis.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tecnologías de alto rendimiento que han permitido analizar infinidad de datos de forma simultánea y el desarrollo de ciencias como la proteómica, metabolómica, transcriptómica o epigenómica, ha producido un cambio en la forma de entender y clasificar el cáncer de mama.

A nivel de la clínica, la necesidad de llevar a la práctica estos avances y cambios ha requerido aproximaciones subrogadas de esta nueva clasificación. Así, tras definir Perou en el año 2000 los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, se ha realizado una clasificación subrogada basada en hallazgos inmunohistoquímicos y de hibridación in situ.

Perou realizó un estudio con *microarrays* y definió 5 subtipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, basal like, HER2 positivo y normal like¹. La clasificación molecular por subtipos intrínsecos presenta la dificultad de la metodología, razón por la que en la clínica nos basamos en el estado de los receptores hormonales de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), amplificación de HER2 neu (receptor de factor de crecimiento epidérmico) y el marcador de proliferación MIB-1 ó Ki67.

Para una mayor y mejor comprensión presentamos a continuación la clasificación general molecular intrínseca del cáncer de mama en la actualidad (Tabla 1) y la clasificación clínica subrogada (Tabla 2).

CLASIFICACIÓN MOLECULAR POR SUBTIPOS INTRÍNSECOS DE CÁNCER DE MAMA (Perou)

1.- TIPO LUMINAL

Constituye el 75%-80% de los cánceres de mama. Se caracteriza por la alta expresión de genes asociados a las células epiteliales lumbales del ducto mamario. Comprende a los tumores que expresan receptores de estrógenos. Dentro de este grupo hay subtipos con pronóstico y evolución diferentes.

1.A.- Subtipo Luminal A.

RE+, RP+, HER2- , Ki67 < del 20%. Son el 50-60% de los tumores luminales. Se caracteriza por mejor pronóstico con menor frecuencia de recaídas. La metástasis ósea es la más frecuente y las metástasis viscerales o del SNC (sistema nervioso central) son menos frecuentes. Presentan mayor supervivencia en caso de recaída, alta tasa de respuesta a la hormonoterapia y escaso o nulo beneficio de la quimioterapia. En las guías clínicas de ESMO (European Society of Medical Oncology) y NCCN (National Comprehensive Cancer Network) se recomiendan las plataformas genéticas, si están disponibles, para precisar el riesgo y ayudar a la decisión de tratamiento quimioterápico adyuvante.

1.B.- Subtipo Luminal B.

RE+, RP+/-, HER2+/- Ki67 alto (mayor del 20%). Presenta una expresión moderada -baja de RE y mayor expresión de genes de proliferación y de ciclo celular. Son los tumores luminales de mal pronóstico. La recidiva ósea es frecuente, presentan mayor tasa de recidivas viscerales y la supervivencia desde el diagnóstico de la recidiva es inferior. Se benefician de la quimioterapia y de la hormonoterapia.

2.- TIPO HER2+.

RE-, HER2+. Se caracteriza por tener RE negativos y alta expresión de genes relacionados con la amplificación de HER2. Se asocian a un peor pronóstico que los subtipos luminales A y B y son tributarios de un tratamiento diana específico con los anticuerpos monoclonales trastuzumab y pertuzumab. Tienen alta respuesta a tratamientos de quimioterapia que incluyan taxanos y/o antraciclinas.

3.- NORMAL LIKE.

Sobreexpresan genes propios de las células mioepiteliales de la mama normal y de las células adiposas, con disminución de los genes de las células luminales, carece de correlación clínica y no se utiliza en la práctica diaria.

4.- BASAL LIKE.

Muchas veces se ha equiparado al cáncer de mama triple negativo (RE-, RP-y HER2 neu-), pero no todos los basal like son triples negativos, de hecho, el basal es uno de los subtipos moleculares de triples negativo (TNBC). Se caracterizan por la expresión de genes proliferativos y relacionados con el daño del DNA.

Tabla 1 Subtipos intrínsecos de cáncer de mama (Perou).

SUBTIPO	RE	RP	HER2	Ki67	CK	Genes
Luminal A	+	+	-	< 20%	8, 18	FOXA1, ESR1, XBP1, GATA3
Luminal B	+	+	+/-	> 20%	8, 18	FOXA1, ESR1, GATA3, genes proliferativos
Her2	-	-	+	alto	Luminales	ERB2, PI3K (AKT, P53), pérdida de PTEN
Basal-like	-	-	-	alto	Basales 5, 6, 14, 17	EGFR, MAPK/AKT/PI3K, Ras/raf, cMYC, CD20

RE: receptor de estrógeno. RP: receptor de progesterona. HER2: receptor de factor de crecimiento epidérmico. Ki67: Mib1 índice de proliferación. CK: citoqueratinas

CLASIFICACIÓN SUBROGADA INMUNOHISTOQUÍMICA UTILIZADA EN LA CLÍNICA

En la tabla 2 se representa la clasificación subrogada basada en la histoquímica, con las características que definen a cada grupo. El tipo triple negativo (TNBC, triple negative breast cancer) representa el 20% de los cánceres de mama.

Tabla 2 Clasificación subrogada inmunohistoquímica utilizada en clínica

SUBTIPO	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+++	+++	-	< 20
Luminal B	+	+	+/-	> 20
Her2	-	-	+	>30%
Triple negativo	-	-	-	>30%

RE: receptor de estrógeno. RP: receptor de progesterona. HER2: receptor de factor de crecimiento epidérmico. Ki67: Mib1 índice de proliferación.

CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

El TNBC (cáncer de mama triple negativo), término utilizado por primera vez en 2005², se define como el que no expresa receptores de estrógenos (RE) ni de progesterona (RP) y no presenta amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2 neu/erbB2). Como consecuencia de la falta de estos receptores, no responde a las terapias endocrinas contra los estrógenos o contra HER 2. No hay tratamientos dirigidos contra TNBC y la quimioterapia permanece como la mejor opción, además de la cirugía.

A pesar de la mejoría de la supervivencia de la mayor parte de pacientes con cáncer de mama, el TNBC continúa asociándose a un pronóstico adverso³. Afecta sobre todo a mujeres jóvenes (mayor prevalencia entre afroamericanas) Presenta mayor tasa de recidivas locales y metástasis a distancia en órganos importantes los tres primeros años tras el diagnóstico^{4,5}, por la falta de terapias específicas, mayores índices de proliferación celular y comportamiento más agresivo.

Numerosos estudios han intentado clasificar el TNBC en subtipos de enfermedad, a través de la identificación de marcadores como el RA (receptor de andrógeno), que es uno de los más extensamente estudiados y controvertidos. En TNBC, la expresión de RA es menor que en otros tipos de cáncer de mama, entre el 0 y 60% dependiendo del anticuerpo utilizado para la determinación de RA, pero la presencia de RA en algunos TNBC permite la manipulación de la vía androgénica como opción terapéutica⁶.

Lehmann y cols.⁷ estudiaron perfiles de expresión génica de un extenso número de TNBC con la intención de subclasificar el TNBC desde un punto de vista molecular. Posteriormente se obtuvieron líneas celulares representativas que se utilizaron como modelo de cada subtipo de enfermedad. Esto y la identificación de guías moleculares en los diferentes modelos de líneas celulares dio una gran idea de la heterogeneidad de la enfermedad TNBC y proporcionó plataformas preclínicas para el desarrollo de tratamientos efectivos. Clasificaron el TNBC en seis subtipos moleculares: basal like, mesenquimal, mesenquimal stem like, inmunoenriquecido (o inmunomodulador), inestable y luminal receptor de andrógeno (LAR) (Tabla 3).

1.- SUBTIPO BASAL LIKE

Se asocia con la expresión de genes característicos de las células mioepiteliales basales del acino mamario. Por IHQ (inmunohistoquímica) presenta expresión de citoqueratinas 5/6, se asocia a

mutación de BRCA1 (gen supresor tumoral) y de EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico), con alta tasa de proliferación y mal pronóstico clínico.

Están sobreactivadas las vías biológicas responsables del ciclo celular y de la respuesta al daño del DNA, provocando proliferación celular acelerada. Este subtipo responde a tratamientos que incluyen sales de platino y están en estudio terapias dirigidas como inhibidores de la PARP (poliADPribosa polimerasa). A este grupo pertenecen los tumores con características diferentes como el carcinoma medular y el carcinoma metaplásico. Se subdivide en basal like 1 y basal like 2.

1.1- BL1 (basal like 1): la proliferación celular aumentada y la pérdida del control del ciclo celular es concordante con la expresión aumentada de genes responsables del daño del DNA. La naturaleza altamente proliferativa de este subtipo se apoya en el hallazgo de alta expresión de mRNA de Ki67 (MIB-1), que a nivel IHQ se corresponde con la tinción nuclear de Ki67. El aumento de genes de proliferación y la expresión aumentada de Ki67 de estos TNBC sugiere que este subtipo respondería inicialmente a antimetabólicos como los taxanos⁸⁻¹⁰. Estos, en neoadyuvancia consiguen una pRC (respuesta completa patológica) del 63%, mayor cuando son tratados con taxanos comparando con el mesenquimal like (31%) o el LAR (14%).

1.2 BL2 (basal like 2): expresa genes relacionados con la señalización de factor de crecimiento (vía EGF y Wnt/beta-catenina). Este subtipo tiene aspectos sugestivos de origen basal y mioepitelial.

2.- SUBTIPOS MESENQUIMAL Y MESENQUIMAL STEM LIKE (M y MSL)

Expresan genes que están relacionados con la motilidad celular (vía Wnt, ALK -anaplastic linfoma kinasa- y vía TGF beta -factor de crecimiento transformante beta-)¹¹.

El subtipo MSL comparte genes para procesos biológicos similares con el subtipo M, incluyendo la motilidad celular (vía Rho), diferenciación celular y vías de crecimiento (Wnt/beta catenina, ALK, TGF beta). La prevalencia de vías de señalización de diferenciación celular y de factor de crecimiento se ilustra por la expresión de componentes de la vía de señalización beta TGF, genes asociados a transición epitelial-mesenquimal (EMT) y disminución de la E-Cadherina, factores de crecimiento y señalización Wnt/beta -catenina.

El subtipo MSL expresa menores niveles de genes de proliferación frente al subtipo M. MSL también está enriquecido en genes relacionados con la angiogénesis como VEGFR2 y presenta aumento de genes relacionados con stem cells y marcadores específicos de stem cells.

Los subtipos M y MSL comparten aspectos similares con un cáncer de mama altamente indiferenciado llamado metaplásico caracterizado por aspectos escamosos o mesenquimales/sarcomatoides y por su quimiorresistencia.

El MSL desarrolla baja expresión de claudin 3, 4 y 7, lo cual coincide con un subtipo de mama indiferenciado llamado claudin low¹². Esta población de tumores que expresa claudin low también tiene alta expresión de genes asociados con EMT. En las últimas clasificaciones de TNBC, se han agrupado M y MSL.

3.- SUBTIPO INMUNOENRIQUECIDO

Se caracteriza por la activación de genes relacionados con procesos inmunes¹⁰. Están activadas las vías de señalización de las células T, células B, las *natural killer* y las células dendríticas. También la señalización responsable de la presentación de antígenos, señalización de citoquinas, y la transducción de señal inmune. Se ha de considerar este subtipo histológico en la infiltración linfocitaria del estroma o el carcinoma medular. Este subtipo suele tener mejor pronóstico que los demás triples negativos. En las últimas clasificaciones de TNBC, se ha omitido el inmunoenriquecido o inmunomodulador.

4.- SUBTIPO INESTABLE (UNS)

Por sus características, no corresponde a ninguno de los anteriores. También se ha omitido en las últimas clasificaciones de TNBC.

5.- SUBTIPO LUMINAL RA (LAR)

Expresan genes altamente enriquecidos en vías reguladas hormonalmente que incluyen síntesis de esteroides, metabolismo de porfirinas, metabolismo de andrógenos y estrógenos y otras vías reguladas por hormonas como el receptor de andrógeno¹³. El RNAm del RA (receptor de andrógeno) es 9 veces mayor que en otros subtipos. El porcentaje de núcleos teñidos con RA y la intensidad de la tinción fue significativamente mayor en el LAR que en otros subtipos de TNBC.

Los inestables (UNS), BL1, BL2 y M expresan altos niveles de otras citoqueratinas mientras que LAR expresa citoqueratinas luminales y otros marcadores luminales como FOXA1.

Tabla 3 Clasificación de Lehmann- Pietenpol del cáncer de mama triple negativo (TNBC).

SUBTIPOS	GENES	VÍAS RELACIONADAS	TERAPIAS	SUBTIPO HISTOLÓGICO
BASAL LIKE	EGFR, alteración Ras/raf, cMyc	Vía MAPK/AKT/PI3K	Antraciclinas, taxanos, sales de platino, IPARP	Carcinoma metaplásico, carcinoma medular
MESENQUIMAL (ML; MSL)	Motilidad celular, crecimiento, EMT	Activación PI3K/AKT	Antraciclinas, taxanos, inh PI3K	Carcinoma metaplásico: escamoso o mesenquimal
LAR	RA, FOXA1, GATA3	Vías de andrógenos y estrógenos	Antraciclinas, taxanos, bloqueo androgénico	Molecular apocrino
INMUNO-ENRIQUECIDO	Procesos inmunes	Vías de señalización de respuesta inmune	Antraciclinas, taxanos	Carcinoma medular

EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico. MAPK/ AKT/PI3CA: proteína quinasa/ serina-treonin quinasa/ fosfatidil inositol quinasa. IPARP: inhibidor de poliADPribosa polimerasa. EMT: transformación epitelial-mesenquimal. ML: mesenchymal like. MSL: mesenchymal stem like. LAR: luminal receptor de andrógeno. RA: receptor de andrógeno

La vía del RA ha recibido una atención especial como diana potencial en cáncer de mama por varias razones, que incluyen el desarrollo de agentes diana contra RA nuevos y mejor tolerados para el cáncer de próstata¹⁴. Varios estudios retrospectivos han mostrado que los RA podrían ser un factor pronóstico predictivo en el cáncer de mama^{15,16}.

Actualmente la mayor incertidumbre relacionada con RA como diana terapéutica potencial en cáncer de mama tiene que ver con la identificación de aquellos pacientes que más se benefician de tratamientos dirigidos contra RA y con el desarrollo de una terapia racional basada en la modulación de RA.

Los andrógenos son detectables en la circulación sanguínea de mujeres a niveles relevantes fisiológicamente y tienen una función biológica. La mayoría de los estudios concluyen con una correlación positiva entre andrógenos circulantes endógenos y riesgo de cáncer de mama, en premenopáusicas¹⁷ y en postmenopáusicas¹⁸. Incluso algunos estudios concluyen que altos niveles de andrógenos predicen el riesgo de recurrencia¹⁹. Por el contrario, los RA, que median el efecto biológico de los andrógenos, se han considerado como un factor pronóstico favorable y metaanálisis recientes relacionaron la expresión de RA con mejor pronóstico en cáncer de mama²⁰.

Para comprender la aparente contradicción entre el papel negativo de los andrógenos y el beneficioso de los RA en la carcinogénesis y el pronóstico del cáncer, se propuso la teoría de que los andrógenos actuaran estimulando el receptor de estrógenos alfa (RE alfa). En el tejido mamario el andrógeno puede ser transformado en androstendiona (precursor de estrona) y la dihidrotestosterona puede convertirse en 17 beta estradiol; ambos productos pueden estimular la vía de los RE²¹ (Fig. 1). También se ha relacionado la vía de RA y la carcinogénesis del cáncer de mama con la amplificación del HER2^{22,23}.

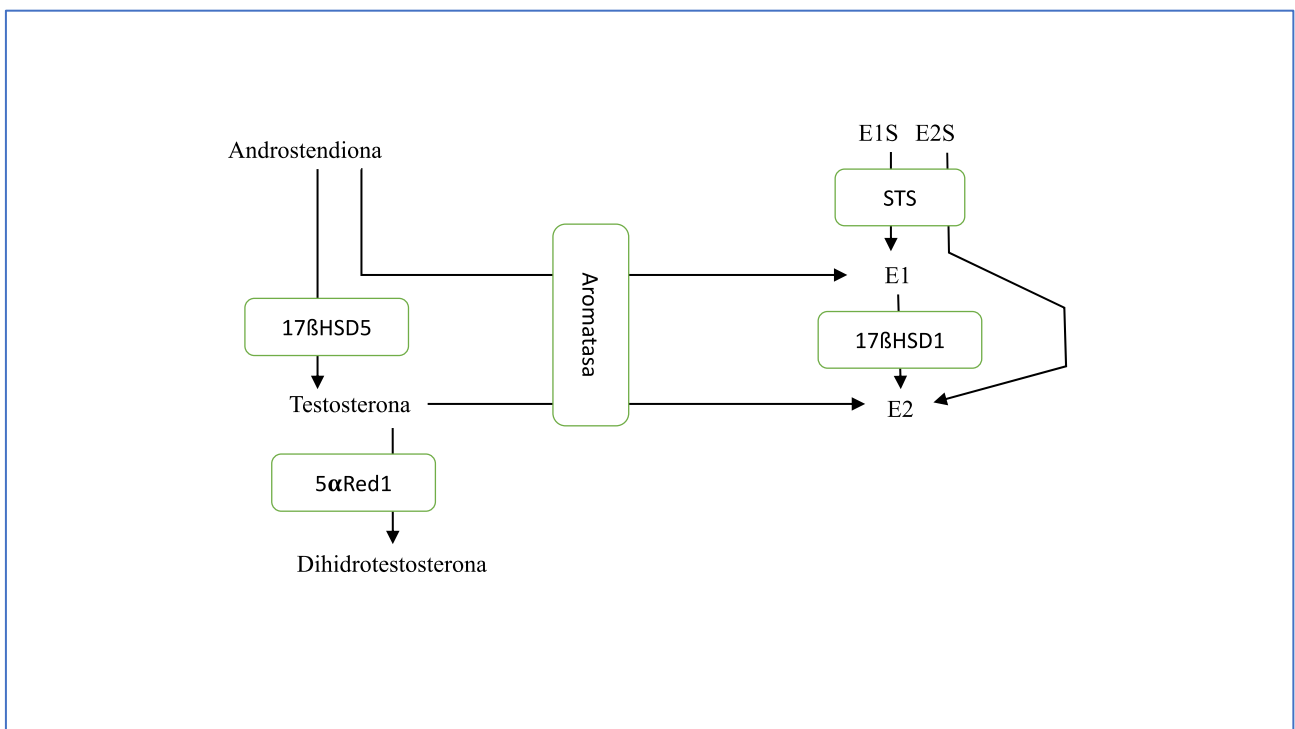


Figura 1.- Metabolismo intratumoral esteroideo ²⁴. 17βHSD5: 17β-hidroxi-deshidrogenasa 5. 17βHSD1: 17β-hidroxi-deshidrogenasa 1. 5αRed1: 5α reductasa 1. E1S: sulfato de estrona. E2S: sulfato de estradiol. STS: sulfotransferasa. E1: estrona. E2: estradiol.

Respecto a estudios in vitro, en líneas celulares, se han obtenido resultados divergentes: algunos autores consideran a los RA como un factor supresor tumoral y otros como un oncogén²⁵. Para entender esto se han propuesto varias teorías como la proporción entre RA:RE, el fondo RE/RP/HER2 y las variantes de RA²⁶.

El TNBC, que se ha podido clasificar en 6 subtipos por expresión génica, es una enfermedad heterogénea que incluye grupos con diferente comportamiento biológico y respuesta a tratamiento, dado que en la práctica clínica no se ha extendido el uso de perfiles de expresión génica, utilizamos

los marcadores inmunohistoquímicos para aproximarnos con una clasificación subrogada, por ejemplo la determinación IHQ de RA para referirse al subtipo receptor de andrógeno luminal (LAR)²⁷, aunque, como se verá, hay TNBC RA+, que no son LAR.

La relevancia de los andrógenos en cáncer de mama se ha reconocido hace tiempo. Los compuestos androgénicos se utilizaron en tratamientos de cáncer de mama entre 1940 y 1980, y se abandonaron por sus efectos virilizantes y por el desarrollo de terapias antiestrogénicas. En líneas celulares TNBC, experimentos con andrógenos han demostrado efectos inhibitorios y estimulantes sobre estas células^{22,28,29}. Debido a la heterogeneidad de los cánceres de mama, el metabolismo esteroideo intracrino (intracelular) y los mecanismos de resistencia a terapias antiestrogénicas, ha resurgido el estudio de las complejidades de la vía de señalización androgénica en cáncer de mama, lo que ha llevado a estudios preclínicos que utilizan antagonistas de los RA como terapias de cáncer de mama en enfermedad metastásica³⁰.

RA se expresa en el 60-70% de los cánceres de mama, de forma parecida a RE, el 10-17% de los cánceres de mama son TNBC y los RA se expresan en el 0-60% de los TNBC³¹. Para líneas celulares RE+/RA+, la activación RA tiene un efecto antiproliferativo mientras que para líneas RE-/RA+ tiene un efecto proliferativo, por lo que el antagonismo RA frente al de RE puede ofrecer una nueva perspectiva de tratamiento^{7,22,32,33}.

Varios estudios han demostrado que la positividad RA se asocia con supervivencia prolongada en cáncer RE+. Sin embargo, la correlación entre RA y pronóstico permanece controvertida en los TNBC.

Recientes artículos han recomendado la utilización de RA como una de las tres proteínas para clasificar el cáncer de mama. Los moduladores selectivos de los receptores de andrógenos (SARM) se han desarrollado para una gran variedad de enfermedades debido a su especificidad elevada para RA, actividad selectiva anabólica, falta de efectos masculinizantes y capacidad de extender la terapia androgénica a mujeres³⁴⁻³⁶. El Enobosarm es el SARM más avanzado en el desarrollo clínico³⁷. En múltiples ensayos en fase II, Enobosarm demostró un incremento significativo en la masa muscular de hombres y mujeres postmenopáusicas, sin los indeseables efectos de otros esteroides equivalentes.

Los cánceres confinados a determinados órganos adquieren potencial metastásico como resultados de una interacción epitelial: stem cell mesenquimal (MSC). Existen líneas de investigación que consideran que el andrógeno dihidrotestosterona es capaz de inducir transición epitelial-mesenquimal, relacionada con el desarrollo de metástasis, en células de cáncer de mama de manera independiente de la vía de los RE, siendo los RA cruciales en este proceso (es decir de forma

dependiente de RA)²⁰, resultados que divergen de aquellos que consideran que la relación entre riesgo aumentado de cáncer de mama y andrógenos séricos es debida a la vía de RE. La invasión a órganos vecinos se produce por factores paracrinicos secretados durante la interacción epitelial: MSC. Estudios in vitro e in vivo indican que factores como CCL5 actúan como llave para permitir el desarrollo de metástasis en cáncer de mama³⁴. Hay varios modelos preclínicos en los que se observa que agonistas de RA tienen un efecto antiproliferativo en cáncer de mama. El crecimiento de líneas celulares triples negativas de cáncer de mama que sobreexpresan RA se inhibe por RA agonistas y el crecimiento de estos tumores en ratones atímicos se inhibe completamente con SARM (Enobosarm). Estos estudios demuestran el papel de los RA en la interacción epitelio: MSC y sugieren que SARM pueden representar una terapéutica selectiva para el tratamiento del cáncer de mama RA+.

El subtipo TNBC LAR, de la clasificación de Lehmann, es similar a los tumores previamente caracterizados como tumores moleculares apocrinos y sus perfiles de expresión génica son similares a los cánceres de mama luminales RE+, a pesar de ser RE-. Dentro de los subtipos moleculares TNBC, LAR tiene la mayor expresión de RA y las investigaciones preclínicas han centrado la eficacia en líneas celulares LAR como modelos de RA+ TNBC. Hay datos preclínicos fuertes para sugerir que el subtipo LAR TNBC puede beneficiarse de terapia dirigida RA, aunque otros subtipos moleculares de TNBC, que también expresan RA, pueden también beneficiarse del tratamiento con RA antagonistas³⁸.

Un ensayo en fase II de Bicalutamida en cáncer de mama metastásico RE-/RP-/RA+ demostró un 19% de beneficio clínico, indicando que antagonistas RA pueden ser una terapia dirigida eficaz en pacientes con RA+ TNBC¹⁴. Está en marcha un ensayo fase II de un antagonista RA de nueva generación; la Enzalutamida, que bloquea la localización nuclear de RA y actúa como un agonista parcial. La mayoría de los estudios in vitro se han focalizado en líneas celulares LAR TNBC con muy alta expresión de RA, pero se sabe poco del papel de la Enzalutamida en otros TNBC con baja expresión de RA³⁸. Parece ser que múltiples subtipos de RA TNBC, no sólo LAR, dependen de RA para proliferación, migración, invasión y crecimiento tumoral in vivo y existen datos preclínicos prometedores de la eficacia de la Enzalutamida en TNBC con baja expresión de RA³⁸.

Los estudios que han investigado el valor pronóstico de RA han concluido que es un marcador pronóstico favorable en cáncer de mama RE+; sin embargo, hay desacuerdo en su significado pronóstico en TNBC. Algunos estudios han mostrado mejoría de supervivencia en TNBC que expresan RA y otros no han demostrado tal mejoría³². Además algunos estudios recientes han sugerido que la expresión RA puede ser incluso un marcador pronóstico adverso en TNBC^{20,25}.

Es frecuente observar TNBC en mutaciones BRCA1. BRCA1 es un gen que juega un papel importante en la reparación de la doble hebra del DNA, contribuyendo a mantener la estabilidad del DNA. Las enzimas PARP (poli ADPribosa polimerasa) son críticas para la reparación adecuada de las roturas del DNA³⁹. Las líneas celulares de tumores que presentan mutaciones de BRCA1 ó BRCA2 son sensibles al inhibidor PARP en estudios preclínicos. De hecho, están en marcha ensayos clínicos que utilizan inhibidores PARP y cisplatino y se muestran prometedores en mutaciones BRCA1-2^{40,41}. Otros marcadores moleculares estudiados en TNBC han sido EGFR⁴², VEGF⁴³ y mTOR⁴⁴, importantes en el diseño de otros ensayos⁷.

Relacionado con los TNBC moleculares apocrinos (tipo LAR de la clasificación de Lehmann) está el marcador GATA 3, que es necesario para la diferenciación celular luminal durante el desarrollo de la glándula mamaria. Además la pérdida de GATA 3 está relacionada con la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis de cáncer de mama⁴⁵. Es un marcador inmunohistoquímico de carcinoma de mama y urotelial utilizado en diagnóstico anatomopatológico, está fuertemente relacionado con el status RE. RE se expresa mucho más ampliamente en cánceres de mama luminales que en otros tipos. La sensibilidad de la tinción GATA 3 está marcadamente reducida en TNBC^{46,47}. A pesar de ser RE negativo, el tipo molecular apocrino está enriquecido con genes relacionados con la señalización de RE, que incluyen FOXA1 y GATA3^{48,49}. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios que consideren la expresión de GATA 3 en relación con los diferentes subtipos moleculares de TNBC.

Al igual que GATA3 ó RA, se han considerado otros marcadores prometedores en TNBC que puedan aportar información pronóstica y predictiva como son Ki67 (MIB-1) y E-cadherina⁵⁰.

Como ya se ha indicado anteriormente el TNBC afecta a mujeres más jóvenes, con frecuencia con mutaciones BRCA, afroamericanas, premenopáusicas, es biológicamente más agresivo, con mayor proporción de recurrencias durante los tres primeros años y mayor frecuencia de metástasis a órganos viscerales y sistema nervioso central (SNC), con menor frecuencia de enfermedad ósea y supervivencia global pobre, los cinco primeros años tras el diagnóstico. Las características anatomopatológicas incluyen tumores de gran tamaño, altamente indiferenciados, con necrosis central, múltiples células apoptósicas y elevado número de ganglios linfáticos positivos⁵¹⁻⁵³. El tipo histológico predominante es el ductal, menos frecuentemente el metaplásico y el medular. Aunque hay muchas similitudes entre basal like y TNBC, y en algún momento se han intercambiado estos términos, no son sinónimos, como se ha comentado. Es verdad que la mayoría de los TNBC tienen fenotipo basal like y la mayoría de los tumores que expresan marcadores basales son TNBC^{54,55}. Sólo el 71% de los TNBC son basal like por perfiles de expresión génica, (el 49% del estudio de

Lehmann)⁷ y sólo el 77% de los basal like son TNBC. Es interesante reseñar que los TNBC que no expresan fenotipo basal like pueden tener mejor pronóstico que los TNBC basal like.

Se ha identificado recientemente un tipo adicional de cáncer de mama llamado Claudin *low*, parcialmente superpuesto con la definición IHQ de TNBC, que se caracteriza por la baja expresión de genes claudin, que son importantes para la adhesión célula a célula, y a menudo presentan aspectos de stem cell y de transición epitelial-mesenquimal^{12,56}.

Lehmann y cols. investigaron los aspectos moleculares del subtipo RA+TNBC, mostrando que la activación de mutaciones PIK3CA eran frecuentes en RA+TNBC, lo cual permite estudiar el uso de antagonistas RA de forma combinada con PIK3/mTOR inhibidores en RA+TNBC^{50,57}.

Por último, dada la clara heterogeneidad de los TNBC a nivel molecular y genético, su tratamiento ha sido desafiante. A pesar de tener gran proporción de respuestas patológicas completas (pCR) tras quimioterapia neoadyuvante, los TNBC tienen con mayor frecuencia metástasis a distancia y peor pronóstico. Entre los TNBC que reciben neoadyuvancia, sólo los que consiguen pCR tienen mejoría de la supervivencia. En contraste, más del 70% de los TNBC tienen enfermedad residual después de neoadyuvancia y están en riesgo elevado de recaída de la enfermedad^{4,58}, con significativamente peor pronóstico, sobre todo los tres primeros años. Paradójicamente, no todos los TNBC con enfermedad residual después de quimioterapia recaen. La identificación de pacientes TNBC quimiorresistentes que recaen frente a aquellas con pronóstico relativamente favorable serviría para distinguir subgrupos con pronóstico diferente entre los TNBC quimiorresistentes. El entendimiento de las vías moleculares de los subgrupos con diferente pronóstico ayudará al diseño de futuros ensayos clínicos⁵⁸.

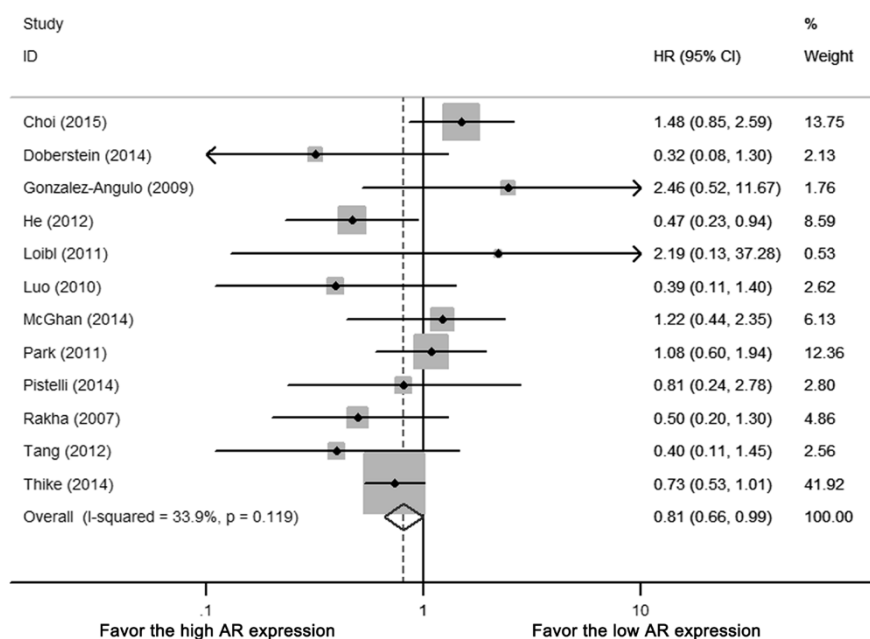
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Parece que la expresión de RA se asocia a menor Ki67, a menor índice mitótico, menor grado histológico y menor estadio clínico en TNBC, dado que los pacientes TNBC RA + tienen menor proporción de mutaciones p 53 (gen supresor tumoral), que se observan hasta en el 80% de los TNBC^{59,60}. Esta mejora de aspectos genéticos e histológicos puede tener que ver con un beneficio clínico y con el hecho de que TNBC RA+ tengan mejor supervivencia libre de enfermedad a distancia y de supervivencia global tal y como se demuestra en algunos estudios⁶¹.

Un estudio retrospectivo que analizó microarrays tisulares de 287 pacientes con TNBC operable encontró una disminución significativa en el número de adenopatías afectas en la enfermedad RA+, este estudio también demostró una diferencia estadísticamente significativa entre la enfermedad RA+ y la RA-, en la que la supervivencia libre de enfermedad a distancia fue del 87% frente al 74,25% y la supervivencia global a los 5 años fue del 94% frente al 82,3%. También un estudio de Lobl y cols, vinculado al ensayo German Gepar Trio notificó que la expresión de RA predijo una supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 85 % comparando con el 65,5% y una supervivencia global de 95,2% comparando con 76,2%⁶¹.

Figura 2 Forest plot de HR para supervivencia libre de enfermedad. De Changjun Wang y cols.



Otros estudios han mostrado que la enfermedad TNBC RA- se asocia a mayor riesgo de recurrencia y de metástasis a distancia, especialmente si hay enfermedad en los ganglios⁶¹⁻⁶³.

Otros análisis no han mostrado diferencias o incluso se han asociado a peores resultados en la enfermedad RA+ (Mc Ghan, Mrklic, Pistelli, Park⁶⁴⁻⁶⁶). Estos datos contradicen lo que la mayoría de los estudios, que muestran mejores resultados o falta de diferencias entre los RA+ y los RA-⁶¹.

El marcador GATA3, considerado un marcador de diferenciación luminal que se relaciona fundamentalmente con el receptor de estrógeno, es un marcador útil en cáncer de mama, observándose que su positividad está reducida en TNBC (se observa positividad hasta en el 40% de los TNBC)^{46,47}.

El marcador GATA 3 es positivo en más del 70% de los TNBC que tienen diferenciación apocrina (los TNBC luminales que presentan también positividad para el RA)⁶⁷. De hecho, la coexpresión de RA y GATA 3 es un aspecto específico del TNBC molecular apocrino. GATA 3 se requiere para la ramificación y la diferenciación luminal celular durante el desarrollo de la glándula mamaria, y la pérdida de GATA3 se relaciona con progresión tumoral y desarrollo de metástasis de cáncer de mama⁶⁸. GATA 3 también es un marcador inmunohistoquímico de carcinoma urotelial y está fuertemente relacionado con el receptor de estrógeno que se expresa en mayor nivel en el subtipo intrínseco de cáncer de mama luminal. A pesar de ser RE negativo, el TNBC molecular apocrino (LAR) está altamente enriquecido con genes relacionados con la señalización de RE, como FOXA y GATA 3. Sin embargo, hay pocos estudios hasta la fecha como el nuestro que examinen GATA3 en TNBC.

Otro aspecto a valorar es la pérdida de expresión de la E-cadherina que es crucial para la adquisición de capacidad metastásica e invasiva de tumores epiteliales⁵⁰. La E-cadherina tiene un papel en la motilidad celular y en la invasión durante el proceso de transición epitelial-mesenquimal y en la extravasación y migración durante el proceso epitelial-mesenquimal, que precede al desarrollo de las metástasis.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL.

Evaluar si la expresión de receptores de andrógeno en cáncer de mama triple negativo (TNBC) se asocia a un pronóstico más favorable.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a. Confirmar si la pérdida expresión de la E-Cadherina está relacionada con el desarrollo de metástasis.
- b. Valorar si la coexpresión de GATA 3 y RA se asocian a TNBC con mejor pronóstico.
- c. Valorar si los TNBC RA+ se asocian a mayor grado de diferenciación, menor índice mitótico (Ki67), estadios más tempranos, menor tamaño tumoral, menor afectación ganglionar, menor índice de recidivas locales y a distancia, mejor supervivencia global y libre de enfermedad.
- d. Valorar si la afectación ganglionar es un factor independiente del estado del RA relacionado con las recidivas locales y a distancia.
- e. Revisar la utilización de la modulación selectiva de los receptores de andrógenos en TNBC que expresen RA para intentar un mejor control local de la enfermedad, para prevenir el desarrollo de metástasis a distancia y para mejorar la respuesta patológica de los tumores TNBC RA+ tras tratamiento sistémico primario convencional.
- f. Revisar la relación de la vía de señalización de los RA con otras vías de señalización para conseguir una acción sinérgica entre la modulación selectiva de los RA y la inhibición de otras vías como el PI3CA o el EFGR.

MATERIAL Y MÉTODOS

COHORTE DE PACIENTES

Tras aprobación del proyecto por el Comité de Ética de la Investigación con el Medicamento (CEIM) del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), se tuvo acceso a las historias clínicas de los pacientes con TNBC tratados en el CAUSA en los 14 últimos años (desde junio de 2003 a diciembre de 2017). El seguimiento finalizó el 31 de diciembre de 2017.

De esta cohorte formada por un total de 230 pacientes se obtuvieron 226 especímenes de TNBC, de ellos una vez realizada la inspección del material se seleccionaron 165 especímenes que tenían tejido completo útil. Las pacientes correspondientes a las muestras de tejido que no fueron útiles, no se incluyeron en el estudio. En alguno de los casos hubo que recurrir a el bloque diagnóstico (BAG diagnóstica) dado que tras terapia sistémica primaria se produjo una respuesta patológica completa y no existía tejido útil en la pieza operatoria.

Se obtuvieron y analizaron los siguientes parámetros a partir de la revisión de historias clínicas y de la consulta electrónica de las mismas: edad del paciente, tipo de cirugía, fecha de intervención quirúrgica, grado y tipo histológico, tamaño tumoral, ganglios afectos, presencia de metástasis, estadio, invasión linfovascular, presencia de necrosis, Ki67 (MIB1), tratamiento adyuvante, neoadyuvancia, recidiva local, recidiva a distancia, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

La supervivencia global se definió como el tiempo entre la intervención quirúrgica y la fecha de la muerte o del último día de seguimiento.

La supervivencia libre de enfermedad se expresó como los meses entre la intervención quirúrgica y la fecha de la recaída (local o a distancia).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se seleccionaron bloques de tumor conservado en parafina con zona tumoral relevante, haciendo cortes de cuatro micras, los cuales fueron estufados durante 12 horas antes de hacer la

inmunohistoquímica de los anticuerpos E-cadherina, GATA3 y Receptor de Andrógeno. La inmunohistoquímica se realizó en inmunoteñidores automáticos BOND mas de Leica, con lo que los tiempos y las temperaturas fueron uniformes para todos. Para su proceso se utilizó el kit de revelado BOND peróxido, que contiene los siguientes reactivos: peróxido de hidrógeno postprimario, polímero DAB y hematoxilina.

Los pasos a seguir para dichas técnicas son los siguientes: una vez se sacan los portas de la estufa, se colocan en bandejas o gradillas con su etiqueta o código de barras para que sean reconocidos y empezar el proceso introduciéndolos en la máquina.

- Paso 1: desparafinado con xilenos y alcohol, rehidratando con agua destilada.
- Paso 2: lavado con buffer.
- Paso 3: bloqueo con peróxido de hidrógeno.
- Paso 4: lavado con buffer.
- Paso 5: anticuerpo primario monoclonal ANTI-E-CADHERINA (CLON: EP700Y) Master Diagnóstica. Anticuerpo primario monoclonal de ratón ANTI-GATA-3 (CLON L50-823). Anticuerpo Monoclonal ANTI -RECEPTOR DE ANDRÓGENO (CLON: AR 44).
- Paso 6: anticuerpo posprimario.
- Paso 7: lavado buffer.
- Paso 8: polímero.
- Paso 9: lavado buffer.
- Paso 10: diaminobencidina (DAB).
- Paso 11: contratinción con hematoxilina.
- Paso 12: lavado con agua destilada.
- Paso 13: deshidratado y montado con medio permanente.

EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

La positividad para los receptores de andrógenos se consideró cuando más del 10% de los núcleos celulares fueron positivos, valorando 100 células de 5 áreas diferentes del tumor⁶.

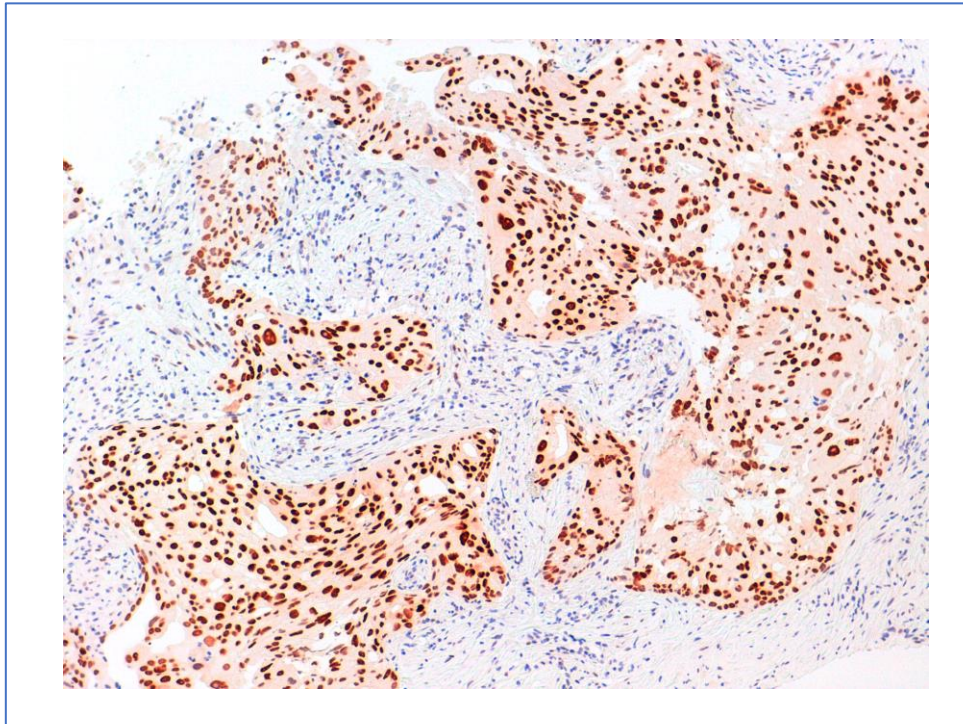


Figura 3. Expresión de los receptores de andrógenos en un aumento de 10x.

La expresión de E-cadherina fue semicuantitativamente analizada según el porcentaje de células que muestran positividad de membrana, considerando positiva la expresión mayor del 30%⁵⁰.

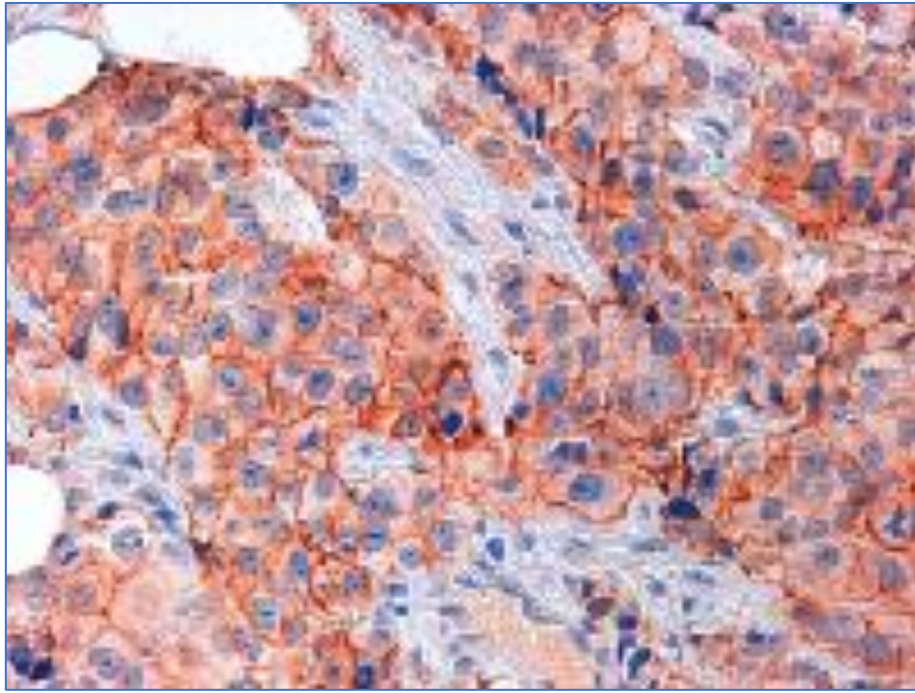


Figura 4. Expresión de E-cadherina en un aumento de 40x.

La inmunotinción de GATA3 fue valorada según la proporción e intensidad de tinción de las células teñidas. La proporción de tinción fue valorada del 0 al 100% y la intensidad de tinción de 0 a 3. El score GATA se obtiene de multiplicar la intensidad de tinción por la proporción de tinción, del 0 a 300%, y categorizada como 0 (negativo), focalmente positivo (1-10), o positivo (mayor de 10). Finalmente se consideraron positivos si era mayor de 1⁶⁷.

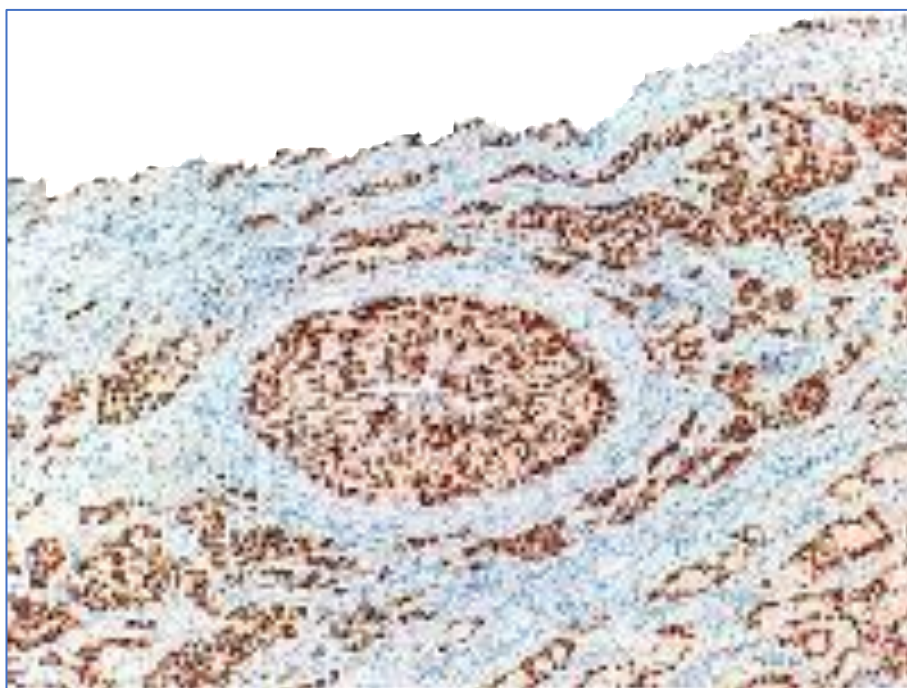


Figura 5. Expresión de GATA3 en un aumento de 10x.

El estudio inmunohistoquímico fue supervisado por un patólogo experto en Patología Mamaria.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un estudio descriptivo y retrospectivo de cohorte de pacientes.

El análisis de datos fue realizado utilizando el SPSS versión 25 de IBM.

Las correlaciones significativas entre la expresión de RA y las características de las pacientes se evaluaron con la Chi cuadrado (o el test exacto de Fisher cuando fue preciso).

La comparación de medias de meses de supervivencia entre los RA+ y los RA- se realizó con la prueba de Levene de comparación de varianzas.

El análisis de supervivencia se realizó utilizando tablas de mortalidad y curvas de Kaplan Meier.

Para la obtención de curvas de predicción de supervivencia se utilizó el modelo de regresión de Cox.

En todas las pruebas se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Todas las pacientes fueron mujeres, con una media de edad de 60 años, con una media de meses de seguimiento de 49,8 y una mediana de 44.
2. El 59,4%, previa valoración y decisión en el Comité de Mama fue tratada con cirugía conservadora, el 32,5% con mastectomía y el 8,1% con mastectomía y reconstrucción.
3. El 2% fueron tumores de grado de diferenciación I, el 19,9% grado II y el 78,1% de grado III.
4. El 90% fueron carcinomas ductales infiltrantes, el 3,7% fueron carcinomas metaplásicos y el 5,6% otros tumores.
5. El 41% fueron tumores T1, el 44,4% T2, el 9,3% T3 y el 5% T4.
6. El 53,2% fueron N0, el 31,6% N1, el 7% N2 y el 8,2% N3.
7. El 4,4% fueron M1.
8. El 25,6% fueron estadio I, el 53,8% estadio II, el 16,9% estadio III y el 3,8% estadio IV.
9. El 90,1% no tenía invasión vaso linfática y el 9,9% sí.
10. El 90,1% no tenía necrosis tumoral y el 9,9% sí.
11. El 15,9% tenían un Ki67 leve (< de 15%), el 18,5% moderado (entre 15 y 30%) y un 65% alto (> de 30%).
12. El 73,2% recibió tratamiento adyuvante y el 26,8% no.
13. El 21,7% recibió terapia sistémica primaria y el 78,3% no.
14. El 80,5% no presentó recidiva local y el 19,5% sí.
15. El 72,8% no desarrolló metástasis a distancia y el 27,2% sí.
16. El 39,4% fueron RA positivos y el 60,6% RA negativos.
17. El 88,8% fueron GATA3 positivos y el 11,3% GATA3 negativos.
18. El 90,1% expresó E-cadherina y el 9,9% no.

Se ha dividido el análisis de los resultados de acuerdo con los siguientes estudios:

- 1: Análisis de la relación entre la existencia de RA y diversas variables.
- 2: Relación entre RA, variables clínico-patológicas y estado de la enfermedad.
- 3: Estudio de la afectación ganglionar.
- 4: Relación entre estado de RA, Ki67 y edad de las pacientes.
- 5: Análisis de Supervivencia.

1.- ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA EXISTENCIA DE RA Y DIVERSAS VARIABLES

Se han considerado las variables enumeradas a continuación.

- 1.1.- Grado de diferenciación.
- 1.2.- Índice de proliferación (Ki67 Mib1).
- 1.3.- GATA3.
- 1.4.- E cadherina.
- 1.5.-T: tamaño tumoral.
- 1.6.- N: afectación ganglionar.
- 1.7.- M: presencia de metástasis en el diagnóstico.
- 1.8.- Estadio del tumor.
- 1.9.- Invasión vaso linfática.
- 1.10- Necrosis tumoral.
- 1.11- Estado pre o postmenopáusico (< ó igual a 50 años y > de 50 años).
- 1.12.- Recaída local.
- 1.13.- Recaída a distancia.

Se pormenorizan a continuación estos resultados.

1.1. GRADO DE DIFERENCIACIÓN

El análisis muestra que existe relación entre el grado de diferenciación del tumor y la expresión de RA. La relación se observa en el grado II y el RA positivo y negativo. El 30% de los RA positivos son grado II mientras que sólo el 13,5% de los RA negativos son grado II. Por lo tanto, los TNBC RA+ se asocian en nuestra serie a mayor grado de diferenciación.

Tabla cruzada

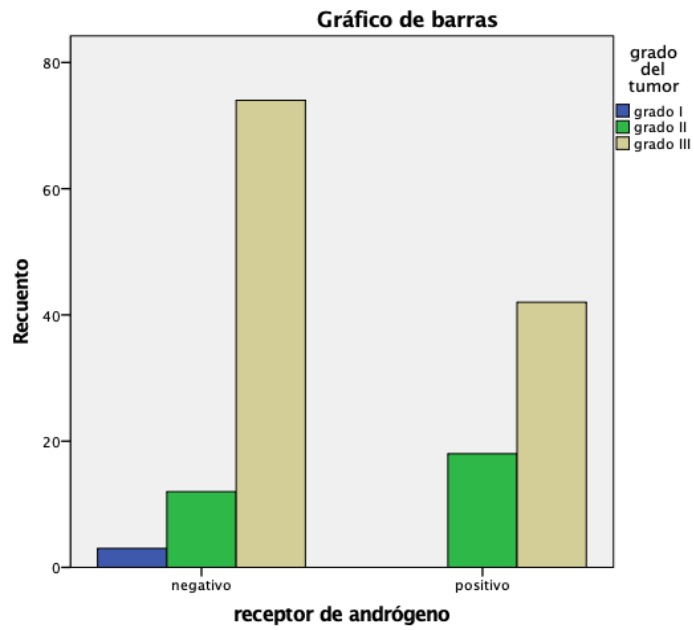
		grado del tumor			Total	
		grado I	grado II	grado III		
receptor de andrógeno	negativo	Recuento	3	12	74	89
		% dentro de receptor de andrógeno	3,4%	13,5%	83,1%	100,0%
		% dentro de grado del tumor	100,0%	40,0%	63,8%	59,7%
		% del total	2,0%	8,1%	49,7%	59,7%
		Residuo corregido	1,4	-2,5	1,9	
	positivo	Recuento	0	18	42	60
		% dentro de receptor de andrógeno	0,0%	30,0%	70,0%	100,0%
		% dentro de grado del tumor	0,0%	60,0%	36,2%	40,3%
		% del total	0,0%	12,1%	28,2%	40,3%
		Residuo corregido	-1,4	2,5	-1,9	
Total		Recuento	3	30	116	149
		% dentro de receptor de andrógeno	2,0%	20,1%	77,9%	100,0%
		% dentro de grado del tumor	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% del total	2,0%	20,1%	77,9%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,674 ^a	2	,022
Razón de verosimilitud	8,630	2	,013
N de casos válidos	149		

^a. 2 casillas (33,3%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,21.

Medidas simétricas		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	Coeficiente de contingencia	,221	,022
N de casos válidos		149	



1.2.- ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN (Ki67 Mib1)

El análisis muestra que los tumores TNBC RA+ son menos proliferativos. El Ki67 (MIB 1 relacionado con la proliferación celular) fue más bajo en tumores TNBC RA+. El 75,3 % de los TNBC RA- tienen un Ki67 elevado (> 30) y sólo el el 50% de los TNBC RA+ tienen un Ki67 alto (> 30). El 12, 9 % de los RA- tienen un Ki67 moderado y el 27,4% de los RA+ tiene un Ki67 moderado.

Tabla cruzada

		Mib1			Total
		< 15% - leve	>= 15% y < 30% - moderado	>= 30% - alto	
receptor de andrógeno	Recuento	11	12	70	93
	negativo				
	% dentro de receptor de andrógeno	11,8%	12,9%	75,3%	100,0%
	% dentro de Mib1	44,0%	41,4%	69,3%	60,0%
	% del total	7,1%	7,7%	45,2%	60,0%
	Residuo corregido	-1,8	-2,3	3,2	
	positivo				
	Recuento	14	17	31	62
	% dentro de receptor de andrógeno	22,6%	27,4%	50,0%	100,0%
	% dentro de Mib1	56,0%	58,6%	30,7%	40,0%
% del total	9,0%	11,0%	20,0%	40,0%	
Residuo corregido	1,8	2,3	-3,2		
Total	Recuento	25	29	101	155
	% dentro de receptor de andrógeno	16,1%	18,7%	65,2%	100,0%
	% dentro de Mib1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	16,1%	18,7%	65,2%	100,0%

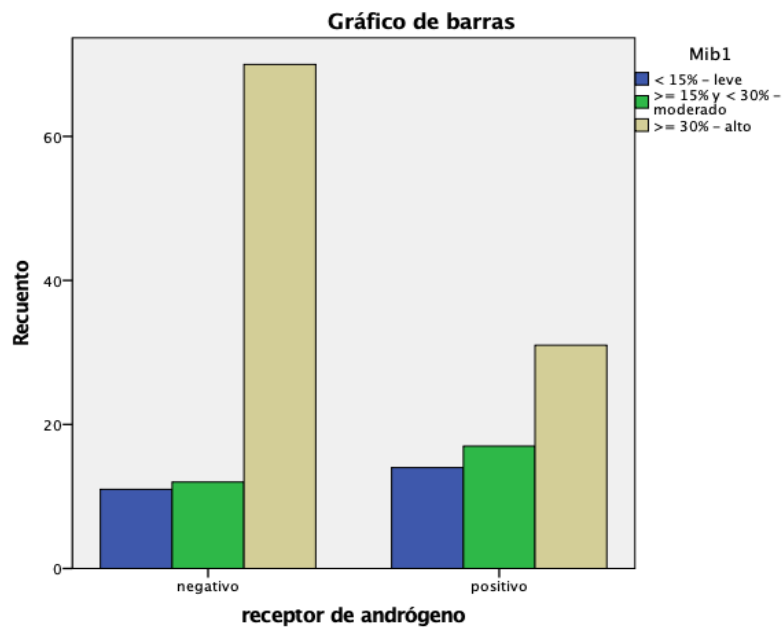
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,502 ^a	2	,005
Razón de verosimilitud	10,443	2	,005
N de casos válidos	155		

a. 0 casillas han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 10,00.

Medidas simétricas

		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	Coefficiente de contingencia	,252	,005
N de casos válidos		155	



1.3.- GATA3

El estudio mostró relación entre la expresión de GATA3 y el RA. El 82,1% de los RA- son GATA3+ y sólo el 17,9% son GATA3-.

El 98,4% de los RA+ son GATA3 positivo y sólo el 1,6% de los RA+ son GATA3 negativo.

Tabla cruzada

		GATA3		Total	
		negativo	positivo		
receptor de andrógeno	negativo	Recuento	17	78	95
		% dentro de receptor de andrógeno	17,9%	82,1%	100,0%
		% dentro de GATA3	94,4%	55,7%	60,1%
		% del total	10,8%	49,4%	60,1%
		Residuo corregido	3,2	-3,2	
	positivo	Recuento	1	62	63
		% dentro de receptor de andrógeno	1,6%	98,4%	100,0%
		% dentro de GATA3	5,6%	44,3%	39,9%
		% del total	0,6%	39,2%	39,9%
		Residuo corregido	-3,2	3,2	
Total	Recuento	18	140	158	
	% dentro de receptor de andrógeno	11,4%	88,6%	100,0%	
	% dentro de GATA3	100,0%	100,0%	100,0%	
	% del total	11,4%	88,6%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado

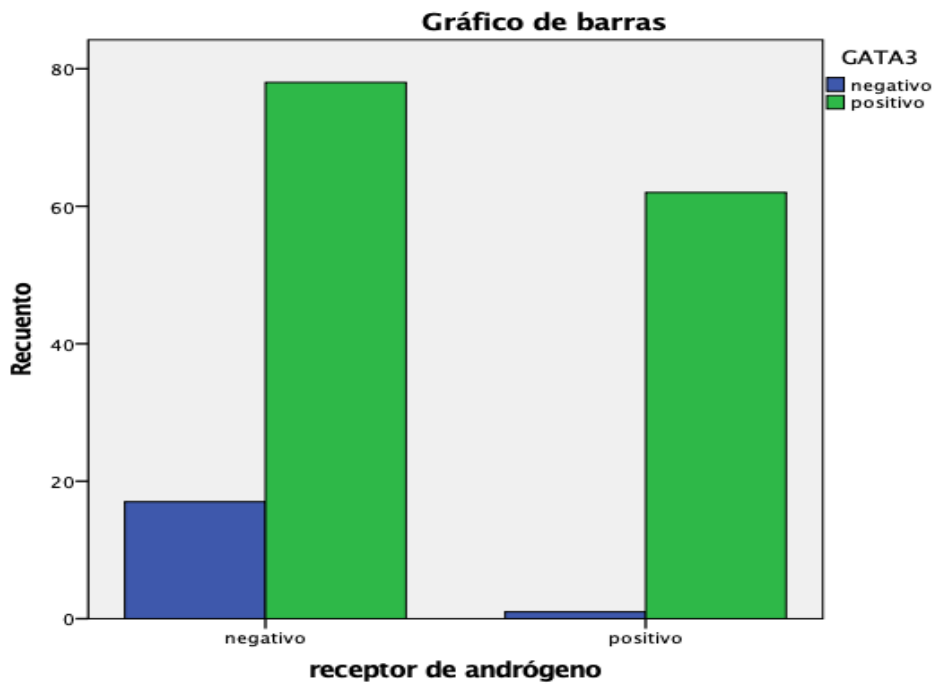
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	9,979 ^a	1	,002		
Corrección de continuidad ^b	8,429	1	,004		
Razón de verosimilitud	12,536	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,001	,001
N de casos válidos	158				

^a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 7,18.

^b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Medidas simétricas

		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	Coeficiente de contingencia	,244	,002
N de casos válidos		158	



1.4 - 1.13 ESTUDIOS NO SIGNIFICATIVOS

Con respecto a los apartados 1.4 a 1.13, el estudio no mostró datos significativos de la posible relación entre la existencia o no de receptor de andrógeno y las demás variables, como la expresión de E cadherina, el tamaño tumoral (T), la afectación ganglionar (N), la presencia de metástasis (M), el estadio del tumor, la invasión vásculo-linfática, la presencia de necrosis tumoral, el estado premenopáusic o postmenopáusic y el desarrollo de recidivas locales o a distancia.

2.- RELACIÓN ENTRE RA, VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y ESTADO DE LA ENFERMEDAD

En función del estado evolutivo del cáncer de mama y a efectos del estudio estadístico, las pacientes se han dividido en los siguientes subgrupos:

1. Pacientes vivas libres de enfermedad: pacientes tratadas sin evidencia de recidiva local ni a distancia.
2. Pacientes vivas con la enfermedad: enfermas en las que se objetiva recidiva local, a distancia o ambas.
3. Pacientes muertas por la enfermedad: pacientes fallecidas a causa de la propia enfermedad. Se excluyen pacientes operadas y fallecidas por causas ajenas al cáncer de mama.

Al analizar la relación entre el RA y las otras variables clínico-patológicas en función del estado evolutivo de las pacientes, se obtuvieron unos resultados estadísticamente significativos que permitieron dividir los casos en los siguientes grupos:

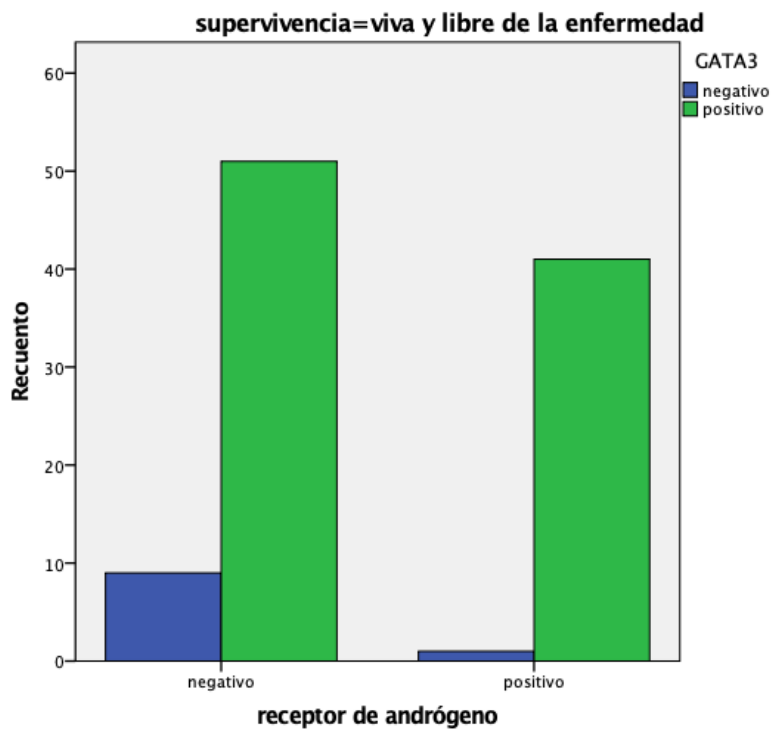
- 2.1.- Pacientes vivas sin enfermedad
- 2.2.- Pacientes fallecidas por la enfermedad
- 2.3.- Pacientes fallecidas por la enfermedad, vivas con la enfermedad y vivas sin la enfermedad.
- 2.4 Pacientes fallecidas por la enfermedad y vivas sin la enfermedad

2.1.- PACIENTES VIVAS SIN ENFERMEDAD

a) Expresión de RA y de GATA3

En las pacientes vivas sin enfermedad existe relación estadísticamente significativa entre la expresión de RA y de GATA3.

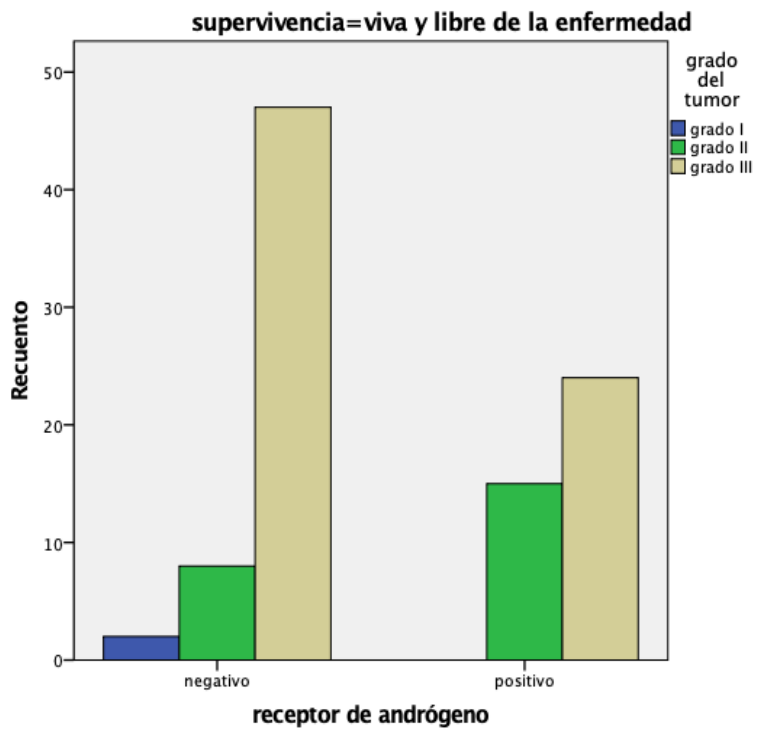
- Entre los RA+ el 97,6% son GATA3+ y sólo el 2,4% son GATA3-.
- Dentro de las RA-, el 85% son GATA3+ y el 15% GATA3-.



b) Estado RA y grado del tumor

Existe relación significativa entre el estado RA y el grado del tumor.

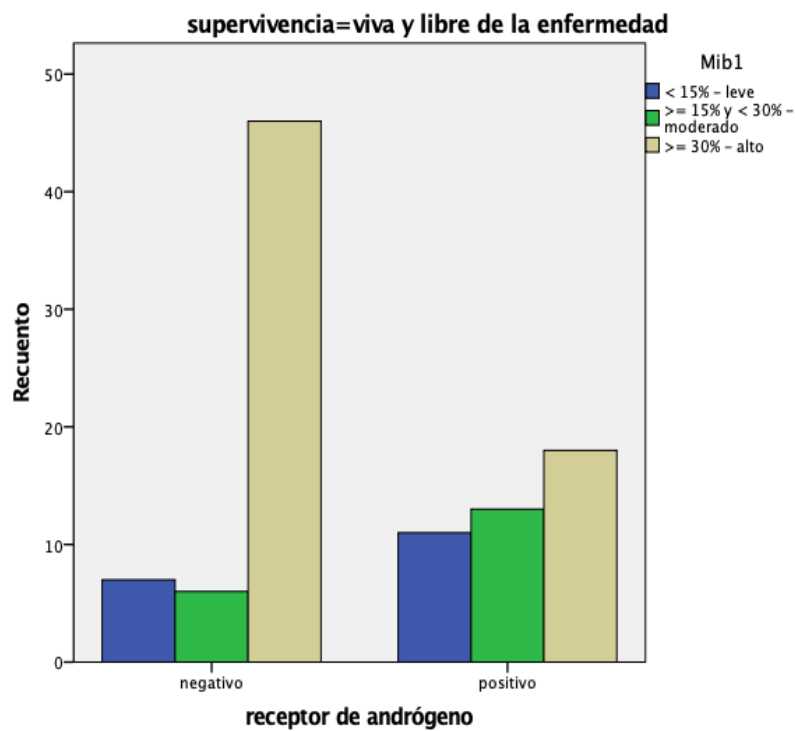
- Entre las RA-, el 14% son grado II y el 82,5% son grado III.
- Entre las RA+, el 38,5% son grado II y el 61,5% son grado III.



c) Estado RA y Mib1

Existe relación significativa entre el estado RA y el Mib1 en las pacientes vivas sanas, sin recidiva de la enfermedad.

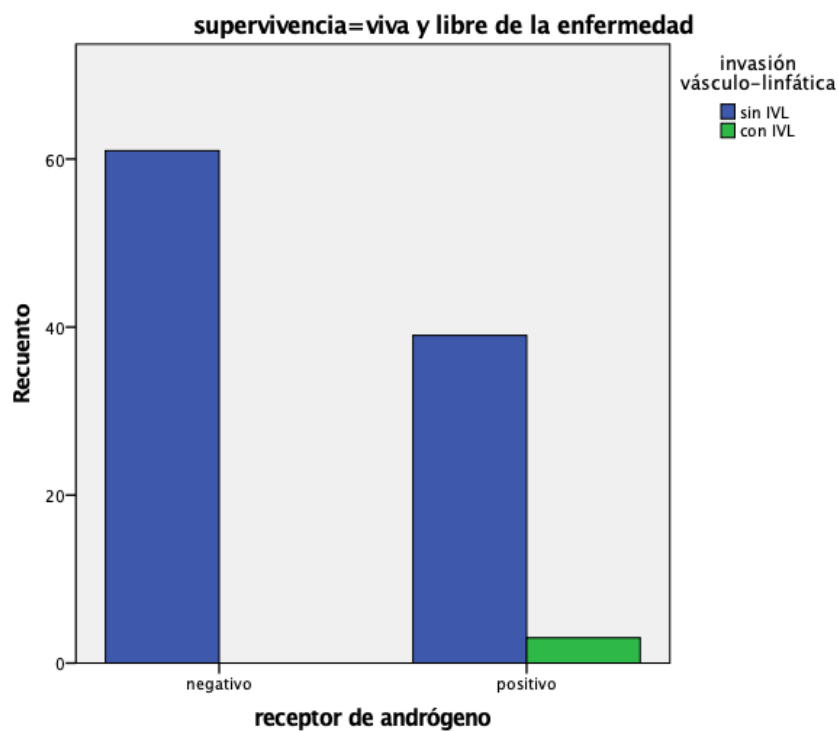
- El 10,2% de los RA- tienen un Mib1 moderado (> de 15 y < de 30) y el 78% presentan Ki67 elevado (> de 30%).
- El 31% de los RA+ son moderados y el 42,9% de RA+ presentan un Mib 1 elevado.



d) RA e invasión angiolímfática

Existe relación estadísticamente significativa, tanto en RA+ como RA-, con la invasión angiolímfática.

- Ninguna de las pacientes RA- presentaba invasión vículo-linfática (100%); igualmente el 92,9% de las RA+.
- El 7,1% de las RA+ tenían invasión vículo-linfática. Ninguna de las pacientes con receptores androgénicos negativos presentaba invasión.

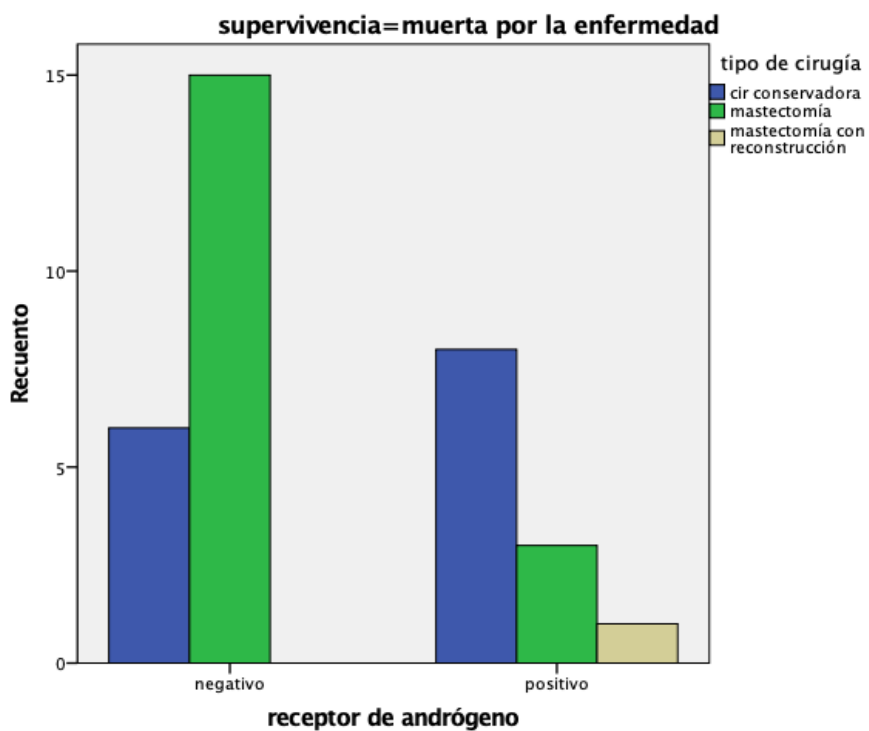


2.2.- PACIENTES MUERTAS POR LA ENFERMEDAD

a) Estado RA y tipo de cirugía realizada

Se observa relación estadísticamente significativa entre el estado RA y el tipo de cirugía realizada.

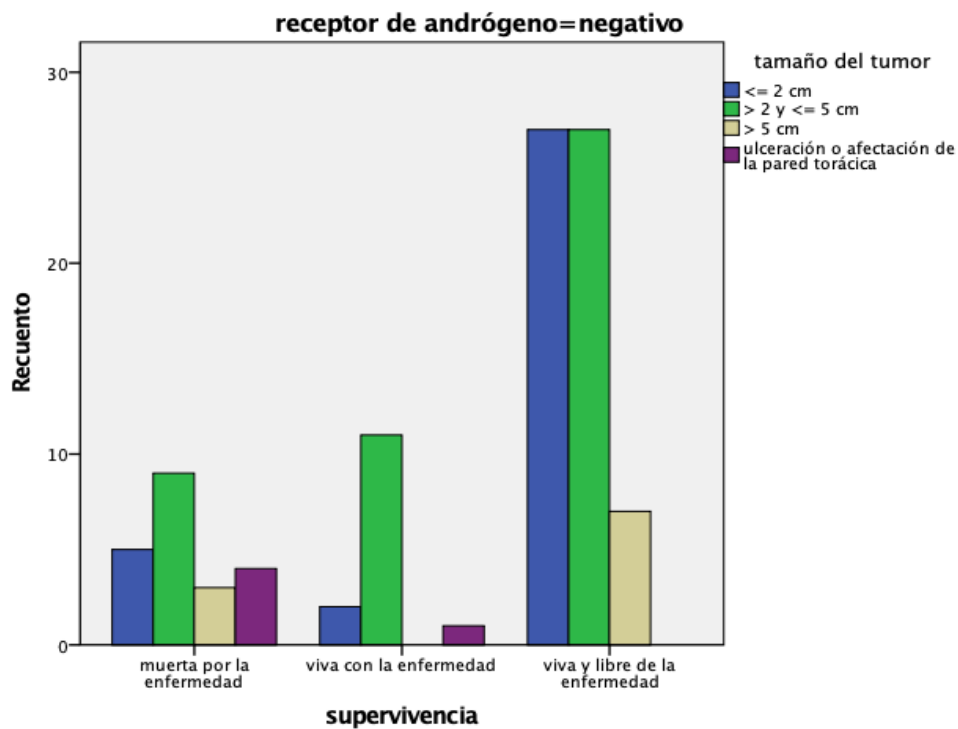
- Dentro de los RA-, el 71% tiene mastectomía y el 28,6% tienen cirugía conservadora.
- Dentro de los RA+, el 25% tiene mastectomía y el 66,7% tienen cirugía conservadora.



2.3.- PACIENTES MUERTAS POR LA ENFERMEDAD, VIVAS CON LA ENFERMEDAD Y EN LAS PACIENTES VIVAS SIN ENFERMEDAD:

a) Tamaño tumoral y RA

En estos tres grupos agregados se observa relación entre el tamaño tumoral y el RA. Entre las RA- muertas por la enfermedad el 19% son T4. Dentro de las RA-, vivas con la enfermedad, el 78,6% tiene un tumor T2. Dentro de las RA-, vivas y libres de enfermedad, el 44,3% tienen un T1.

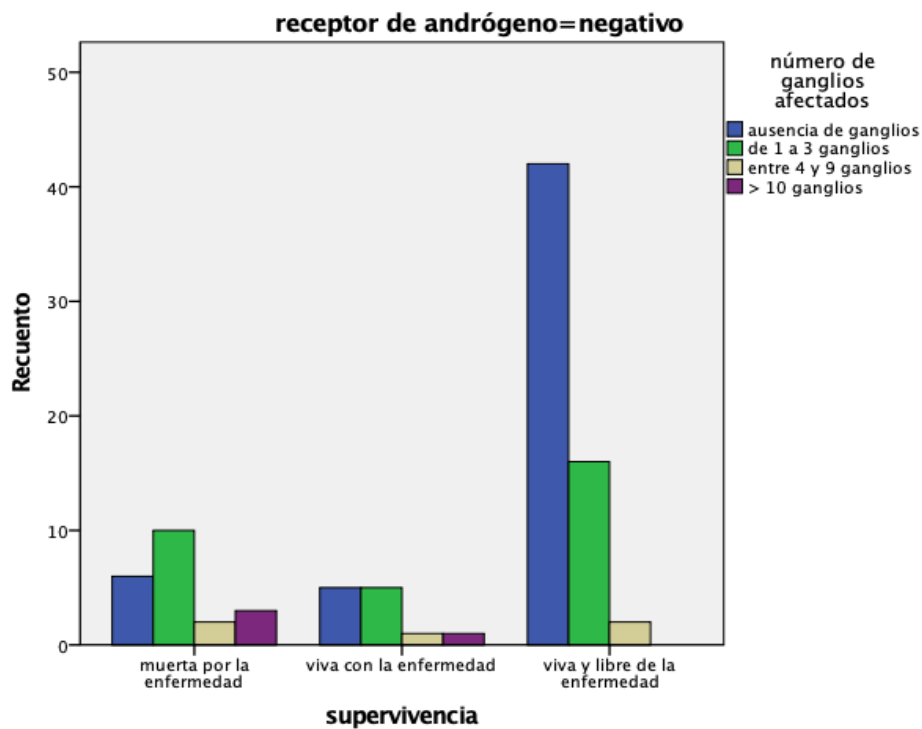


2.4.- PACIENTES MUERTAS POR LA ENFERMEDAD Y VIVAS SIN LA ENFERMEDAD:

a) Pacientes RA- y ganglios afectados

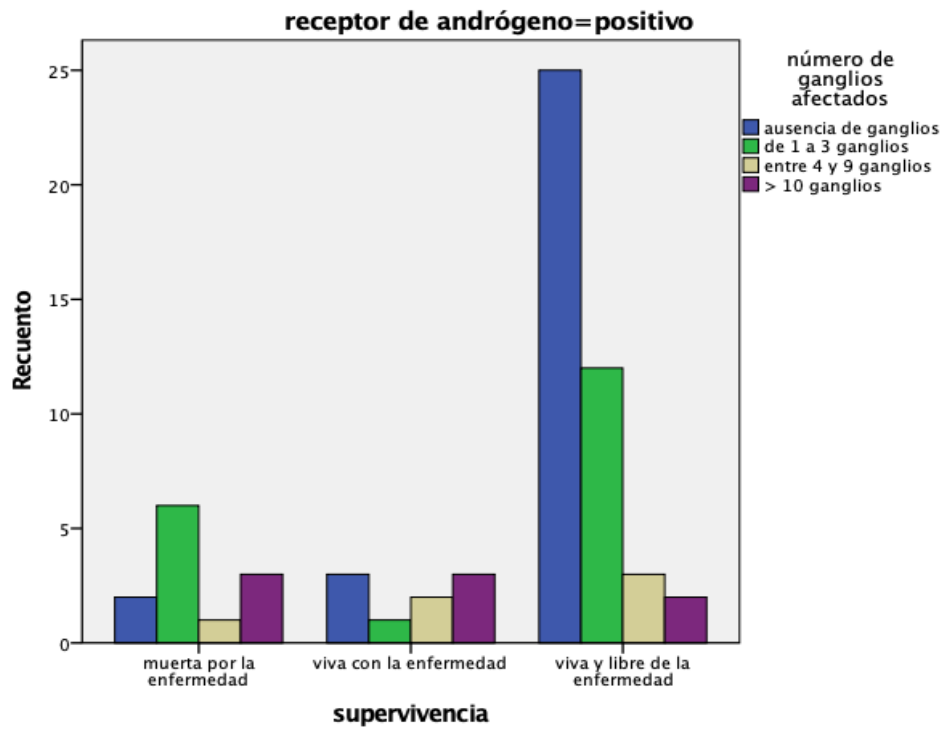
Existe relación entre las pacientes RA- y los ganglios afectados;

En el grupo de pacientes muertas por la enfermedad, el 28,6% no tenían ganglios afectados y el 14,3% tenían más de 10 ganglios afectados. Entre las pacientes RA-, en el grupo de pacientes vivas y libres de enfermedad el 70% no tenían ganglios afectados y ninguna tenía más de 10 ganglios afectados.



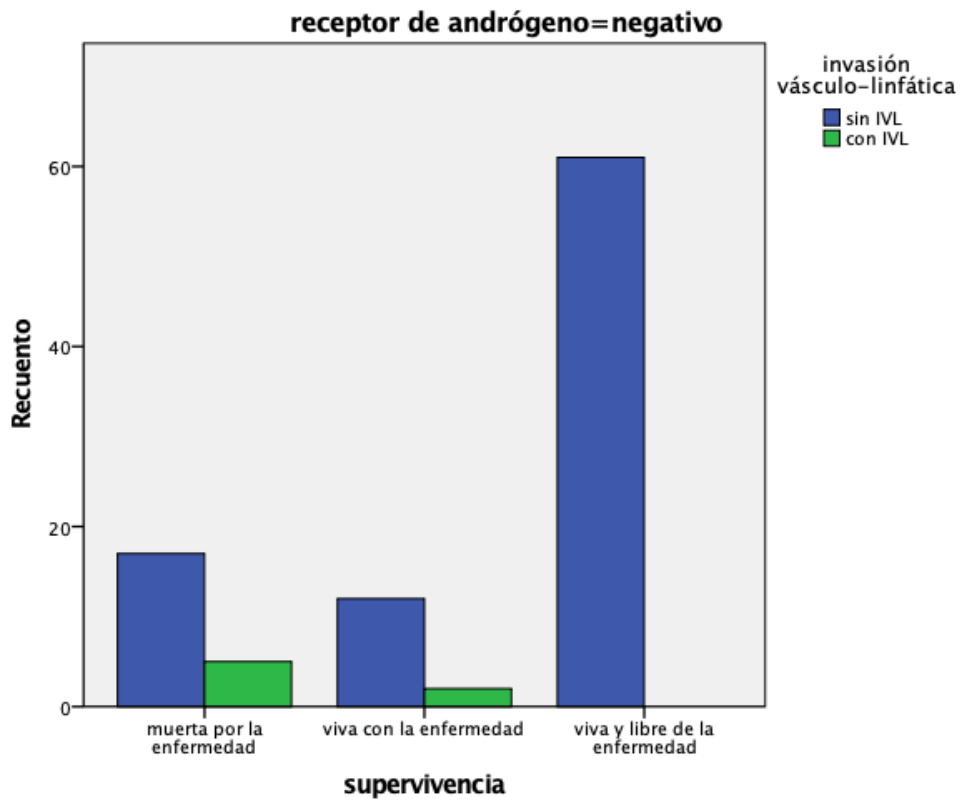
b) Pacientes RA+ y ganglios afectados

Existe relación entre las pacientes RA+ y los ganglios afectados. El 16,7% de las pacientes muertas por la enfermedad no tenían ganglios afectados y el 59,5% de las paciente vivas y libres de enfermedad no tenían ganglios afectados. El 4,8% de las pacientes RA+, del grupo vivas sin enfermedad, tenían más de 10 ganglios afectados.



c) RA- e invasión angiolinfática

Existe relación en el grupo de RA- y la invasión angiolinfática; en las muertas por la enfermedad, el 77,3% no tenía invasión vástulo linfática y el 22,7% sí tenía invasión vástulo linfática. En el grupo RA-, en las pacientes vivas y libres de enfermedad, el 100% no tenían invasión vástulo linfática como ya se ha referido anteriormente.



3.- ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN GANGLIONAR

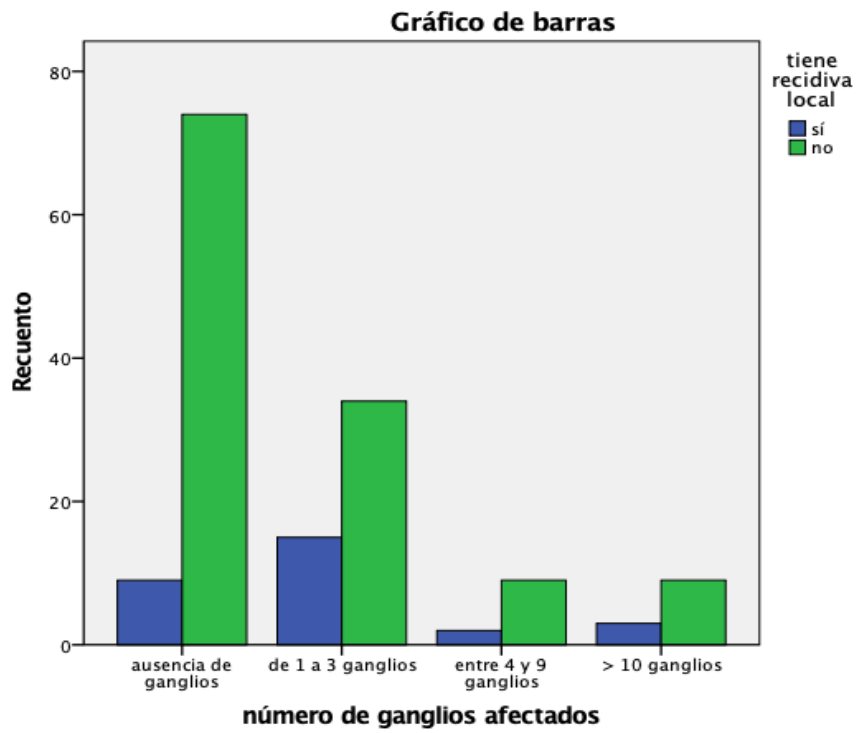
La afectación ganglionar fue un factor fuerte de riesgo de recaída local y a distancia en los TNBC, independientemente del estado RA. Existe relación entre el número de ganglios afectados y las metástasis a distancia.

- Cuando no hay enfermedad ganglionar el 85,7% de los pacientes no tienen metástasis.
- Cuando hay más de 10 ganglios afectados el 84,6% tienen metástasis a distancia.



Existe relación entre la recidiva local y la afectación ganglionar. Cuando existe recidiva local, la mayor proporción se da en pacientes que tienen entre 1 a 3 ganglios afectados.

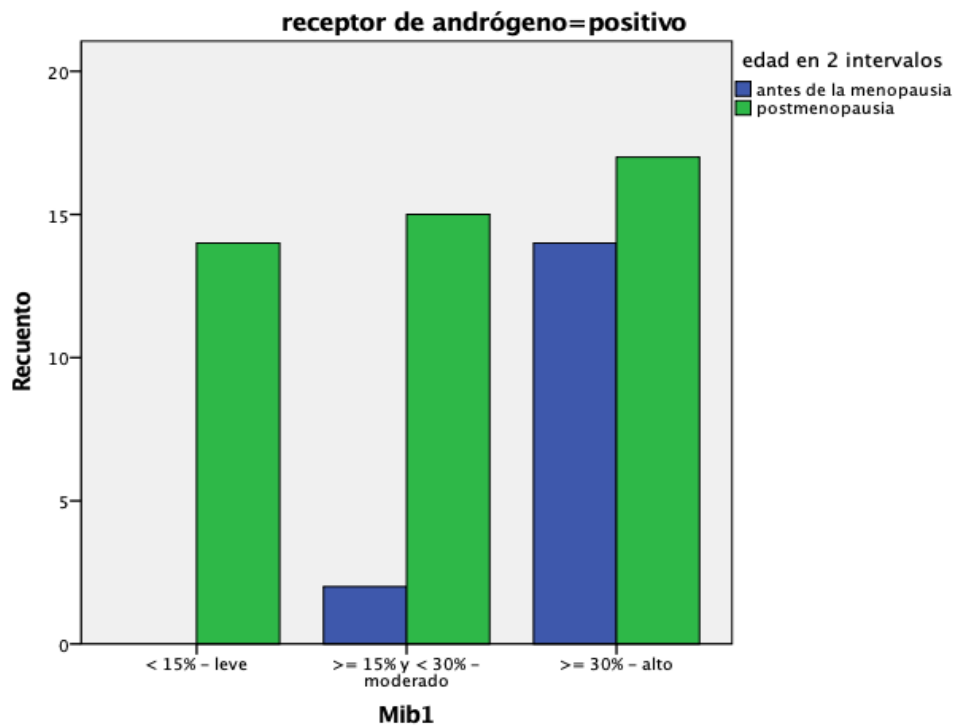
- El 30% de los pacientes N1 tienen recidiva local.



- El 89,2% de los pacientes sin afectación ganglionar no tienen recidiva local.

4.- RELACIÓN ENTRE ESTADO DE RA, KI67 Y EDAD

Se observó una relación entre la edad de las pacientes (considerada en dos intervalos; premenopáusicas y postmenopáusicas), el índice de proliferación del tumor Ki67 y el estado RA. Existe dependencia, en las RA+, entre el Mib1 y la edad (considerando la edad en 2 intervalos; como $< \text{ó igual a } 50$ años y > 50 años). En los RA+, el 100% de las pacientes con Mib1 leve ($< \text{ del } 15\%$) son postmenopáusicas y el 54,8% de las pacientes con Mib1 alto ($> \text{ del } 30\%$) son postmenopáusicas.



5.- ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

5.1 COMPARACIÓN DE VARIANZAS

Al realizar la **prueba de Levene de comparación de varianzas** no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de meses de supervivencia global ni libre de enfermedad del grupo RA+ y del grupo RA-.

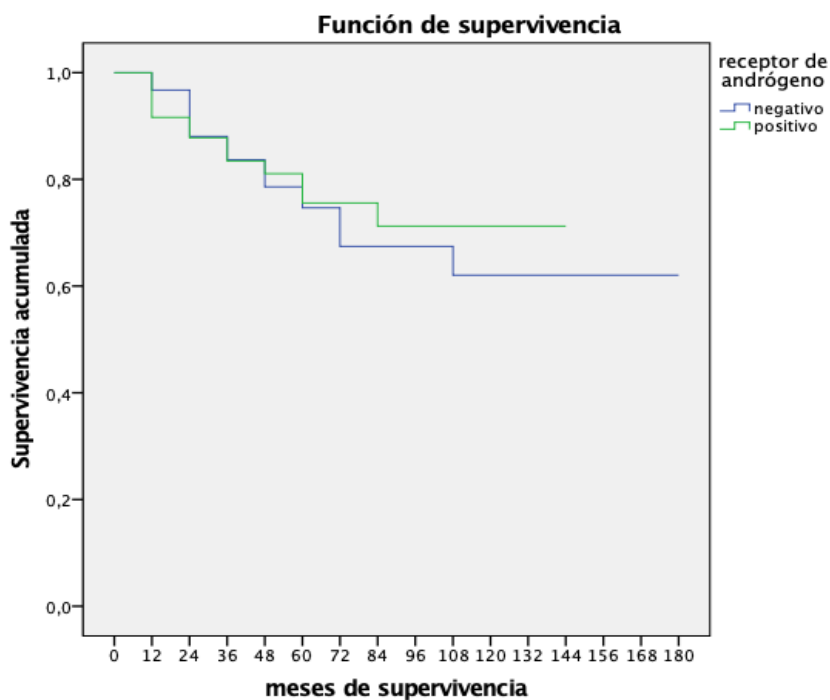
	receptor de andrógeno	N	Media	Desviación estándar
edad en el diagnóstico	negativo	97	61,19	15,908
	positivo	63	58,44	14,031
meses libres de recidiva local	negativo	94	48,94	38,725
	positivo	63	53,19	40,344
meses libre de metástasis a distancia	negativo	94	46,83	40,385
	positivo	63	47,41	39,134
meses de supervivencia	negativo	97	49,25	38,372
	positivo	63	51,33	37,081

Tabla de muestras independientes

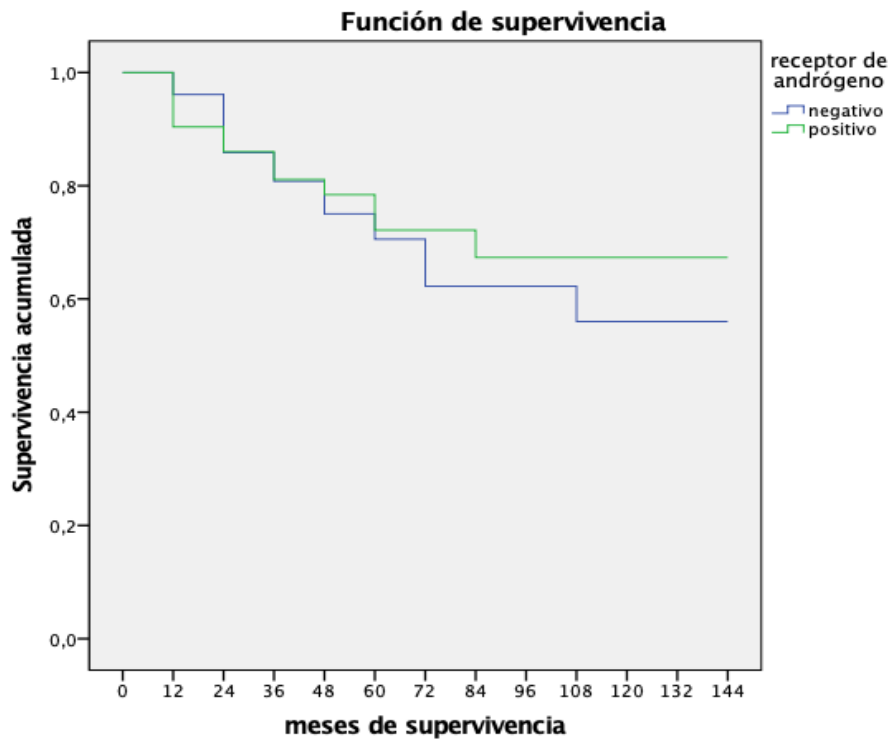
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
edad en el diagnóstico	Se asumen varianzas iguales	3,530	,062	1,115	158	,267	2,741	2,459	-2,116	7,599
	No se asumen varianzas iguales			1,145	143,945	,254	2,741	2,395	-1,992	7,474
meses libres de recidiva local	Se asumen V. Ig.	,256	,614	-,663	155	,508	-4,254	6,412	-16,921	8,412
	No se asumen V. Ig.			-,658	129,333	,512	-4,254	6,464	-17,044	8,535
meses libre de metástasis a distancia	Se asumen V. Ig.	,053	,818	-,090	155	,929	-,583	6,495	-13,413	12,247
	No se asumen V. Ig.			-,090	135,924	,928	-,583	6,454	-13,347	12,181
meses de superviv.	Se asumen V. Ig.	,002	,962	-,340	158	,734	-2,086	6,128	-14,189	10,017
	No se asumen V. Ig.			-,343	135,807	,732	-2,086	6,083	-14,116	9,944

5.2 TABLAS DE MORTALIDAD.

En el grupo de pacientes vivos, considerando los dos grupos, vivos con enfermedad y sin enfermedad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes RA+ y los pacientes RA-. Es decir, no se observaron diferencias en la supervivencia global entre ambos grupos.



Por su parte, en la tabla de mortalidad considerando las pacientes vivas sin enfermedad en función de los receptores androgénicos (RA+ y RA-) tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. No hubo diferencias en la supervivencia libre de enfermedad entre ambos grupos.

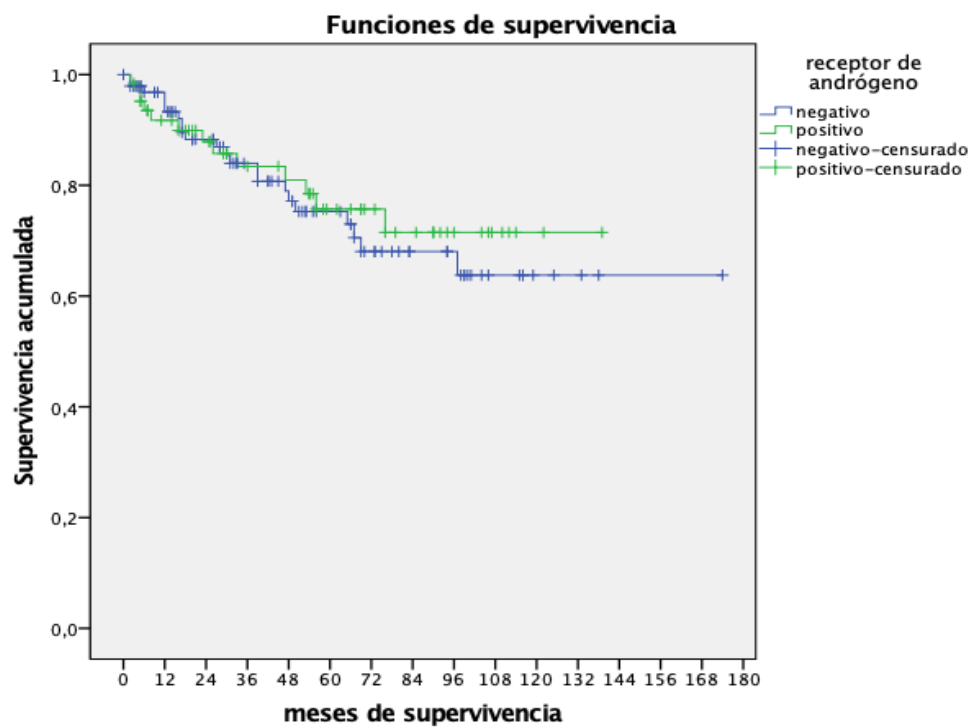


5.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR REGRESIÓN DE KAPLAN-MEIER.

Al realizar el análisis de supervivencia por la regresión de Kaplan Meier no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes RA+ y RA-, tanto a nivel de supervivencia global como a nivel de supervivencia libre de enfermedad.

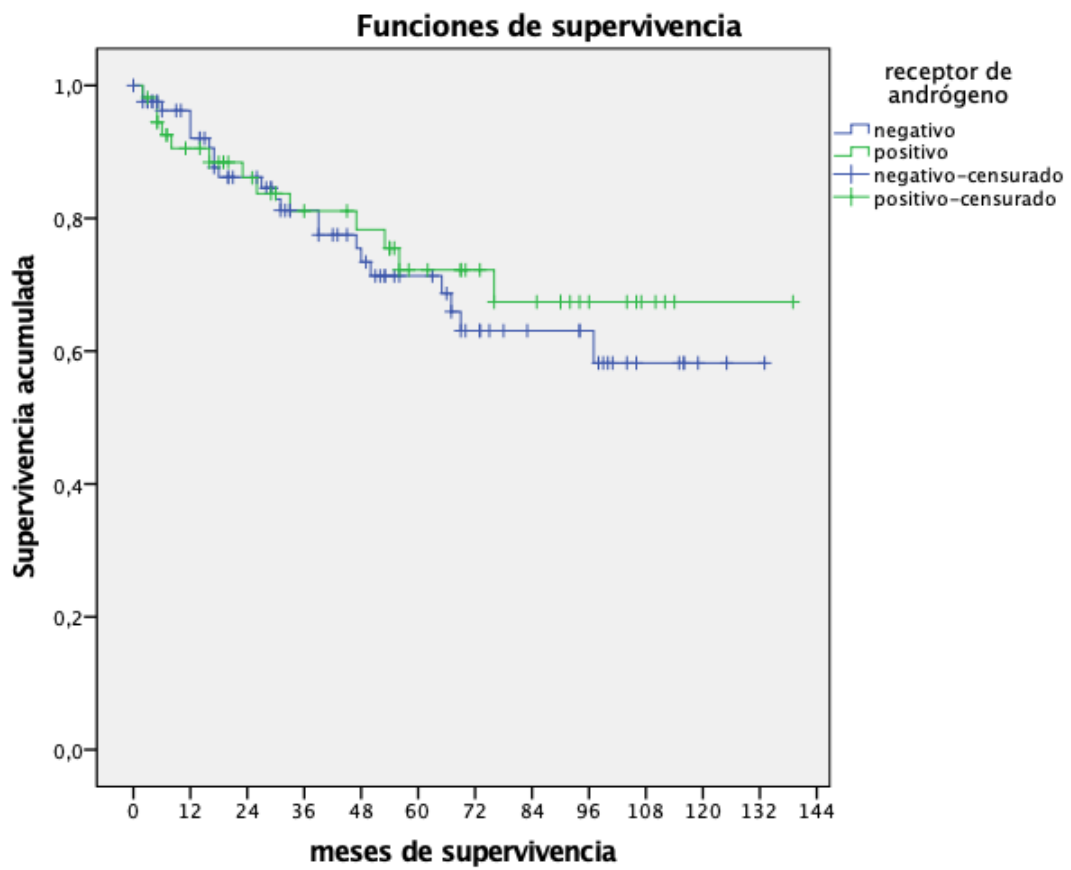
Curvas de Kaplan Meier de supervivencia global para RA+ y RA-.

receptor de andrógeno	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
negativo	97	22	75	77,3%
positivo	63	13	50	79,4%
Global	160	35	125	78,1%



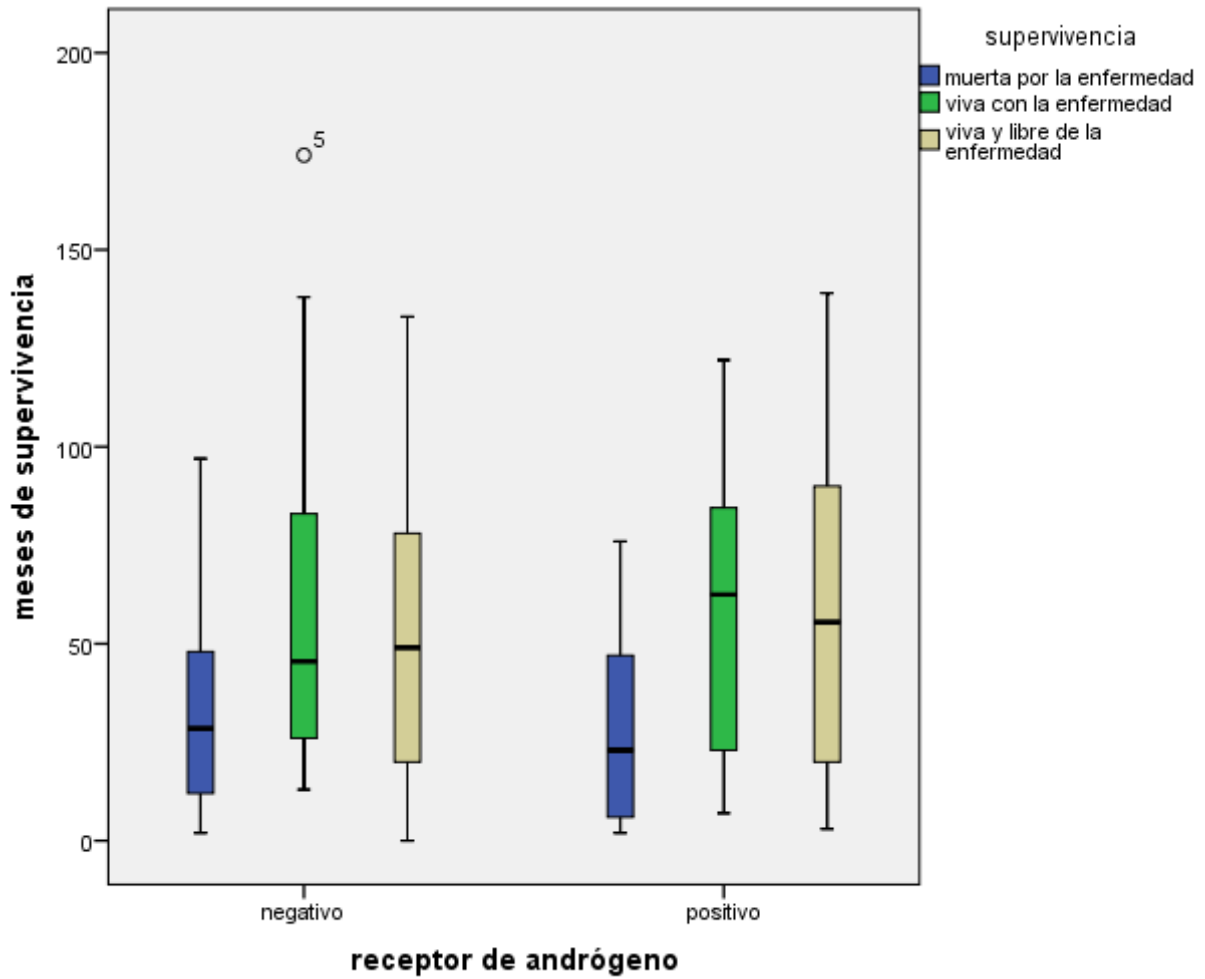
Curvas de Kaplan Meier de supervivencia libre de enfermedad para RA+ y RA-.

receptor de andrógeno	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
negativo	83	22	61	73,5%
positivo	55	13	42	76,4%
Global	138	35	103	74,6%



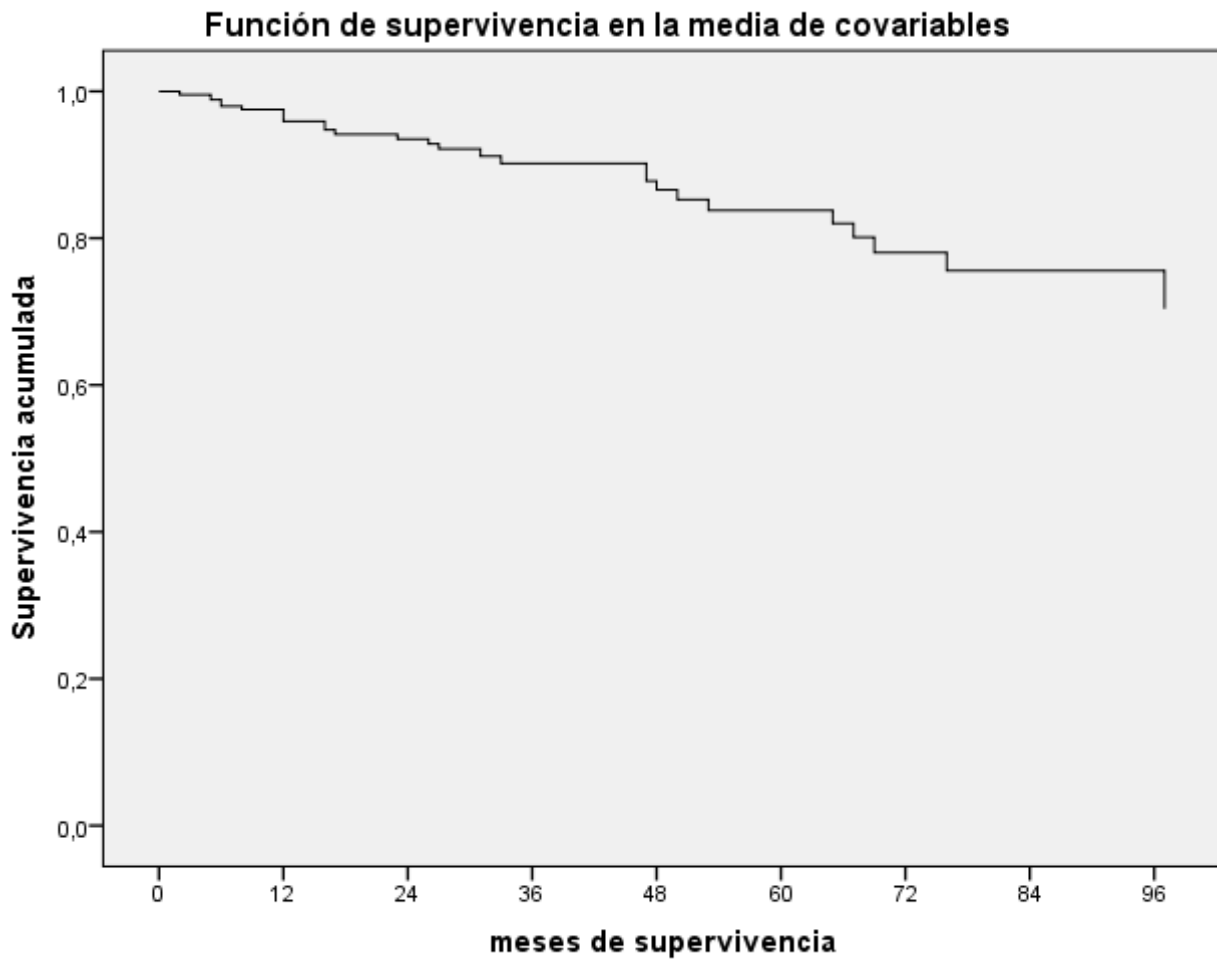
5.4 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA UTILIZANDO EL GRÁFICO DE CAJAS.

No se aprecian diferencias en la supervivencia en ambos grupos.

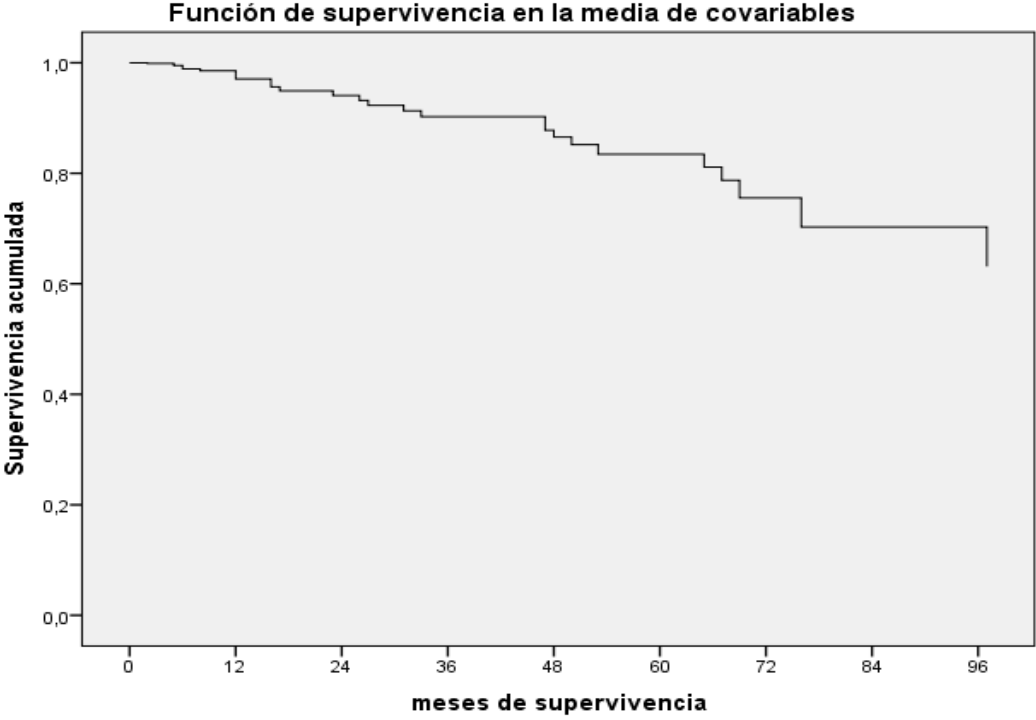


5.5 ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX

El Modelo de regresión de Cox es significativo para predecir supervivencia global a partir de las variables T (tamaño tumoral) y N (es significativo si N0, es decir, si no hay afectación ganglionar).



El modelo de regresión de Cox también es significativo como modelo de predicción de supervivencia libre de enfermedad con las variables T (tamaño tumoral) y N (N0 y N1; cuando no hay afectación ganglionar y cuando el número de ganglios afectados es entre 1 y 3).



DISCUSIÓN

Los cánceres de mama triple negativos (TNBC) tienen un pronóstico pobre y comúnmente no tienen tratamientos diana efectivos. Dado que los TNBC pueden ser RA (receptor de andrógeno) positivos o RA negativos, podemos subclasificarlos como RA+TNBC y RA-TNBC (cuádruple negativos QNBC), puesto que la terapia dirigida a RA puede ser una opción viable de tratamiento para el subgrupo de TNBC que expresa RA^{2,69,70}.

La identificación del porcentaje de células RA+ puede no ser suficiente para identificar pacientes que se benefician del tratamiento con terapia dirigida anti-RA tipo Enzalutamida. Parece que pueden existir biomarcadores genómicos para saber qué pacientes se beneficiarían de Enzalutamida pese a tener una baja expresión de RA en inmunohistoquímica^{16,69}.

La tinción inmunohistoquímica se ha utilizado ampliamente para definir la positividad de RA en cáncer de mama. Sin embargo, no se conoce qué valor de corte puede ser útil para predecir respuesta a la terapia anti-RA en las pacientes RA+. El estado de fosforilación del RA y el estado de expresión del gen de RA pueden ser marcadores predictivos para terapia dirigida contra RA.

Hasta la fecha poco se conoce sobre el papel de la fosforilación de RA en las terapias anti-RA, pero parece que pueda tener un papel relevante^{71,72}.

En TNBC, RA se ha asociado tanto con buen como mal pronóstico en múltiples estudios. Parece que RA+TNBC tiene un Ki67 (MIB-1) menor que los RA-TNBC, lo que concuerda con nuestros resultados y pueden ser menos sensible a la quimioterapia. Esta afirmación se apoya en la baja proporción de respuesta patológica completa de TNBC con perfiles de expresión génica enriquecidos en la vía de señalización de RA (ningún paciente de nuestro estudio RA+ tuvo respuesta patológica completa tras terapia sistémica primaria). De los 35 pacientes que recibieron tratamiento sistémico primario en nuestra serie, sólo 5 obtuvieron respuesta patológica completa y los 5 eran RA-.

RA puede conferir un mejor pronóstico global, dado que se expresa en tumores de crecimiento más lento⁶⁹.

La positividad de RA se ha relacionado con la expresión de la enzima aldehído deshidrogenasa, relacionada con células *stem-like* en cáncer de mama y con la 17 hidroxisteroideshidrogenasa tipo

5 y la 5 alfa reductasa tipo 1, enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos (Figura 1). Esto puede estar relacionado con que RA promueva un fenotipo stem-like o mesenquimal en TNBC.

Los tumores del grupo molecular apocrino, RA+/RE-/RP-, están enriquecidos con expresión de genes regulados por RE, a pesar de ser RE-. Se piensa que en estos tumores RA promueve la transcripción de muchos de estos genes clásicamente regulados por RE⁶⁹.

1.- TNBC TIPO LAR: PROPUESTA DE MODELO DE TNBC RA+ PARA MODULACIÓN SELECTIVA DE RA

El subtipo luminal RA (LAR) de los TNBC se denomina así porque tiene un perfil similar al cáncer de mama RE+. Los genes que definen el subtipo LAR están enriquecidos en vías reguladas hormonalmente que incluyen síntesis de esteroides y metabolismo de andrógenos/estrógenos. El subtipo LAR parece ser menos sensible a la quimioterapia, lo cual puede conferir un particular mal pronóstico⁷³. Masuda et al compararon los porcentajes de respuesta patológica completa (pCR) de los subtipos de TNBC, encontrando que el basal like tipo 1 (BL-1) tiene los más altos porcentajes de pCR (52%) y los LAR (0%) y basal like tipo 2 (BL-2) (10%) los más bajos porcentajes de pCR. Es común un bajo Ki67 asociado a baja proliferación celular en tumores tipo LAR con baja pCR. En nuestra serie el 100% de los tumores TNBC identificados histológicamente como molecular apocrino (Figuras 6 y 7) son RA positivos (6 de 6), el 80% GATA3 positivos (más del 70% como en la literatura⁶⁷) y todos presentan un Ki67 <30% (leve o moderado).

También se ha observado que en las líneas celulares moleculares apocrinas (RE- y RA+) se observa alta expresión de FOXA1^{74,75}, y en estas líneas celulares la secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina ha demostrado un 98% de superposición entre las regiones de unión de RA y de RE, y que la silenciamiento de FOXA1 inhibe la unión de RA a la cromatina y suprime la mayoría de los genes regulados por RA. Así mismo parece que la asociación de tumores RA positivos y FOXA1 positivo se relaciona con menor grado nuclear, lo que puede indicar que la expresión de FOXA1 podría estar relacionada con características favorables en tumores RA positivos⁷¹.

Se ha observado que las mutaciones PIK3CA son frecuentes entre los TNBC tipo LAR, comparado con otros subtipos de TNBC y que las líneas celulares LAR, estimuladas por dihidrotestosterona tienen aumentada la actividad de la vía PI3K y son sensibles a NVP-BEZ235 (PI3K/mTOR inhibidor)^{57,71}.

El subtipo LAR se define por el enriquecimiento de las vías reguladas por hormonas. La clasificación molecular apocrina incluye tanto cánceres TNBC como erbB2, y el TNBC que es LAR se define por niveles de expresión génica más que por evaluación directa de reactividad inmunohistoquímica de RE, RP y erbB2. No todos los TNBC que expresan RA se incluyen en LAR o en perfiles de expresión génica molecular apocrina. Los perfiles de expresión génica de las líneas celulares de TNBC que expresan RA corresponden al subtipo LAR, lo que sugiere que las líneas celulares habitualmente utilizadas que expresan RA podrían no ser representativas de todo el espectro completo de TNBC que expresan RA⁶.

No todos los TNBC RA positivos por inmunohistoquímica se corresponden con el subtipo LAR/Molecular Apocrino de la clasificación de Lehmann, por eso hay que considerar la posibilidad de efectos divergentes de la acción RA en TNBC que justifiquen aparentes contradicciones⁶.

El subtipo LAR se muestra menos quimiosensible y presenta más recurrencias tardías cuando se compara con otros subgrupos. En los TNBC, la prevalencia de la positividad de RA varía dependiendo de la literatura (entre el 15 y el 60%). Mientras algunos estudios muestran un punto de corte de 1% para la positividad de la tinción RA, otros utilizan el 5 o incluso el 10%. No se han observado diferencias en los resultados a pesar de la utilización de diferentes puntos de corte tal y como demuestra el metaanálisis de Changjun Wang et al³². La mayor proporción de TNBC RA positivos se observa en pacientes TNBC CK5/6 negativos. Dado que CK 5/6 es un marcador del subtipo basal like (BLBC), se puede concluir que BLBC TNBC tiene la menor proporción de expresión de RA. En nuestra serie los 8 TNBC identificados como BRCA1 positivos (que frecuentemente son basal like) fueron RA negativos. También la positividad RA se asocia con bajo índice Ki67, lo que podría explicar por qué el *no-basal-like* TNBC responde peor que el basal like TNBC a la quimioterapia³². En nuestra serie, de los 35 pacientes que recibieron terapia sistémica primaria sólo 5 alcanzaron respuesta patológica completa, y los 5 eran TNBC RA-.

Los tumores apocrinos se caracterizan por aspectos citológicos tales como abundante citoplasma granular eosinofílico, vacuolización o aclaramiento citoplásmico, núcleos vesiculares redondos, a menudo con nucleolos eosinófilos (ocasionalmente basófilos) Figuras 6 y 7. Si cualquiera de los aspectos nucleares o citoplásmicos estuvieran presentes en más de un 10% de las células, se considera que el tumor muestra diferenciación apocrina. Los tumores moleculares apocrinos, desde un punto de vista inmunohistoquímico son tanto RE-/RP-/erbB2+/RA+ como RE-/RP-/erbB2-/RA+^{49,76}.

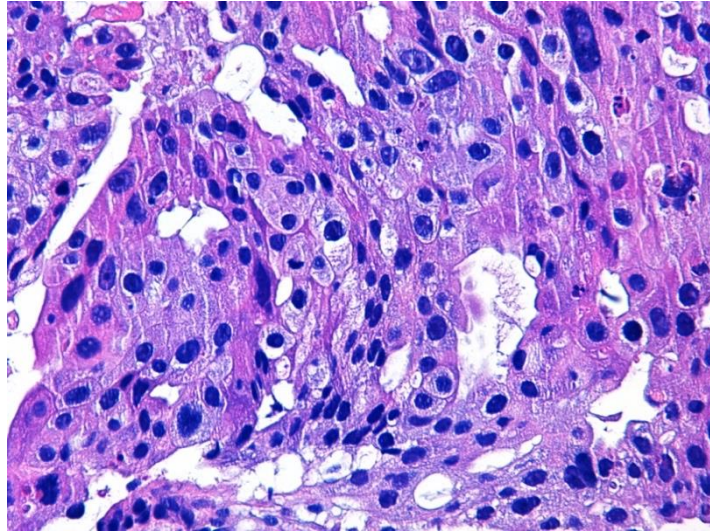


Figura 6. Imagen a 40x. Características celulares apocrinas. Citoplasma eosinófilo. Pleomorfismo nuclear y núcleos con nucleolo visible

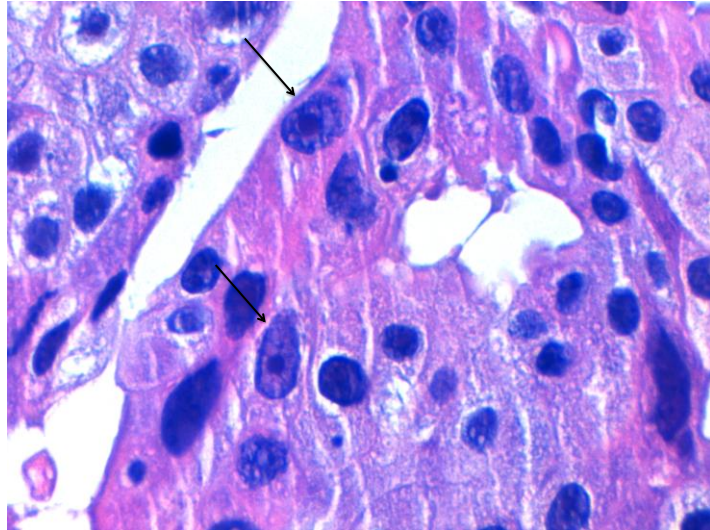


Figura 7. Imagen a 100x donde se identifican detalladamente las características citológicas comentadas en el texto.

La expresión génica en el grupo LAR es la que más se diferencia entre los subtipos TNBC. Aunque estos son RE negativos, sus genes están muy enriquecidos en vías reguladas por hormonas, que incluyen síntesis de esteroides, metabolismo de las porfirinas y metabolismo de andrógenos y estrógenos.

Se han investigado otras vías reguladas por hormonas como la vía de señalización de los RA, que puede ser responsable de modelos de expresión génica en el subtipo LAR. De hecho, la expresión de ARNm de RA fue nueve veces mayor que en otros subtipos de TNBC. Los tumores del grupo

LAR también expresaron numerosas dianas de RA y coactivadores (DHCR24, ALCAM, FASN, FKBP5, APOD, PIP, SPDEF y CLDN8). Además de la expresión de ARNm de RA, Lehmann y cols. investigaron la expresión de la proteína RA por IHQ en tumores TNBC. El porcentaje de las células tumorales medidas con tinción nuclear RA y la intensidad de la tinción fue significativamente mayor en el subgrupo LAR (>10 veces) comparado con todos los subgrupos TNBC. Realizaron una agrupación jerárquica utilizando firmas de genes activados por RA en la validación de datos de tumores TNBC. La agrupación jerárquica con esta firma diferenció a la mayoría de los perfiles de tumores LAR de otros subtipos⁷.

Los tumores del subtipo LAR desarrollan modelos de expresión génica de tipo luminal con expresión de genes, como ya se ha referido anteriormente, tipo FOXA 1, KRT18 y XBP1. Parece que el subtipo TNBC LAR se compone de tumores dirigidos por RA que incluyen el subtipo molecular apocrino^{7,49}.

El subtipo LAR, a diferencia de otros TNBC, se caracteriza porque carece de la expresión de citoqueratinas basales y expresa altos niveles de citoqueratinas luminales y otros marcadores luminales (FOXA 1 y XBP1). Según la expresión de citoqueratinas, los cánceres de mama, en general, se clasifican en cinco subtipos principales⁷⁷: *basal-like*, *HER2-like*, *normal breast like*, *luminal A*, y *luminal B* (Tabla 2). Muchas veces se ha considerado al TNBC como basal like, por lo que Lehmann y cols. correlacionaron cada uno de los 386 TNBC de su serie, según perfil génico con esos cinco subtipos moleculares, basándose en el mayor coeficiente de correlación entre cada perfil de expresión de TNBC y los cinco subtipos moleculares. Este análisis resultó en que el 49% de los TNBC fueran clasificados como basal like, 14% como luminal A, 11% como normal like, 8% como luminal B, 5% como HERB2, y 13% como inclasificable⁷.

Esto confirma que la mayoría de los TNBC se clasifican como subtipo molecular basal like, tanto los tumores inestables como los BL1 se correlacionan fuertemente con la subclasificación molecular basal like; sin embargo BL2, IM (inmunoenriquecido) y M sólo se correlacionan moderadamente con la clase molecular basal like, con un porcentaje importante de tumores inclasificados en estos subtipos. Los subtipos M y MSL corresponden a la mayor proporción de tumores clasificados como normal like. El BL2, M y MSL son una mezcla de clasificaciones, que sugiere que el sistema de clasificación intrínseco de Perou pueda no ser apropiado para caracterizar a los TNBC de la clasificación de Lehmann.

La mayoría de los TNBC con subtipo LAR se clasificaron tanto como luminal A o luminal B, y ninguno se clasificó como basal like, lo cual apoya el origen luminal del subtipo LAR.

Mientras que sólo el 49% de los TNBC se clasificaron como basal like según expresión génica, la tinción inmunohistoquímica realizada en el subset de Vanderbilt de tumores (n 25) mostró que la mayoría de los TNBC (88%) tenían tinciones positivas para citoqueratinas basales como CK5/6.

Por ello, se concluye que la mayoría de los TNBC expresan un fenotipo basal like por IHQ, mientras que sólo la mitad se correlacionan con el basal like por expresión génica⁷.

No se ha estudiado el valor pronóstico de los niveles de receptores de andrógenos en los cánceres moleculares apocrinos que carecen de expresión de HER2 y que son probablemente similares a los TNBC tipo LAR de la clasificación de Lehmann, en parte porque estos tumores representan el 12% de todos los cánceres de mama y tales análisis necesitarían cohortes largas de casos no seleccionados. Sin embargo, en ocasiones, los cánceres moleculares apocrinos pueden ser muy agresivos y con pronóstico pobre, comparable con los cánceres basales. Dado que la expresión de RA es un aspecto de los cánceres moleculares apocrinos es factible que RA pueda contribuir al pobre pronóstico de este subtipo^{30,78}, al menos en parte.

Este concepto se mantiene por estudios in vitro que demuestran que la señalización RA promueve la proliferación de modelos de líneas celulares moleculares apocrinas. De hecho, la línea celular MDA-MB-453 se ha mostrado como el modelo de cáncer de mama más ampliamente utilizado RA positivo, RE negativo y se ha clasificado como molecular apocrino (o LAR) por perfiles de expresión génica.

La proliferación de células MDA-MB-453 se estimula por andrógenos y se inhibe por RA antagonistas o silenciadores de RA. Las localidades del RA (cistroma) en células MDA-MB-453 han mostrado ser más similares a las del receptor de estrógeno alfa (RE alfa) en células MCF7, una línea celular de cáncer epitelial ampliamente estudiada derivada de adenocarcinoma de mama, que las del RA en células del cáncer de próstata LNCaP (células del adenocarcinoma de próstata que expresan RA)^{30,75}. Esto sugiere que el RA puede actuar como RE alfa subrogado en el cáncer de mama molecular apocrino, potencialmente explicando su papel oncogénico en este subtipo de cáncer de mama³⁰.

Estos estudios han formado la base para los ensayos del RA antagonista bicalutamida (NCT00468715) y el compuesto de nueva generación enzalutamida (NCT01889238 y NCT02091960) como terapia para los cánceres metastásicos RE alfa negativos, RA positivos. Sin embargo, una mutación en el dominio de unión del ligando del RA en las células MDA-MB-453 compromete la actividad del receptor en respuesta a los andrógenos. Esta circunstancia puede limitar la utilización de líneas celulares como un modelo de cáncer de mama molecular apocrino,

necesitando análisis de la función de RA en otros modelos preclínicos de este subtipo de enfermedad para informar del desarrollo de estrategias terapéuticas adecuadas^{30,79}.

La proliferación de otras líneas celulares TNBC clasificadas como LAR, que incluyen SUM185PE y CAL-148 se han mostrado también inducidas por la señalización androgénica e inhibidas por el antagonista RA bicalutamida. Sin embargo, la línea celular MFM-223 también clasificada como LAR, pero diferente a la línea celular MDA-MB-453 era inhibida por andrógenos y no era sensible a bicalutamida, aunque la reducción de RA disminuyó la formación de colonias.

Los efectos proliferativos divergentes de los andrógenos en diferentes modelos in vitro de cáncer de mama RA+ RE alfa-, reflejan la heterogeneidad de la enfermedad RE alfa- y sugieren que no todos los cánceres de mama RA+ RE alfa- se beneficiarán de terapias que inhiben la actividad RA³⁰. Esta afirmación se apoya en ensayos clínicos de TNBC metastásicos RE alfa-, RA+, para los que el beneficio clínico de la bicalutamida fue sólo del 19%¹⁴. Además, la expresión de RA puede no ser suficiente para identificar pacientes apropiados para las terapias dirigidas contra RA y se requiere la caracterización de marcadores adicionales de respuesta favorable a tratamientos³⁰.

Hay que tener en cuenta que puede ser realmente difícil correlacionar la expresión de RA y los diferentes subtipos moleculares de TNBC, sobre todo el subtipo LAR, que es el que puede ayudar a esclarecer el valor pronóstico de RA en TNBC³⁰.

El hecho de que los estudios en los que se basan los metaanálisis que se refieren al valor pronóstico de RA en TNBC fueran retrospectivos, podría aumentar ciertos sesgos como el de selección, además de que puede ser realmente difícil correlacionar RA y los diferentes subtipos moleculares intrínsecos de TNBC.

2.- RELACIÓN ENTRE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE RA CON OTRAS VÍAS: PTEN, PI3K, HER2, FOXA, GATA3 y p53.

La vía de los receptores de andrógenos tiene reacción cruzada con otras vías de señalización, que incluyen PI3K/Akt/mTOR y MAPK. Las terapias dirigidas frente a receptores de andrógenos, que incluyen RA agonistas, RA antagonistas y PI3K inhibidores, han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos en pacientes con cáncer de mama, y se han investigado combinaciones de terapias dirigidas frente a RA con otros agentes para superar la resistencia al bloqueo de RA. Sería necesario establecer biomarcadores para estratificar los pacientes en función de la probabilidad de respuesta a fármacos dirigidos contra RA⁷¹.

El receptor de andrógeno tiene cuatro dominios: un dominio N terminal, un dominio de unión al DNA, una bisagra (*hinge*), un dominio de unión al ligando, y funciona como un factor de transcripción nuclear. En presencia de ligando, RA se transloca al núcleo, donde el dominio de unión del DNA liga los elementos de respuesta androgénica y recluta otros coactivadores adicionales, correpresores y moduladores de la transcripción.

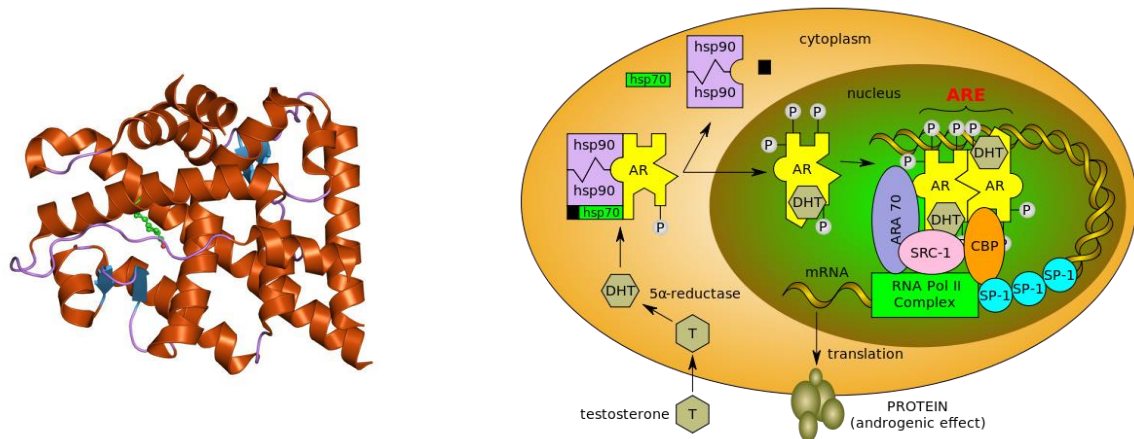


Figura 8. Representación del receptor de andrógeno [© - ©European Bioinformatics Institute, uso libre. <http://www.ebi.ac.uk>] y su función intracelular tras unirse al ligando [© CC BY 3.0].

El RA ha sido ampliamente investigado en el cáncer de próstata, y estos estudios han mostrado reacción cruzada de la vía RA con otras vías de señalización que además de PI3K/Akt/mTOR incluyen MAPK, PTEN, HER2, FOXA, GATA2, GATA3 y p53⁷¹.

- a. PI3K/Akt/mTOR es una vía de señalización intracelular importante en la regulación del ciclo celular y relacionada directamente con la quiescencia celular, la proliferación, el cáncer y la longevidad. La activación de PI3K (fosfatidil inositol kinasa) fosforila y activa AKT, que se localiza en la membrana plasmática y que es una proteína serina-treonina kinasa que ayuda a transferir las señales en el interior de las células. AKT puede activar mTOR (*mammalian target of Rapamycin*, serina-treonina quinasa implicada en la regulación del crecimiento, proliferación y muerte celular) que puede afectar a la transcripción. Si esta vía está hiperactiva, disminuye la apoptosis, permitiendo la proliferación celular.
- b. MAPK es una proteína kinasa activada por mitógenos que es una treonin kinasa capaz de translocarse al núcleo para, allí, regular la transcripción modificando la actividad de proteínas, modulando la expresión de diferentes genes.
- c. PTEN es una enzima tirosin fosfatasa que actúa como supresor tumoral, antagonista de PI3K y ausente en varios tipos de cánceres.

- d. Forkhead box proteína A1 (FOXA 1) es un miembro de la clase forkhead de proteínas de unión al DNA cuya expresión en cánceres de mama RE alfa negativos puede identificar a un tipo de tumores que responda a otras terapias endocrinas como el bloqueo de RA.
- e. GATA es una familia de proteínas caracterizada por unirse a la secuencia de DNA “GATA”, donde G es guanina, A adenina y T timina. GATA2 es una proteína nuclear que regula la expresión de genes y GATA3 contiene dos dedos de zinc tipo GATA y juega un importante papel como regulador del desarrollo de linfocitos T y en procesos relacionados con el endotelio. GATA3 promueve la secreción de IL4, IL5 e IL3 en linfocitos T CD4.
- f. P 53 es un gen supresor tumoral. Son muy frecuentes las mutaciones p53 en el TNBC.

La proporción de mutaciones PI3K es mayor en cáncer de mama RA+ que en cáncer de mama RA- (46% frente al 4,5%)⁵⁷. El grupo de Miho Kono et al previamente extrajo la conclusión de que cánceres de mama con mutaciones en el dominio kinasa PI3K expresaban niveles mayores de RA que cánceres de mama con mutaciones del dominio helicoidal de PI3K ó PI3K tipo salvaje^{71,80}.

También se ha observado que estas mutaciones estaban significativamente enriquecidas entre el subtipo LAR, comparando con todos los otros subtipos de TNBC.

Varios estudios han mostrado que la isoforma PI3K alfa es dominante en tumores con mutación PI3K⁸¹, mientras que PI3K beta es dominante en tumores con aberración PTEN⁸².

Un estudio mostró que el inhibidor selectivo PI3K beta bloquea tanto la activación de la vía PI3K como la transformación oncogénica inducida por la deficiencia PTEN.

Otro estudio mostró que todas las lesiones metastásicas que respondían al inhibidor PI3K alfa, pero subsecuentemente desarrollaban resistencia, tenían deficiencia PTEN⁸¹.

En líneas celulares de cáncer de mama PTEN mutado, la inhibición de PI3K beta induce actividad kinasa PI3K alfa, que causa rebote de la señalización AKT/mTOR. Subsecuentemente la inhibición de AKT/mTOR reactiva la expresión o activación del receptor tirosin kinasa que produce activación del RA^{71,83}.

En líneas celulares MDA-MB-453, RE alfa negativas, la DHT induce a PTEN, que es supresor tumoral e inhibe las enzimas PI3K, vía unión del RA^{30,84}.

Contrariamente, en líneas celulares con PTEN tipo salvaje, la inhibición PI3K beta no indujo infraregulación de la señalización de PI3K. En experimentos in vivo e in vitro que utilizan células de cáncer de próstata PTEN mutadas, con inhibición tanto de RA como de PI3K se produce

supresión del crecimiento tumoral e inducción de la apoptosis celular en mayor grado que la supresión PI3K o la inhibición de RA por separado⁸³.

Estos resultados sugieren que en pacientes con cáncer de mama RA+, la combinación de un inhibidor selectivo PI3K beta y un RA inhibidor podrían ser efectivos contra tumores con deficiencia PTEN o con mutación PTEN, mientras que la combinación de inhibidores selectivos PI3K alfa y RA inhibidor pueden ser efectivos contra tumores con mutación PI3K⁷¹.

Las líneas celulares LAR estimuladas por dihidrotestosterona tenían incrementada la vía PI3K y eran sensibles a los inhibidores PI3K/mTOR. Los datos preclínicos demostraron que las líneas celulares de cáncer de mama eran altamente sensibles al inhibidor de PI3K/mTOR recientemente desarrollado NVP-BEZ235. Los estudios preclínicos mostraron que la dihidrotestosterona y el NVP-BEZ235 conseguían mayor regresión tumoral en tumores RE+ RA+ de ratones, comparado con cada droga por separado³⁰.

Se observan elevados niveles de FOXA1 en el cáncer de mama. En líneas celulares de tumores moleculares apocrinos, la secuenciación de inmunoprecipitación de la cromatina demostró un 98% de superposición entre regiones de unión de RA y regiones de unión de RE, y la silenciación de FOXA 1 inhibió la unión del RA a la cromatina y suprimió la mayoría de los genes regulados por RA⁷⁵. En una serie de 460 TNBC, el 15% coexpresaron RA y FOXA1, y los tumores RA positivos y FOXA positivos fueron asociados significativamente con menor grado nuclear y carcinoma in situ que tumores RA positivos FOXA negativos, lo que sugiere que la expresión de FOXA1 podría asociarse con características favorables en tumores RA positivos³⁰.

FOXA es un regulador mayor de la capacidad de unión al DNA para células de cáncer de próstata y de mama. Estudios recientes han dado luz al papel de FOXA en la mediación de la unión del DNA al RA en células de cáncer de mama RE alfa negativas. En las líneas celulares de cáncer de mama molecular apocrino MDA-MB-453, hay una gran superposición de FOXA1 y de sitios de unión del DNA al RA, particularmente cerca de genes regulados por andrógenos. Además, la ablación de FOXA reduce la formación de colonias MDA-MB-453 y bloquea la inducción androgénica del factor de transcripción MYC (familia de protooncogenes). En ausencia de activación RA en contexto de cáncer de mama RE negativo, FOXA1 interactúa con TCF7L2 (proteína que actúa como factor de transcripción y puede influir en varios procesos biológicos como la vía Wnt-beta catenina) en el DNA para reprimir genes diana RA, donde bajo la estimulación hormonal, RA substituye a TCF7L2 en el complejo FOXA1, llevando a inducción de la transcripción de genes.

En células MDA-MB-453, los andrógenos inducen expresión de WNT7B y HER3, lo que lleva a la activación de la vía de señalización Wnt/beta-catenina que se requiere para el crecimiento inducido

por andrógenos de estas células. DHT induce señalización HER2 (erbB2) que también induce la activación de la vía PI3K/AKT⁸⁵, llevando a cambio a la degradación de MAD1 (proteína del control de la mitosis que puede tener un papel importante en la supresión tumoral), que destruye el complejo MAD1-MAX. Esto permite a MAX interactuar con MYC, también inducido directamente por DHT vía interacción de RA-FOXA, llevando al incremento de la función oncogénica de MYC²⁶. FOXA 1 se expresa más ampliamente en cánceres de mama que amplifican HER2 (erbB2), y la señalización erbB2 produce inducción de la expresión de FOXA1^{30,86}.

Algunos estudios mostraron que la positividad RA fue un marcador predictivo de tumores RE+, pues parece que la sobreexpresión de RA se asoció a resistencia a la terapia hormonal (tratamiento con Tamoxifeno) en tumores RE +. Este trabajo también demostró que la inhibición de la localización de RA por la enzalutamida disminuye el crecimiento tumoral no sólo mediado por andrógenos, sino también el mediado por estrógenos, tanto en carcinoma de mama RE+ RA+ como en RE- RA+^{71 87}. Este hallazgo sugiere la efectividad de terapias dirigidas contra RA para pacientes con cáncer RE- RA+ y para pacientes RE+ RA+, incluyendo el 30 a 50% de pacientes con tumores RE+ que desarrollan resistencia a la terapia endocrina tradicional^{71,88}.

La vía RA también es importante en el cáncer de mama HER2 (erbB2) positivo. En tumores erbB2, la RA positividad se asoció con mayor frecuencia de expresión de RE y RP, menor tamaño tumoral, estadio clínico más temprano y menor Ki67 comparado con tumores RA negativos^{71,89}.

En células de cáncer de mama RE- erbB2+, la unión de WNT 7B a RA lleva a una translocación nuclear de la beta-catenina con la estimulación androgénica, y la unión de RA/FOXA1/beta-catenina a las regiones reguladoras del gen erbB3 (otro receptor tirosin kinasa, como el erbB2, de la familia erbB) induce crecimiento tumoral⁸⁵.

Las líneas celulares TNBC RA+ tienen niveles de expresión de erbB2 elevados comparando con células TNBC RA-. Esto sugiere que la proliferación de células RA+ puede ser mediada vía erbB2 y que la inhibición de RA puede inhibir la proliferación de RE-erbB2+ RA+ por el bloqueo estimulado por andrógenos de la señalización oncogénica erbB2/erbB3⁷¹.

La proteína de unión GATA2 se activa por la AKT y está enriquecida dentro de las regiones de unión del ligando-RA e inhibe RA y PTEN en el cáncer de mama. Se demostró que la expresión de GATA2 fue significativamente mayor en tejido de cáncer de mama que en tejido normal, mientras que la expresión de PTEN fue significativamente menor en tejido de cáncer de mama que en tejido normal. Los PI3K inhibidores pueden ser agentes razonables para el cáncer de mama RA+ con expresión de GATA2^{71,90,91}.

GATA3 es un marcador que se asocia a un pronóstico favorable en TNBC. La expresión de GATA3 se correlaciona con RE alfa (ESR1), sin embargo ESR1 se expresa poco en TNBC, mientras que GATA3 se expresa en el 30-40% de los TNBC (de forma moderada o alta)^{92,93}. La baja expresión de GATA3 se relaciona con un fenotipo agresivo y con peor RFS (supervivencia libre de recurrencia). En la mayoría de los estudios existe evidencia de que el papel de GATA no es dependiente de RE^{58,94,95}. En nuestro estudio, casi el 100% de las pacientes TNBC RA +, vivas y libres de enfermedad eran GATA3 positivas.

En líneas celulares MDA-MB-453, RE alfa negativas, la DHT induce a PTEN, que es supresor tumoral e inhibe las enzimas PI3K, vía unión del RA a un elemento de respuesta de andrógenos³⁰.

La suprarregulación de PTEN mediada por RA en el cáncer de mama puede formar parte del círculo cerrado de retroalimentación en el que PTEN suprime la acción de PI3K, que a cambio reduce la actividad RA. PTEN comparte una acción promotora de supresión tumoral con KLLN, que también está suprarregulado por andrógenos en líneas celulares RE alfa negativo MDA-MB-453 (línea celular triple negativa, RA positiva que puede sobreexpresar erbB2) y en líneas celulares RE alfa positivas MCF7.

La disminución de la actividad del gen KLLN incluye la inducción de p53 (otro gen supresor tumoral) que promueve la apoptosis^{96,97}, con lo que parece que el tratamiento con andrógenos tiene un efecto antiproliferativo en estas líneas celulares, en contraste con el efecto proliferativo de los andrógenos descrito en otros estudios (Hackenberg⁹⁸, Maggioni⁹⁹, Birrell²², Ni⁸⁵, Robinson⁷⁵)³⁰.

TNBC se ha asociado con la mutación de mal pronóstico p53 hasta en el 80% de los pacientes, aunque al menos un estudio ha demostrado que los TNBC RA+ tienen un porcentaje más bajo de mutaciones p53 (gen supresor tumoral). La mejoría de aspectos genéticos e histológicos puede estar relacionada con la mejor OR (supervivencia global) y DFS (supervivencia libre de enfermedad) de los RA+TNBC frente a los que son RA- vista en algunos estudios⁶¹.

Además, la inducción de estos genes supresores de tumores por la DHT es consistente con el efecto antiproliferativo de DHT observado por Wang et al en estas líneas celulares. Harían falta otros estudios para clarificar las interacciones funcionales entre RA, PTEN y p53³⁰.

Como hemos señalado anteriormente, los cánceres de mama con mutaciones PI3K a menudo expresan mayores niveles de RA (González-Angulo et al)⁸⁰, pero es sobre todo en las líneas celulares RE alfa+ RA + (MCF7) donde se observa aumentado el efecto inhibitorio del PI3K inhibidor NVP-BEZ235 en presencia de DHT^{7,30,96,97}.

Esto es quizá debido a los efectos inhibitorios de crecimiento de la DHT en líneas celulares RE alfa-RA+ tales como MDA-MB-453.

3.- EXPRESIÓN DE RA, TRANSFORMACIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL Y DESARROLLO DE METÁSTASIS

Parece que el andrógeno DHT, según algunos estudios, puede inducir transición epitelial-mesenquimal (EMT) en células de cáncer de mama de una manera RE alfa independiente. Además, se ha observado que tanto los RA como la LSD1 (lisina específica demetilasa, también llamada KDM1A, BHC110) son cruciales para la EMT inducida por DHT. La EMT está relacionada con el desarrollo de metástasis²⁰.

J Feng et al demostraron que RA y LSD1 interactúan con los AREs (elementos de respuesta de RA) identificados como los promotores de los genes diana E-cadherina y vimentina, para regular la expresión de genes a través de modificaciones epigenéticas. In vivo, los experimentos de transplantes validan la importancia de RA y LSD1 en las metástasis inducidas por DHT en ratones atómicos²⁰.

Además, los análisis inmunohistoquímicos revelan el valor pronóstico de la expresión de RA/LSD1 en algunos cánceres de mama. Los datos del estudio de Feng et al concluyen que la DHT induce EMT en células de cáncer de mama de forma RA dependiente RE independiente. La coordinación entre RA y LSD1 es esencial para la EMT guiada por DHT a través de la expresión epigenéticamente regulada de genes diana²⁰. Estos estudios están en discordancia con la teoría de que el riesgo aumentado de cáncer de mama relacionado con andrógenos séricos endógenos se debe a la señalización RE alfa¹⁰⁰. En este artículo de Feng et al se concluye que la vía RA es responsable de la estimulación de andrógenos séricos, implicando a RA como un oncogén.

Esto puede dar un método de examen y una explicación molecular considerando el tratamiento anti-RA en la prevención de cáncer RE positivo y negativo.

3.A.- INDUCCIÓN DE EMT POR EL ANDRÓGENO DHT

El tratamiento con DHT sólo inhibió ligeramente la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 (RE+, RA+y RP+). De forma sorprendente los ensayos mostraron que las células MCF-7 bajo DHT aumentaron unas cinco veces su capacidad migratoria e invasiva en relación con los

controles. Esto implica que DHT puede contribuir a la invasión del cáncer y al desarrollo de las metástasis.

Las células MCF-7 tratadas con etanol presentaban una adhesión acelerada célula a célula, mientras que las tratadas con DHT presentaban una disposición más dispersa en el cultivo, algo característico de las células en EMT. Además, se piensa que la EMT es el paso inicial en el desarrollo de las metástasis. Como resultado de esto se encontró que en las células MCF-7 tratadas con DHT se producía un descenso de la E-cadherina y de la beta-catenina, que son marcadores epiteliales, mientras que la vimentina y la fibronectina, que son marcadores mesenquimales, se elevaban. Los estudios de inmunofluorescencia confirman la pérdida de E-cadherina en las uniones célula a célula, junto con un aumento de la vimentina.

Las células epiteliales de mama que están en un proceso EMT se han asociado a la adquisición de fenotipo de stem cell caracterizado por un aumento de la población CD24 low/ CD44 high y la formación de mamoesferas. El tto con DHT se asoció a un aumento de la población CD24 low/ CD44 high y a un aumento del tamaño y del número de mamoesferas.

Tras estos resultados se puede concluir que la DHT puede inducir un programa de EMT en células MCF-7, promovido por la migración e invasión celular y por la adquisición de rasgos de stem cell.

3.B.- LA INDUCCIÓN DE EMT MEDIADA POR DHT ES RA DEPENDIENTE Y RE INDEPENDIENTE

Se escogió la línea celular epitelioide T47D, que es RA+/RE-. Esta línea celular fue tratada con DHT, observándose un descenso de la E-cadherina y beta catenina y un aumento de la vimentina y fibronectina, por lo que se puede concluir que la inducción de EMT que realiza la DHT es de forma RE alfa independiente¹⁹.

3.C.- PAPEL DEL RA EN LA EMT INDUCIDA POR DHT

Cuando la línea celular MCF-7 se activa con DHT, la expresión de RA exhibe una correlación positiva con la capacidad migratoria, la capacidad invasiva, el incremento de la población CD24 low/CD44 high, y la capacidad de formación de mamoesferas. De lo que se infiere que RA es un factor necesario en la EMT inducida por DHT en la línea celular MCF-7, obteniéndose resultados similares en líneas T47D y MDA-MB-231, líneas que carecen, todas ellas, de la expresión de RE alfa¹⁹.

3.D.- LA LSD1 ES ESENCIAL EN LA EMT INDUCIDA POR DHT

MCF-10 A es conocida como un modelo de inducción de EMT. Sin embargo el tratamiento con DHT no produjo grandes cambios de marcadores de EMT en las células MCF-10A que expresan ectópicamente RA.

LSD1 se ha considerado crucial para la activación de genes inducida por RA y el complejo LSD1 se ha comportado como RA correpresor y RA coactivador. LSD1 es trascendental para la inducción de EMT en varias células de cáncer. Ante la duda de si LSD1 tiene algún papel en la EMT inducida por DHT y dependiente de RA, se utilizaron líneas celulares MCF-10 A que expresan menos LSD1 si se comparan con las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Se pudo observar que DHT fracasó en el intento de inducir EMT en ausencia de sobreexpresión de LSD1, a pesar de la presencia de RA. La sobreexpresión de LSD1 dotó a las células MCF-10A de la capacidad de desarrollar un programa de EMT bajo la inducción de DHT.

RA y LSD1 se unen a ARE (elementos de respuesta de RA) de los genes de la E-cadherina y de la vimentina bajo la estimulación de DHT. En un intento de comprender las bases moleculares de la participación de RA y LSD1 en el programa de EMT, se vió que en la estimulación con DHT, la expresión de RA y de LSD1 estaban involucrados en la regulación de genes de E-cadherina y vimentina, los dos inductores y reguladores clave del proceso de EMT. De hecho, el tratamiento con DHT suprimió la actividad promotora de E-cadherina mientras que aumentó la actividad promotora de la vimentina.

Se analizaron las secuencias de los promotores de vimentina y de E-Cadherina en busca de potenciales AREs (elementos de respuesta de RA). Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) confirmaron que RA y LSD1 estaban enriquecidos en promotores E-Cadherina y vimentina. Los estudios de ChIP revelaron una unión simultánea de RA, LSD1 y RNA polimerasa II en tanto los promotores de E-Cadherina como en los de vimentina.

RA, de forma coordinada con LSD1, regula la expresión de E-cadherina y vimentina por la vía de la modificación de histonas. Estas forman la cromatina, junto con el ADN, sobre la base, entre otras, de unas unidades conocidas como nucleosomas. La cromatina resuelve el problema del tamaño del ADN dentro del núcleo, compactándolo. La cromatina está formada por ADN y varios tipos de proteínas, las principales de las cuales son las histonas.

LSD1 se conoce por su modificación de demetilación de histonas, por lo que se ha estudiado si LSD1 participa en la regulación de genes a través de esta actividad demetilasa. Por

inmunoprecipitación de la cromatina, se ha observado que el tratamiento con DHT lleva a un enriquecimiento de RA y LSD1 en el promotor de la cadherina, acompañado de descenso de H3K4me2, un marcador de la cromatina activo junto con un ligero incremento H3K9me2, un marcador de la cromatina represivo. Mientras que la estimulación con DHT aumenta el enriquecimiento de RA y LSD1 en el promotor de la vimentina, junto con un marcado descenso de H3K9me2 y un incremento moderado de H3K4me2. Para clarificar el papel de RA en la regulación de genes diana mediada por LSD1, se vio que la supresión de RA en MCF-7 aumentó la modificación de H3K4me2 en el promotor de la E-cadherina y de H3K9me2 en el promotor de la vimentina sin apenas modificación de H3K9me2 en el promotor de la E-Cadherina ni de H3K4me2 en el promotor de la vimentina.

En conclusión, estos resultados sugieren un modelo en el que la DHT estimula RA y dispara la función de LSD1 para suprimir la expresión de E-Cadherina por la demetilación de H3K4, mientras se activa la expresión de vimentina por la demetilación de H3K9. Esta regulación coordinada de ambas, tanto la E-Cadherina como la vimentina, lleva a la inducción de EMT y a la invasión en células de cáncer de mama²⁰.

3.E. DHT PROMOVIO METÁSTASIS DE CÁNCER IN VIVO Y EL DESCENSO DE RA O LSD1 NEUTRALIZÓ LAS METÁSTASIS INDUCIDAS POR DHT:

Para evaluar el papel crítico de RA y LSD1 en las metástasis y la invasión inducida por DHT se utilizaron células de cáncer de mama MCF-7 que expresan ectópicamente luciferasa (MCF-7 Luciferasa), que fueron infectadas por un lentivirus (que tiene el lentivirus shRNA de RA y de LSD1; en el caso de células somáticas de mamíferos se pueden introducir bien directamente siRNAs sintéticos o bien un plásmido (o un vector viral) que contenga una horquilla que exprese el siRNA. En este segundo caso se habla de expresión de "shRNAs" (siglas en inglés de short hairpin RNA) produciendo pérdida de la expresión de RA o LSD1). Estas células se implantaron en la almohadilla grasa de ratones hembras atímicos BALB/c, cuatro semanas más tarde no había apenas diferencia entre el grupo tratado con DHT y el tratado con Etanol. El descenso de LSD1 promovió ligeramente el crecimiento del tumor y la capacidad de invasión vascular se evaluó con la expresión de Luciferasa, así como los eventos metastásicos se definieron como señal detectable de luciferasa lejos del tumor primario. Esto demostró que el grupo tratado con DHT aumentó la capacidad de metástasis en contraposición al tratado con etanol, sin embargo el descenso de RA y LSD1 puede mitigar la intensidad de las metástasis²⁰.

Feng et al descubrieron un sistema de valoración del nivel de andrógenos séricos llamado D-RA. Estos autores observaron que funciona como indicador pronóstico en casi todos los tipos de cáncer de mama.

La expresión RA/LSD1 y el valor D-RA predijeron metástasis y resultados pronósticos en cáncer de mama en humanos.

Finalmente se investigó la relevancia clínica de RA y la expresión de LSD1 en muestras de carcinoma mamario humano. Se detectaron mayores niveles de RA y LSD1 en muestras de cáncer que en tejido normal, lo que pudiera tener una correlación con el estadio TNM, con las proporciones de cáncer de mama TNBC basal like, erbB2 +, RE, RP y con la afectación ganglionar.

Por otra parte, RA se expresó con mayor nivel en el luminal erbB2 que en los luminales A y B. También la expresión de LSD1 se relacionó con mayor grado de Elston-Ellis y negativamente con la expresión de E-Cadherina²⁰.

Parece que finalmente la expresión de RA/LSD1 fue un factor pronóstico pobre en el TNBC y en el Luminal erbB2. También la expresión de RA se asoció a pronóstico pobre en el MA (contrariamente a lo que dicen algunos metaanálisis³²). Se encontró poca correlación entre RA y los subtipos Luminal A y B. En casi todos los subtipos de cáncer, los elevados niveles de D-RA parece que pueden ser considerados como un factor pronóstico pobre, según el estudio de Feng et al.

Sobre la EMT o interacción epitelio/ MSC (mesenchymal stem cell) y los RA, se ha demostrado que algunos SARM (moduladores selectivos de los receptores de andrógenos) inhiben factores paracrinos secretados durante la interacción epitelio: MSC en células MDA-MB-231-RA, como CCL5, que es mediador de eventos metastásicos, el MMP13 ó IL6^{34,101}.

Los cánceres confinados a órganos adquieren potencial metastásico como resultado de una interacción entre una célula epitelial y una célula stem cell mesenquimal. Ambas células por separado carecen de la capacidad de metastatizar. La invasión a diferentes órganos se debe a factores paracrinos secretados durante la interacción epitelial-mesenquimal. Estos factores como el CCL5 pueden ser la llave que contribuye a los eventos metastásicos en el cáncer de mama³⁴.

El crecimiento de las líneas celulares TNBC que sobreexpresan RA (MDA-MB-231) se inhibió por RA agonistas. El crecimiento de tumores MDA-MB-231 en ratones atímicos (sin sistema inmune) fue completamente inhibido por los SARM GTx-027 y GTx-024. Los análisis realizados con tumores obtenidos de xenoinjertos indican que GTx-027 inhibió la expresión de mRNA para oncogenes e indujo genes supresores de tumores. GTx-027 inhibió la expresión de IL6; pero no la de CCL5, que ocurre durante la interacción epitelial-MSK de MDA-MB-231 RA. A pesar de que no

tuvo efecto sobre CCL5, GTx-027 inhibió la migración y la invasión de los cocultivos MDA-MB-231-RA/MSL, a través de mecanismos independientes de CCL5. Estos estudios demuestran el papel de RA en la interacción epitelial: MSC y sugieren que SARM puede representar un abordaje terapéutico selectivo en el tratamiento del cáncer de mama RA positivo³⁴.

El tipo adicional de cáncer de mama claudin low, recientemente identificado y que inmunohistoquímicamente se solapa parcialmente con los TNBC, se caracteriza porque tiene pocos genes claudin, necesarios para la adhesión célula a célula. MSL expresa pocos genes claudin (Claudin low) y expresa muchos genes asociados con EMT característicos de la transición epitelial mesenquimal⁵⁰.

En contraposición al estudio de Feng et al, numerosos estudios clínicos indican mejor pronóstico en tumores que expresan altos niveles de RA (mejor supervivencia y otros aspectos favorables como menor grado tumoral, menos recidivas y menos metástasis^{20,25,32}). En la publicación de Feng el autor intenta dar una posible explicación a esta contradicción. A nivel IHQ estos datos definen RA como un factor pronóstico pobre a nivel de TNBC y en el subtipo MA, estableciéndose incluso que un valor elevado de D-RA predice peor pronóstico en casi todos los tipos de cáncer.

Para encontrar una explicación a los resultados contradictorios observados con respecto a la expresión de RA, se ha tenido en cuenta en otros trabajos el tipo de anticuerpo utilizado en el estudio IHQ, ya que utilizando anticuerpos policlonales aparecen tinciones RA positivas que con anticuerpos monoclonales son negativas, esto se observa sobre todo en TNBC^{20,76,80,102-104}.

En los casos en los que se utilizan anticuerpos incapaces de reconocer a la mayoría de los RA, sobre todo en cánceres de mama metastásicos, las muestras RA positivas pueden aparecer erróneamente como RA negativas. De hecho pueden existir variantes de RA en cáncer de mama^{105,106}, por eso es importante realizar una validación de anticuerpos antes de realizar los estudios IHQ²⁰.

Como es difícil medir los niveles de andrógenos in vivo, se utiliza el D-RA que puede reflejar el nivel de andrógeno sérico. Este sistema, con validaciones y perfecciones posteriores, podría guiar la terapia antiandrogénica en algunos casos de cáncer de mama RA positivo²⁰.

4.- EFECTOS DE LOS MODULADORES SELECTIVOS DEL RA EN EL TNBC RA+

El RA se expresa hasta en un tercio de los TNBC y es claramente más abundante en el subtipo molecular LAR (luminal RA de la clasificación de Lehmann). La utilización del antiandrógeno de

nueva generación Enzalutamida y el bloqueo de RA ha permitido demostrar que otros subtipos de TNBC no LAR son críticamente dependientes de RA. De hecho, el bloqueo RA aumenta la apoptosis en cuatro líneas TNBC (SUM159PT MSL, HCC1806 BL2, BT549 ML y MDA-MB-231 MSL), que representan tres subtipos moleculares de TNBC que no son LAR (tipo mesenquimal, mesenquimal stem like y basal like). In vivo la enzalutamida disminuye la viabilidad de xenoinjertos SUM159PT y HCC1806³⁸.

También se ha confirmado que la estimulación de RA aumenta la secreción de la anfiregulina (AREG), ligando de EGFR. La proteína codificada por este gen AREG es un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es un factor de crecimiento autocrino y mitógeno. Está relacionado con el EGF y el factor de crecimiento de transformación alfa (TGF-alfa). Esta proteína interactúa con el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para promover el crecimiento de las células epiteliales normales.

La enzalutamida aboga la secreción de AREG in vivo e in vitro. La administración exógena de AREG puede rescatar los efectos de proliferación, migración e invasión suprimidos por la enzalutamida por lo que la suprarregulación de AREG es uno de los mecanismos por los que RA influyen en la tumorigénesis. Así los hallazgos de Valerie et al indican que los TNBC no LAR son RA dependientes y, además, que la enzalutamida es un tratamiento diana prometedor para múltiples subtipos de TNBC RA+³⁸.

La DHT y los SARMS (no la bicalutamida), inhiben la proliferación de MDA-MB-231-RA. SARM reducen el crecimiento del tumor y el peso del tumor en más del 90%, comparado con los tumores tratados con vehículos. El tratamiento con SARM inhibe la expresión intratumoral de genes y de vías que favorecen el desarrollo del cáncer de mama a través de la acción sobre RA. El tratamiento con SARM también inhibe factores paracrinos que promueven metástasis como IL6, MMP13 y CCL5 y por consiguiente la migración e invasión de cocultivos epiteliales:MSC³⁴.

Un ensayo fase II con bicalutamida en cáncer de mama metastásico RA+ RE- demostró un 19% de razón de beneficio clínico, indicando que los RA antagonistas pueden ser una terapia dirigida efectiva para algunos pacientes TNBC RA+³⁸.

Los subtipos moleculares de líneas celulares de TNBC utilizados en el estudio de Valerie et al³⁸ fueron previamente categorizados por Lehmann y col.:

- SUM 159 PT
- MDA-MB- 231

- BT 549
- HCC 1806

Como sabemos Lehmann y cols. concluyeron que TNBC es una enfermedad heterogénea con la más alta expresión de RA en el subtipo molecular LAR. Sin embargo RA también está representado en líneas celulares Basal like1 (BL1), Basal like 2 (BL2), Mesenchymal like (ML) y Mesenchymal Stem Cell like (MSL) que son también TNBC³⁸.

En líneas celulares TNBC, que no son LAR, el tratamiento con DHT incrementó la localización nuclear de RA, mientras que la enzalutamida, que bloquea la localización nuclear de RA, inhibió este efecto. Estos hallazgos demuestran que la localización nuclear es inhibida por la enzalutamida en RA+ TNBC y que RA se expresa en líneas celulares que representan múltiples subtipos moleculares de TNBC además del LAR.

La inhibición de RA disminuye la proliferación basal y aumenta la apoptosis en TNBC RA+:

La inhibición RA se estudió in vitro en 4 líneas celulares que representan subtipos de TNBC no LAR que incluyen SUM159PT (MSL), HCC1806 (BL2), BT549 (ML) y MDA231 (MSL).

DHT aumentó la proliferación basal de la línea celular SUM159PT y la enzalutamida disminuyó la proliferación basal mediada por el ligando, así como también la proliferación de HCC1806, BT549 y MDA231. También la enzalutamida aumentó la apoptosis en SUM159PT, HCC1806 y BT549. Este aumento de la apoptosis, que no se observó en MDA231, se midió por el aumento de la actividad de la caspasa 3/7³⁸.

La enzalutamida también disminuye la viabilidad tumoral in vivo. Las células SUM159PT, marcadas con luciferasa, SUM159PT-TGL, que representan el subtipo MSL TNBC fueron inyectadas bilateralmente en las almohadillas grasas mamarias de ratones inmunocomprometidos y tratadas con enzalutamida o con un control, seguido de randomización cuando los tumores alcanzaban 50 mm³. La enzalutamida disminuyó claramente la actividad de la luciferasa el día 35. La tinción con hematoxilina-eosina demostró que el porcentaje medio de tumor necrótico fue del 90% en el grupo de tratamiento con enzalutamida, mientras que fue del 10% en los xenoinjertos controles³⁸.

También las células HCC1806-TGL, que representan el subtipo BL2 TNBC marcadas con luciferasa, fueron inyectadas bilateralmente en las almohadillas grasas mamarias de ratones inmunocomprometidos y tratados con enzalutamida o control, seguido de randomización. Los xenoinjertos de HCC1806 crecieron un poco más rápidos que SUM159PT, resultando en la

terminación del estudio el día 14 y en un alto grado de necrosis en ambos grupos de tratamiento. Sin embargo, los xenoinjertos tratados con enzalutamida desarrollaron más necrosis. En definitiva, los resultados de Valerie et al demuestran que la enzalutamida disminuye la viabilidad celular in vivo en dos subtipos moleculares de TNBC no LAR, que son SUM 159PT(MSL) y HCC1806 (BL2), además de en el LAR MDA-MB-453³⁸.

Los SARM, que son agonistas parciales de RA, inhiben la proliferación de células de cáncer de mama RA+.

MDA-MB-231, células de cáncer de mama infectadas con RA adenovirus, fueron tratadas con DHT, el SARM GTx-027 o con bicalutamida y después se midió la viabilidad celular. El grupo de Valerie et al utiliza líneas celulares que expresan RA como MDA-MB-453 para evaluar la acción de los andrógenos en TNBC, pero se ha observado que MDA-MB-453 pueden tener mutaciones oncogénicas de RA, PTEN y PI3KCA, pueden sobreexpresar HER2 y son p53 negativas, quizá los cambios fenotípicos pueden alterar las características de los ligandos de RA no esteroideos en células de cáncer de mama TNBC, por eso, Narayanan et al utilizaron MDA-MB-231^{34,107}.

En definitiva, tras el tratamiento de líneas celulares MDA-MB-231 RA con DHT, GTx-024 (enobosarm) y GTx-027 (SARM), se observó inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama. Este efecto no se consiguió con la bicalutamida.

Al utilizar otros SARM, agonistas parciales de RA, se observaron efectos antiproliferativos en MDA-MB-231, pero esto no se observó con los antagonistas de RA, lo que puede indicar que andrógenos muy potentes pueden tener un efecto antiproliferativo en células MDA-MB-231-RA³⁴.

La inhibición de RA altera la morfología celular y disminuye la capacidad de migración e invasión³⁸:

La modulación de RA altera la morfología celular de BT549 y MDA231 de estrellada a redonda. La modulación de RA disminuyó la capacidad de migración de 4 líneas celulares TNBC, no LAR. Se examinaron los cambios en la morfología celular, así como la disminución de la migración e invasión de células BT549 tratadas con enzalutamida en una 3D Matrigel, observándose un cambio de la morfología (de estrellada a redonda), y una inhibición de la invasión y migración. En condiciones idénticas, las células BT549 controles, tratadas con enzalutamida y en las que se midió la actividad caspasa (relacionada con la apoptosis), no mostraron cambios en la apoptosis o proliferación, lo que indica que el RA está relacionado con la migración independientemente a la proliferación o apoptosis, aunque en otros estudios también aumento la apoptosis^{34,38}.

La anfirregulina (AREG) actúa como un gen regulador de RA. AREG se requiere para la morfogénesis ductal mamaria normal y es el ligando del receptor de EGF (EGFR) durante el desarrollo de la glándula mamaria.

El tratamiento con enzalutamida disminuyó a la mitad la expresión de mRNA AREG en SUM159PT (MSL) y a la cuarta parte en HC1806 (BL2). El tratamiento con DHT disminuyó significativamente la secreción de AREG en SUM159PT y en HCC1806. La activación de AREG modula vías de señalización que incluyen MAPK, RA modula negativamente la fosforilación endógena de ERK (serín treonín quinasa) y la AREG exógena rescata este efecto en HCC1806, resultados también obtenidos en SUM159PT³⁸.

Parece que RA regula AREG activando la vía de señalización MAPK (Mitogen- Activated Protein Kinasa) que tiene papeles clave en la proliferación, migración e invasión. La administración de AREG exógena rescata parcialmente el efecto de disminución de la migración e inhibición de la proliferación de células HCC1806 que produce la modulación negativa de RA al igual que sobre células SUM159PT³⁸.

Los xenoinjertos SUM159PT tratados con enzalutamida tenían disminución de la expresión de AREG comparado con controles.

La regulación de RA de AREG es uno de los mecanismos por los que RA tiene efecto en la proliferación, migración e invasión en RA+TNBC.

Recientes ensayos clínicos demostraron que el tratamiento con Cetuximab y antiEGFR, además de la quimioterapia, puede beneficiar a pacientes con cáncer de mama metastásico RA+ TNBC. In vitro sugieren que la combinación de RA antagonistas, e inhibidor EGFR ó ERK1/2 inhibidor puede ser efectivo en TNBC RA+³⁸.

El SARM GTx-027 reduce el crecimiento del tumor MDA-MB-231-RA en ratones nude (modelo de inmunodeficiencia).

Las células MDA-MB-231-RA fueron implantadas en el subcutáneo de ratones hembra nude y tratados con vehículo control o con el SARM GTx-027. Los tumores tratados con vehículo crecieron de forma importante en 5 semanas, mientras que los tratados con GTx-027 lo hicieron muy lentamente, inhibiendo en un 75% el crecimiento del tumor y reduciendo un 50% de peso del mismo. A pesar de haber utilizado una dosis alta de GTx-027, los animales no mostraron ninguna toxicidad. También se pudo demostrar que GTx-027 y el SARM candidato clínico GTx-024 (enobosarm), inhibieron el crecimiento del tumor a menor dosis, ya que tras la utilización oral de una dosis respuesta se consiguió un 90% de reducción del peso del tumor³⁴.

Un efecto colateral del estadio avanzado del cáncer es la caquexia, que se traduce por una progresiva pérdida de peso y de masa muscular ¹⁰⁸. Los SARMs GTx-024 y GTx-027 incrementaron la masa muscular y la funcionalidad física en ratones nude³⁴.

Se realizaron análisis de microarrays de tumores MDA-MB-231-RA tratados con SARM.

Para evaluar los mecanismos para conseguir un efecto antitumoral de SARMs en TNBC, se realizaron estudios array de expresión de genes que indicaron que GTx-027 modificó más genes de cáncer de mama que otras vías. Algunos genes proliferativos del cáncer de mama como aurora quinasas, ó ERCC1 fueron inhibidos, y otros genes inhibidores del crecimiento como NQO1 ó PTPR fueron activados por GTx-027. También se activaron muchos de los genes de respuesta androgénica, lo que indica que el papel inhibitorio del crecimiento en cáncer de mama de GTx-027 procede de su actividad agonista.

La señalización ErbB2 (HER 2) es la señalización más alterada por GTx-027 en tumores xenoinjertos MDA-MB-231-RA³⁴.

GTx-027 inhibe factores paracrinos secretados durante la interacción epitelial: MSC en MDA-MB-231-RA.

La interacción célula epitelial-MSC (célula stem mesenquimal) es un evento crítico que precede la invasión y las metástasis de células de cáncer de mama en otros órganos.

Para valorar el papel del RA y su ligando durante la interacción epitelial-MSC y para entender si la expresión de la diana terapéutica en uno de los dos tipos celulares es suficiente para que tenga lugar el efecto, se cocultivó cualquier MSC con MDA-MB-231-GFP (MDA-MB-231_green fluorescent protein) ó MDA-MB-231-RA y se trataron con vehículo o con GTx-027. Se midió la expresión de CCL5, IL6, MMP3 y el gen diana de RA, FKBP5. CCL5, como ya se ha dicho, es el mediador primario de eventos metastásicos. CCL5, IL6 y MMP3 aumentaban sólo cuando las células MDA-MB-231 se cocultivaban con MSC.

GTx-027 sólo inhibió la expresión de IL6 y MMP3, pero no la de CCL5 en los cocultivos de MDA-MB-231-RA y en el de MDA-MB-231-GFP. GTx-027 también aumentó la expresión de FKBP5 en MDA-MB-231-RA pero no en MDA-MB-231-GFP³⁴.

Dado que GTx-027 inhibe la secreción de IL6 y MPP3 pero no la de CCL5 en células MDA-MB-231-RA, parece que la expresión de CCL5 provenga de MSC y la de IL6 y MMP3 de MDA-MB-231-RA.

Se realizaron estudios de migración en cocultivos MDA-MB-231-RA:MSC tratados con vehículo o con GTx-027. GTx-027 inhibió la migración de las células 24 horas después del tratamiento. Dado que RA se expresa sólo en las células epiteliales y no en las MSC, la regulación de la migración e invasión podía provenir de las células MDA-MB-231.

En definitiva, SARM, como agonistas parciales de RA, pueden ser un tratamiento diana no sólo para cáncer de mama que sea RE + RA+ (en caso de resistencia a los tratamientos antiestrogénicos), sino que también para TNBC agresivos para los que la cirugía y la quimioterapia son la única opción de tratamiento. Además por su capacidad para aumentar masa muscular y restaurar la densidad mineral ósea, podrán actuar sobre la pérdida muscular y sobre la osteoporosis, que son efectos colaterales del cáncer en las últimas etapas³⁴.

Comparando pacientes con cáncer de mama no TNBC, los pacientes TNBC con enfermedad residual postquimioterapia, tienen significativamente peor pronóstico. Dado que pueden expresar RA hasta un tercio de los pacientes TNBC, los SARM pueden representar una oportunidad de tratamiento, siendo el primer tratamiento diana efectivo para esta enfermedad.

Los estudios iniciales se centraron en el papel de RA en el subtipo molecular TNBC LAR que expresa elevados niveles de RA, viéndose que respondía a la bicalutamida (antagonista RA), mientras que los otros subtipos de TNBC respondían menos o no respondían. En contraste Valerie Barton et al encontraron que otros subtipos no LAR de TNBC (ML, MSL y BL2) con relativamente baja expresión de RA, dependen críticamente de RA para la proliferación, migración e invasión, e incluso aquellos resistentes a la bicalutamida son sensibles a SARMS de nueva generación como la enzalutamida in vivo e in vitro³⁸.

En las líneas celulares que representan los subtipos moleculares de TNBC mesenchymal like BT549, mesenchymal stem like SUM159PT y basal like 2 HCC1806, la inhibición farmacológica con enzalutamida disminuyó la proliferación y aumentó la apoptosis.

Así RA puede ser necesaria para la proliferación basal óptima, aunque DHT no aumenta la proliferación en todas las líneas celulares TNBC RA. Esta discordancia entre la inhibición basal y la falta de proliferación mediada por ligando en algunas líneas celulares puede indicar el mecanismo por el que RA media la proliferación no transcripcional o menos dependiente del ligando en líneas celulares que no son LAR. De hecho las líneas MDA-MB-231 (MSL) fueron menos sensibles a la enzalutamida y un estudio reciente sugiere que es por la expresión de la variante 3 de RA que carece de dominio de unión al ligando^{38,106}.

La disminución de la viabilidad y el aumento de la apoptosis demostrado in vitro se demostraron también en xenoinjertos de ratones nude de SUM159PT y HCC1806. Algunos grupos han comentado que la inhibición RA puede modificar la supervivencia a través de la activación de la señalización PI3K ⁵⁷. La enzalutamida disminuyó significativamente la supervivencia en las líneas celulares tipo salvaje (HCC1806) y en el tipo PI3KCA mutante (SUM159PT)³⁸.

La sensibilidad de los xenoinjertos SUM159PT a la enzalutamida contrasta con los trabajos previos que dicen que la bicalutamida no inhibió el crecimiento del tumor. Las diferencias pueden ser debidas a diferentes mecanismos de acción de los RA antagonistas.

La bicalutamida permite la localización nuclear de los RA y su unión a la cromatina, reclutando más correpresores que coactivadores, mientras que la enzalutamida inhibe la localización nuclear y su unión al DNA. La bicalutamida tiene efectos como agonista parcial en el cáncer de próstata y puede tener un efecto agonista parcial en el TNBC ¹⁰⁹. Sin embargo la enzalutamida aumentó sobre todo la necrosis tumoral sin disminuir el tamaño tumoral, algo que no se determinó con la bicalutamida³⁸.

Como ya se ha mencionado, en un ensayo en fase II de bicalutamida en cáncer de mama metastásico RA+/RE-/RP- se observó un 19% de razón de beneficio clínico y una supervivencia libre de progresión de más de 12 semanas, de hecho este estudio incluyó a pacientes erbB2+ y se requirió más de un 10% de tinción RA para ser considerados en el estudio³⁸.

La razón de beneficio clínico se definió como el total de número de pacientes que mostraron una respuesta completa, una respuesta parcial o enfermedad estable más de 6 meses. Hay un caso comunicado por Salinas et al, con una paciente con un TNBC RA+ recurrente metastásico, subtipo LAR, que tuvo una respuesta completa con la utilización de la bicalutamida a pesar de un intenso pretratamiento con quimioterapia paliativa, mostrando que es posible la respuesta completa exclusivamente con terapia antiandrogénica¹¹⁰. Del mismo modo está en fase II el ensayo en el que se valora la enzalutamida en TNBC RA+ metastásico. (NCT01889238)⁶¹.

La inhibición de RA altera la morfología y disminuye la migración e invasión celular, lo que sugiere que TNBC RA+ son dependientes de RA para estas funciones.

La evidencia sugiere que el cáncer de próstata avanzado está relacionado con una activación continuada del RA y recientes estudios de cáncer de próstata y vejiga han demostrado que RA regula múltiples genes promotores de metástasis. En cáncer de mama, las metástasis resecaadas quirúrgicamente mantienen la expresión nuclear del RA, como en el tumor primario. Además las

metástasis de cáncer de mama, que incluyen metástasis de TNBC, tienen aumentada la fosforilación de RA, lo que indica receptores activos³⁸.

La bicalutamida es un antiandrógeno selectivo periféricamente, no esteroideo, que se une al RA como un antagonista. Aunque la bicalutamida no se ha estudiado en líneas celulares RE+ RA+¹¹¹, no queda claro su papel de inhibición o proliferación. De Amicis et al¹¹² estudiaron la interrelación entre la expresión de RA y la respuesta al antiestrógeno tamoxifeno en líneas celulares RE+, RA+ MCF-7 y observaron que las células resistentes al tamoxifeno expresaban altos niveles de RA y bajos niveles de RNAm RE, mostrando que la sobreexpresión de RA se asocia resistencia al tamoxifeno. Esta resistencia se podría atenuar añadiendo bicalutamida que da una opción de tratamiento interesante en cánceres resistentes al tamoxifeno que expresan RA y RE⁶¹.

Lehmann y cols. describieron que el subtipo LAR de TNBC era completamente sensible a la bicalutamida. Zhu y cols¹¹³ mostraron que en líneas celulares TNBC MSL MDA-MB-231 y HS578T, los andrógenos inducían proliferación celular e inhibían la apoptosis in vivo e in vitro y que la bicalutamida promueve la apoptosis y otros efectos inhibitorios⁶¹.

Otro estudio consiguió esclarecer la interrelación entre el factor de transcripción ZEB1, que juega un papel en la progresión del cáncer por la regulación de la transición epitelial-mesenquimal y la inhibición de la señalización de RA con bicalutamida que suprimió la expresión de ZEB1⁶¹.

También se hipotetizó sobre si la razón de la pobre respuesta a la quimioterapia adyuvante o neoadyuvante en RA+TNBC fue debida a la resistencia mediada por RA a la apoptosis. Este efecto fue estudiado en células TNBC RA+ con paclitaxel, 5-fluoruracilo y ciclofosfamida. Se observó un incremento significativo en la supervivencia y disminución de la apoptosis en presencia del andrógeno, lo que se puede revertir con la bicalutamida. Como se verá más adelante, los pacientes TNBC que son RA+ y reciben quimioterapia, tienen menores porcentajes de respuesta patológica completa y quizás la vía dirigida a RA pueda mejorar los porcentajes de respuesta patológica completa⁶¹.

Se observó una correlación positiva entre receptores de tirosin kinasa de membrana, los RA en TNBC, EGFR (como se ha señalado en relación con la anfirregulina) y factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGFR beta). Este mismo estudio encontró una actividad aumentada de PI3K/Akt en RA+ TNBC, y que la administración de bicalutamida conjuntamente con agentes diana EGFR (como cetuximab), PDGFR beta, PI3K/-mTOR, y vía ERK pueden llevar a una acción sinérgica y reforzar la utilización combinada de bloqueo RA y mTOR inhibición, tal como indican Lehmann y cols. en su estudio⁵⁷.

Una combinación diana alternativa puede ser el uso de terapia antiandrogénica y palbociclib. El palbociclib, inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4 y CDK6), puede recuperar la actividad del antiandrógeno antagonizando al RA F876L, que es una mutación de RA que lleva a la resistencia a la terapia antiandrogénica. De hecho, hay un ensayo en fase I/II de palbociclib y bicalutamida para el tratamiento de TNBC RA+ metastásicos. (NTCT02605486)⁶¹.

La enzalutamida es un antiandrógeno no esteroideo de nueva generación que se une al RA con mayor afinidad que la bicalutamida, disminuye la translocación nuclear y dificulta la unión de los elementos de respuesta androgénica y coactivadores. Un estudio de Cochrane y cols⁸⁷ examinó los efectos de la enzalutamida de cáncer de mama RA+ RE+ y RA+ RE-, encontrando que tanto in vivo como in vitro, la enzalutamida inhibió el crecimiento mediado por andrógenos en cánceres RE+ como RE- que expresaban RA. También se vio que inhibía el crecimiento mediado por estrógenos en cánceres RE+ RA+. D'Amato y cols¹¹⁴ tuvieron resultados similares, y encontraron que la inhibición de RA redujo la proliferación mediada por estradiol en enfermedad RE+ RA+. Esto sugiere que la vía RA puede ser una diana potencial también en la enfermedad RE+⁶¹.

Como ya se ha mencionado, la positividad de RA, cuando se expresa RE en cáncer de mama, se asocia a resistencia al tamoxifeno. Ciupek y cols.¹¹⁵ sugieren que en presencia de RA, el tamoxifeno lleva una activación de EGFR mediada por RA como mecanismo de resistencia. Esto se podría bloquear con enzalutamida y un inhibidor EGFR tipo gefitinib o cetuximab⁶¹.

En relación con la combinación de terapia antiandrogénica e inhibición mTOR, se han observado resultados prometedores en líneas celulares MDA-MB-453 y en un modelo de xenoinjerto de LAR.

Dado que mTOR es un derivado de PI3K, esto hace que PI3K sea importante en TNBC y una posible diana conjunta con la enzalutamida.

Hay un ensayo clínico en fase IB/II del inhibidor PI3K taselisib en combinación con la enzalutamida en TNBC avanzado (NCT02457910).

Hay que tener en cuenta que la enzalutamida se ha asociado con modulación inmunogénica, lo que incrementa la susceptibilidad de las células tumorales a la muerte celular mediada por respuesta inmune.

Kwilas et al¹¹⁶ mostraron inhibición del crecimiento con enzalutamida y abiraterona en células de cáncer de mama porque mejoraron la lisis mediada por la respuesta inmune. Este incremento de actividad lítica inmune se debe al aumento de la expresión en la superficie celular del ligando que induce apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) y la reducción en la expresión de osteoprotegerina (OPG). La enzalutamida y el antiandrógeno acetato de abiraterona,

que inhibe el CYP17A1 (17 hidroxilasa, enzima involucrada en la biosíntesis de andrógenos), disminuyen la proliferación celular y aumentan la lisis inmune en enfermedad RA positiva⁶¹.

Traina y cols¹¹⁷ obtuvieron resultados preliminares de un ensayo clínico en fase II que evaluaba la enzalutamida en TNBC RA+ metastásicos (NCT01889238)⁶⁹.

Lo primero que se determinó fue la CBR (razón de beneficio clínico) a los 6 meses que fue del 29%. La media de PFS (supervivencia libre de progresión) fue de 14 semanas e incluyó 2 CR (respuesta completa) y 5 PR (respuesta parcial). Este estudio también llevó al desarrollo de un ensayo predictivo denominado PREDICT AR en el que se vio que los pacientes que respondían a la enzalutamida tenían diferente perfil de expresión génica y tenían una CBR (razón de beneficio clínico) del 36% a las 24 semanas comparado con el 6% en pacientes que eran PREDICT AR negativos³⁸.

Como se verá más adelante los TNBC RA+ tienen un índice de respuesta patológica completa más baja en neoadyuvancia. Por eso está en marcha en fase IIB un ensayo clínico en neoadyuvancia utilizando la enzalutamida con paclitaxel, del que se espera que muestre una mejora en la proporción de respuesta (NCT02689427)⁶¹.

También hay un estudio en el que se valora el uso de enzalutamida como tratamiento adyuvante durante un año en pacientes en estadio inicial de TNBC RA+ (NCT02750358)⁶¹.

La abiraterona es un inhibidor potente de la 17 alfa hidroxilasa y la 17,20-liasa (CYP17) y se utiliza habitualmente en el cáncer de próstata resistente a la castración. Se ha estudiado en cáncer de mama metastásico RE+. Dado que la inhibición de CYP17 disminuye tanto la síntesis de andrógenos como de estrógenos, puede ser más efectivo que la utilización de los inhibidores de la aromataasa aisladamente⁶¹.

Otro ensayo clínico en fase II evaluó la seguridad y eficacia de la abiraterona con prednisona en cáncer de mama molecular apocrino metastásico con un parámetro primario de razón de beneficio clínico a los 6 meses (CBR) del 20%, que incluyó 1 CR (respuesta completa) y 5 SD (enfermedad estable), aunque la proporción de respuesta global fue sólo del 6,7%. con una mediana de PFS (supervivencia libre de progresión) de 2,8 meses.

También hay un ensayo multicéntrico que evalúa la abiraterona en combinación con el PI3K inhibidor AZD8186 en varios tumores sólidos malignos, que incluyen TNBC (NCT01884285)⁶¹.

Otros antiandrógenos no esteroideos como el Orteronel o el Seviteronel están en estudio. Ambos son inhibidores selectivos de CYP17. El Orteronel está en estudio en fase II de ensayo clínico en pacientes con cáncer de mama metastásicos RA+, con 2 cohortes separadas: enfermedad RE+ y

TNBC (NC01990209). El Seviteronel está en estudio fase I/II con igualmente pacientes metastásicas y 2 cohortes separadas de estudio para RE+ y TNBC (NCT02580448)⁶¹.

Narayanan y cols. demostraron que los SARM pueden inhibir el crecimiento de líneas celulares MDA-MB-231 más que los antiandrógenos, tanto in vivo como in vitro, encontrando que la adición de SARM inhibió la expresión intratumoral de vías genéticas que promueven el desarrollo del cáncer de mama, factores paracrinicos metastásicos y proliferación celular.

Basado en estos hallazgos, se ha iniciado un estudio clínico multicéntrico en fase II que investiga la eficacia y seguridad de enobosarm (GTx-024) en TNBC RA+ avanzado (NCT02368691)³⁴.

Los IPARP (inhibidores de la poliADP ribosa polimerasa) son un grupo de agentes dirigidos a la proteína PARP1 que actúa reparando las roturas de la hebra simple del DNA. Estas roturas ocurren con frecuencia en el ciclo celular y se relacionan con la actividad de PARP⁶¹.

Los pacientes con susceptibilidad a padecer cáncer de mama con mutaciones BRCA1, BRCA2 y PALB2 son susceptibles a la rotura de la doble hebra del DNA y estos genes normalmente funcionan corrigiendo estas roturas.

En pacientes con estas mutaciones, la adición de un PARP inhibidor lleva a la muerte celular. Poco se conoce sobre la señalización de RA y la inhibición PARP. En la actualidad no hay estudios clínicos o preclínicos que evalúen la utilidad de la inhibición PARP específicamente en enfermedad RA+, aunque la inhibición PARP ha llegado a ser una herramienta importante en el tratamiento del cáncer de mama, especialmente en células mutadas BRCA1, BRCA2 o PALB2, su actividad relacionada con la vía RA debe definirse mejor^{61,118}.

La señalización BET (Bromodomain and extraterminal) ha emergido recientemente como una vía importante en la señalización RA. Parece que la inhibición BET produce supresión del crecimiento de TNBC independientemente del subtipo molecular intrínseco que sea. Sin embargo, no está claro el papel de BET y de la señalización de RA en los efectos descritos, por lo que es importante esclarecer el efecto de ambos en cáncer de mama. Hay 3 ensayos clínicos en fase precoz que evalúan a los inhibidores BET en TNBC y en otras enfermedades^{61,119}.

Como también se ha mencionado, múltiples estudios indican que la expresión de RA se asocia a un pronóstico favorable, lo que incluye a TNBC, característica que no puede sorprender porque tanto RA como RE indican una forma más diferenciada de enfermedad. Altos niveles de expresión de RA pueden asociarse a un tumor más luminal, mejor diferenciado y menos agresivo, lo que confiere un buen pronóstico.

Se necesitarán futuros estudios para caracterizar el papel de RA en las metástasis del cáncer de mama para determinar si la terapia dirigida RA es capaz de reducir la carga tumoral en modelos preclínicos de TNBC.

5.- QUIMIORRESISTENCIA DE LOS TNBC. QUIMIORRESISTENCIA DEL TNBC RA POSITIVO.

Entre los pacientes TNBC que reciben quimioterapia neoadyuvante, sólo los que consiguen una pCR tienen mejoría de la supervivencia. En contraste más del 70% de los TNBC tienen enfermedad residual después de neoadyuvancia y tienen más riesgo de recaída con significativamente peor supervivencia, particularmente en los tres primeros años. En nuestra serie solo 5 de 45 pacientes (11%) que recibieron terapia sistémica primaria tuvieron respuesta patológica completa.

De forma paradójica, no todos los TNBC con enfermedad residual después de neoadyuvancia recaen. La identificación de los TNBC quimiorresistentes que recaen frente los que no lo hacen puede llevar distinguir subgrupos diferentes relevantes para el pronóstico.

Ke-Da Yu et al⁵⁸ identificaron las diferencias de expresión génica de pacientes TNBC resistentes a tratamiento sistémico primario, para agrupar por una lado los que tienden a la recaída precoz frente a los que no presentan recaída precoz.

Para ello, consideraron una cohorte de hallazgos y una cohorte de validación. Los pacientes del MD Anderson Cancer Center (MDACC) fueron la cohorte de hallazgos y los pacientes del Methodist Hospital Baylor College of Medicine (TMH-BCM) fueron la cohorte de validación.

Los pacientes debían ser TNBC tratados en neoadyuvancia con antraciclinas y taxanos con enfermedad residual en la mama o en los ganglios, con carga tumoral residual II/III y con seguimiento de más de 20 meses.

Al examinar la cohorte de hallazgos y comparar los tumores quimiorresistentes que recayeron frente a los que no lo hicieron, se identificaron 246 genes significativamente diferentes entre los dos grupos.

Finalmente se obtuvo una firma de 7 genes para TNBC quimiorresistentes basada en la predicción de quimiosensibilidad de otra firma publicada previamente^{120,121}. Los 7 genes fueron: RA (receptor de andrógeno), ESR2 (receptor de estrógeno 2), GATA3 (proteína 3 de unión a GATA), GBX2 (gastrulation brain homeobox 2), KRT16 (keratin 16), MMP28 (matrix metallopeptidase 28), y WNT11 (winless-type MMTV integration site family, member 11).

El marcador basal KRT16, el marcador de stem cell like WNT11 y el marcador MMP28 de transición epitelial mesenquimal (EMT) definen integralmente un subgrupo de TNBC con pronóstico desfavorable.

En contraste, el marcador luminal GATA3 y el receptor hormonal luminal RA se expresaban de forma relativamente alta en TNBC con pronóstico favorable.

El GATA3 es un marcador luminal típico de tumores de mama RE+. GATA3 se expresó en el 30% de los TNBC de la cohorte de hallazgos.

La firma génica pronóstica tuvo un VPP (valor predictivo positivo) en la cohorte de hallazgos del 95% y un VPN (valor predictivo negativo) de DRFS (supervivencia libre de enfermedad a distancia) del 100% para los 3 primeros años tras el diagnóstico. En la cohorte de validación tuvo un VPP de 75% (recurrencia) y un VPN de 76,9% (ausencia de recurrencia en 3 años)

La firma génica fue el único factor que pudo predecir los resultados de pacientes TNBC con enfermedad residual después de quimioterapia neoadyuvante. Su utilidad en adyuvancia es poco clara.

En definitiva, aunque los pacientes con TNBC y enfermedad residual después de quimioterapia neoadyuvante tienen peor supervivencia que los luminales con enfermedad residual, algunos de ellos no recaen durante tiempo.

Existe una asociación entre subgrupos quimiorresistentes y la subclasificación molecular de TNBC de Lehmann y cols.

Al examinar la expresión de los 7 genes en 587 muestras de TNBC, se vió que los valores de RA, GATA3 y KRT16 fueron mayores que el resto de los genes. Había una clara ausencia del GATA3 en los subtipos M y MSL, RA y GATA3 estaban enriquecidos en el subtipo LAR, mientras que WNT11 y MMP28 se expresaban comúnmente en los subtipos M y MSL.

Esta firma desafía la aplicabilidad universal del concepto de que la falta de pCR en TNBC equivale a recurrencia o pobre supervivencia aunque, en nuestra serie, el 54% (6 de 11 pacientes) de los TNBC GATA3 + y RA+ quimiorresistentes tras tratamiento sistémico primario recayeron , bien de forma local, a distancia o ambas y el 47% (10 de 22 pacientes) de los TNBC RA- quimiorresistentes recayeron bien de forma local, a distancia o ambas, no observándose diferencias entre ambos grupos.

Sabemos que hay dos entidades principales en TNBC quimiorresistentes: uno es el tipo LAR (luminal like relacionado con RA) y otro son los tumores stem cell-like. Para los primeros un

modulador de RA, como ya se ha expuesto, podría ser más efectivo que la quimioterapia tradicional, para los segundos proteínas diana involucradas en la renovación celular o en la transición epitelial-mesenquimal pueden ser una estrategia terapéutica adecuada (inhibidores de la WNT/beta-catenina).

El estudio de Ke-Da-Yu tiene algunas limitaciones como el tamaño de la muestra en la cohorte de hallazgos y en la cohorte de validación.

Se requieren posteriores validaciones en series prospectivas largas y búsquedas adicionales de estrategias de tratamiento para tumores quimiorresistentes TNBC.

CONCLUSIONES

- 1.- No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global ni en la supervivencia libre de enfermedad entre ambos grupos. Por tanto, no hemos podido concluir que los TNBC RA+ se asocien a mejor pronóstico que los TNBC RA-.
- 2.- No hemos podido concluir que la pérdida de expresión de E-cadherina se relacione con el desarrollo de metástasis a distancia.
- 3.- La coexpresión GATA3 y RA se asocia a mejor pronóstico. Casi el 100% de las pacientes vivas sin enfermedad RA+ son también GATA3 +.
- 4.- Los TNBC RA+ son tumores más diferenciados y menos proliferativos que los RA-. No hay relación entre la expresión de RA y el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el estadio, el desarrollo de metástasis, la recidiva local, la invasión vásculo-linfática, la presencia de necrosis tumoral, los meses de supervivencia global ni libre de enfermedad.
- 5.- La afectación ganglionar es un factor independiente y fuertemente relacionado con la recurrencia local y las metástasis a distancia.
- 6.-La modulación de los receptores de andrógenos puede mejorar la quimiorresistencia de TNBC RA+, mediante un mejor control local de la enfermedad (inhibición de crecimiento tumoral y apoptosis) y mediante el bloqueo de la transformación epitelial-mesenquimal que precede al desarrollo de las metástasis.
- 7.- La combinación entre moduladores de RA y agentes que actúan en otras vías relacionadas como el PI3 K parece que tienen acción sinérgica con la modulación del RA en la inhibición de laprogresión tumoral.
- 8.-Se puede recomendar la determinación inmunohistoquímica del receptor de andrógeno (RA) en los cánceres de mama triple negativos (TNBC) como factor predictivo de respuesta patológica al tratamiento sistémico primario, aunque de momento no se le pueda dar un valor pronóstico, dada la dificultad de discriminar los diferentes subgrupos de TNBC RA+.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
2. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AAA, Caldas C, Brenton, James D; Carey, Lisa A; Ahmed AACC. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10;23 (29)(29):7350–60.
3. Loi S, Piccart M, Sotiriou C. The use of gene-expression profiling to better understand the clinical heterogeneity of estrogen receptor positive breast cancers and tamoxifen response. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007.
4. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
5. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Androgen Receptor Expression Predicts Decreased Survival in Early Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(1):82–9.
6. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, Chanplakorn N, Wongwaisayawan S, Incharoen P, et al. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: Its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci*. 2013;104(5):639–46.
7. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750–67.
8. Bauer JA, Chakravarthy AB, Rosenbluth JM, Mi D, Seeley EH, De Matos Granja-Ingram N, et al. Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 15;16(2):681–90.
9. Juul N, Szallasi Z, Eklund AC, Li Q, Burrell RA, Gerlinger M, et al. Assessment of an RNA interference screen-derived mitotic and ceramide pathway metagene as a predictor of response to neoadjuvant paclitaxel for primary triple-negative breast cancer: a retrospective analysis of five clinical trials. *Lancet Oncol*. 2010 Apr;11(4):358–65.
10. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Mamessier E, Adélaïde J, et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4636–44.
11. Gibson GR, Qian D, Ku JK, Lai LL. Metaplastic breast cancer: clinical features and outcomes. *Am Surg*. 2005 Sep;71(9):725–30.
12. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Oct 2;12(5):R68.
13. Hayes MJ, Thomas D, Emmons A, Giordano TJ, Klee CG. Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. *Clin Cancer Res*. 2008 Jul 1;14(13):4038–44.
14. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5505–12.
15. Elebro K, Borgquist S, Simonsson M, Markkula A, Jirstrom K, Ingvar C, et al. Combined Androgen and Estrogen Receptor Status in Breast Cancer: Treatment Prediction and Prognosis in a Population-Based Prospective Cohort. *Clin Cancer Res*. 2015 Aug 15;21(16):3640–50.
16. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, Diaz-Padilla I, Bedard PL, Al-Mubarak M, et al.

- Androgen Receptor Expression and Outcomes in Early Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2014 Jan 1;106(1):djt319–djt319.
17. Dorgan JF, Stanczyk FZ, Kahle LL, Brinton LA. Prospective case-control study of premenopausal serum estradiol and testosterone levels and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2010;12(6).
 18. Fourkala EO, Zaikin A, Burnell M, Gentry-Maharaj A, Ford J, Gunu R, et al. Association of serum sex steroid receptor bioactivity and sex steroid hormones with breast cancer risk in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19(2):137–47.
 19. Berrino F, Pasanisi P, Bellati C, Venturelli E, Krogh V, Mastroianni A, et al. Serum testosterone levels and breast cancer recurrence. *Int J Cancer.* 2005;
 20. Feng J, Li L, Zhang N, Liu J, Zhang L, Gao H, et al. Androgen and AR contribute to breast cancer development and metastasis: an insight of mechanisms. *Oncogene.* 2017;36(20).
 21. Chen J, Wang WQ LS. Interaction of Androst- 5- ene 3 beta, 17 beta- diol and 5 alfa- androstano 3 beta, 17 beta diol with estrogen and androgen receptors; a combined binding a cell study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;137:316–21.
 22. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardelli C, Weger MA, Horsfall DJ, et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995 May;52(5):459–67.
 23. Zhu X, Li H, Liu JP, Funder JW. Androgen stimulates mitogen-activated protein kinase in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Jun 25;152(1–2):199–206.
 24. Takagi K, Miki Y, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. The interplay of endocrine therapy, steroid pathways and therapeutic resistance: Importance of androgen in breast carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2018.
 25. Qu Q, Mao Y, Fei XC, Shen KW. The impact of androgen receptor expression on breast cancer survival: A retrospective study and meta-analysis. Aziz SA, editor. *PLoS One.* 2013 Dec 4;8(12):e82650.
 26. Ni M, Chen Y, Fei T, Li D, Lim E, Liu XS, et al. Amplitude modulation of androgen signaling by c-MYC. *Genes Dev.* 2013 Apr 1;27(7):734–48.
 27. Hu X-Q, Chen W-L, Ma H-G, Jiang K. Androgen receptor expression identifies patient with favorable outcome in operable triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2017;
 28. Garay JP, Karakas B, Abukhdeir AM, Cosgrove DP, Gustin JP, Higgins MJ, et al. The growth response to androgen receptor signaling in ER α -negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Res.* 2012 Feb 9;14(1):R27.
 29. Pistelli Mirco, Caramanti Miriam, Biscotti Tommasina, Santinelli Alfredo, Pagliacci Alessandra, De Lisa Mariagrazia, Ballatore Zelmira, Ridolfi Francesca, Maccaroni Elena, Bracci Raffaella, Berardi Rossana, Batelli Nicola CS, Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T, Santinelli A, Pagliacci A, et al. Androgen Receptor Expression in Early Triple- Negative Breast Cancer: Clinical Significance and Prognostic Associations. *Cancers (Basel).* 2014 Jun 27;6(3)(3):1351–62.
 30. McNamara KM, Moore NL, Hickey TE, Sasano H, Tilley WD. Complexities of androgen receptor signalling in breast cancer. Vol. 21, *Endocrine-Related Cancer.* 2014.
 31. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2007 Dec 13;52(1):108–18.
 32. Wang C, Pan B, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Lin Y, et al. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7(29):46482–91.
 33. Cops EJ, Bianco-Miotto T, Moore NL, Clarke CL, Birrell SN, Butler LM, et al. Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Jun;110(3–5):236–43.
 34. Narayanan R, Ahn S, Cheney MD, Yepuru M, Miller DD, Steiner MS, et al. Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) negatively regulate triple-negative breast cancer growth and epithelial:mesenchymal stem cell signaling. *PLoS One.* 2014;9(7).
 35. Kearbey JD, Gao W, Narayanan R, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, et al. Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) treatment prevents bone loss and reduces body fat in ovariectomized rats. *Pharm Res.* 2007 Feb 25;24(2):328–35.

36. Kearbey JD, Gao W, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, Dalton JT. Effects of Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) Treatment in Osteopenic Female Rats. *Pharm Res.* 2009 Nov 1;26(11):2471–7.
37. Dalton JT, Barnette KG, Bohl CE, Hancock ML, Rodriguez D, Dodson ST, et al. The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011 Sep;2(3):153–61.
38. Barton VN, D’Amato NC, Gordon MA, Lind HT, Spoelstra NS, Babbs BL, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(3):769–78.
39. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):366–74.
40. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):917–21.
41. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from *BRCA* Mutation Carriers. *N Engl J Med.* 2009 Jul 9;361(2):123–34.
42. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367–74.
43. Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, Cobleigh MA, Wolff AC, Eisenberg PD, et al. Phase II Study of Sunitinib Malate, an Oral Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Metastatic Breast Cancer Previously Treated With an Anthracycline and a Taxane. *J Clin Oncol.* 2008 Apr 10;26(11):1810–6.
44. Ellard SL, Clemons M, Gelmon KA, Norris B, Kennecke H, Chia S, et al. Randomized phase II study comparing two schedules of everolimus in patients with recurrent/metastatic breast cancer: NCIC Clinical Trials Group IND.163. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 20;27(27):4536–41.
45. Chou J, Provot S, Werb Z. GATA3 in development and cancer differentiation: Cells GATA have it! *J Cell Physiol.* 2010 Jan;222(1):42–9.
46. Tominaga N, Naoi Y, Shimazu K, Nakayama T, Maruyama N, Shimomura A, et al. Clinicopathological analysis of GATA3-positive breast cancers with special reference to response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2012 Dec;23(12):3051–7.
47. Min K-W, Kim D-H, Do S-I, Chae SW, Kim K, Sohn JH, et al. Negative association between GATA3 and fascin could predict relapse-free and overall survival in patients with breast cancer. *Virchows Arch.* 2016 Apr 30;468(4):409–16.
48. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Apr 1;21(7):1688–98.
49. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* 2005 Jul 9;24(29):4660–71.
50. Ricciardi GRR, Adamo B, Ieni A, Licata L, Cardia R, Ferraro G, et al. Androgen receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as emerging targets and novel prognostic markers in triple-negative breast cancer (TNBC) patients. *PLoS One.* 2015 Jun 3;10(6).
51. Adamo B, Anders CK. Stratifying triple-negative breast cancer: which definition(s) to use? *Breast Cancer Res.* 2011 Apr 1;13(2):105.
52. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2008 Nov 15;113(10):2638–45.
53. Hudis CA, Gianni L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *Oncologist.* 2011 Jan 1;16(Supplement 1):1–11.

54. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):236–40.
55. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
56. Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *Oncologist*. 2011 Jan 1;16(Supplement 1):61–70.
57. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2014 Aug 8;16(4):406.
58. Yu K Da, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, et al. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(10):2723–33.
59. Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, Ikeda K, Tokunaga S, Nagahara H, et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol*. 2008 Oct 23;13(5):431–5.
60. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A, Salat C, Sinn B, Schem C, et al. Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget*. 2016 Oct 18;7(42):67686–98.
61. Rahim B, O'Regan R. AR signaling in breast cancer. Vol. 9, *Cancers*. 2017.
62. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):25–32.
63. Sutton LM, Cao D, Sarode V, Molberg KH, Torgbe K, Haley B, et al. Decreased Androgen Receptor Expression Is Associated With Distant Metastases in Patients With Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2012 Oct 1;138(4):511–6.
64. McGhan LJ, McCullough AE, Protheroe CA, Dueck AC, Lee JJ, Nunez-Nateras R, et al. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: A unique breast cancer subtype. *Ann Surg Oncol*. 2014 Feb 18;21(2):361–7.
65. Mrklič I, Pogorelić Z, Čapkun V, Tomić S. Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem*. 2013 May;115(4):344–8.
66. Hu R, Dawood S, Holmes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Cole K, et al. Androgen Receptor Expression and Breast Cancer Survival in Postmenopausal Women. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 1;17(7):1867–74.
67. Kim S, Moon BI, Lim W, Park S, Cho MS, Sung SH. Expression patterns of GATA3 and the androgen receptor are strongly correlated in patients with triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2016;55:190–5.
68. Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, et al. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol*. 2010 Dec;41(12):1794–801.
69. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. Vol. 6, *Hormones and Cancer*. 2015. p. 206–13.
70. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15):4429–34.
71. Kono M, Fujii T, Lim B, Sri Karuturi M, Tripathy D, Ueno NT. Androgen receptor function and androgen receptor-targeted therapies in breast cancer: A review. Vol. 3, *JAMA Oncology*. 2017. p. 1266–73.
72. Ward RD, Weigel NL. Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *Biofactors*. 2009 Nov;35(6):528–36.
73. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer

- molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5533–40.
74. Lupien M, Eeckhoute J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, et al. FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell*. 2008 Mar 21;132(6):958–70.
 75. Robinson JLL, Macarthur S, Ross-Innes CS, Tilley WD, Neal DE, Mills IG, et al. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J*. 2011 Jun 24;30(15):3019–27.
 76. Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM, Bhargava R. Androgen receptor in breast cancer: Expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol*. 2010;23(2):205–12.
 77. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron J, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006 Apr 27;7(1):96.
 78. Lehmann-Che J, Hamy A-S, Porcher R, Barritault M, Bouhidel F, Habuelleh H, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res*. 2013 Jun 11;15(3):R37.
 79. Moore NL, Buchanan G, Harris JM, Selth LA, Bianco-Miotto T, Hanson AR, et al. An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Aug;19(4):599–613.
 80. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, Carey M, Agarwal R, Meric-Berstam F, et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2472–8.
 81. Juric D, Castel P, Griffith M, Griffith OL, Won HH, Ellis H, et al. Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K α inhibitor. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):240–4.
 82. Ni J, Liu Q, Xie S, Carlson C, Von T, Vogel K, et al. Functional Characterization of an Isoform-Selective Inhibitor of PI3K-p110 β as a Potential Anticancer Agent. *Cancer Discov*. 2012 May;2(5):425–33.
 83. Schwartz S, Wongvipat J, Trigwell CB, Hancox U, Carver BS, Rodrik-Outmezguine V, et al. Feedback suppression of PI3K α signaling in PTEN-mutated tumors is relieved by selective inhibition of PI3K β . *Cancer Cell*. 2015 Jan 12;27(1):109–22.
 84. MESTER J, ENG C. When Overgrowth Bumps Into Cancer: The PTEN-Opathies. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2013 May;163(2):114–21.
 85. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, et al. Targeting Androgen Receptor in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2011 Jul 12;20(1):119–31.
 86. Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia*. 2008 Jun;10(6):542–8.
 87. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res*. 2014 Jan 22;16(1):R7.
 88. Lønning PE. Additive endocrine therapy for advanced breast cancer – back to the future. *Acta Oncol (Madr)*. 2009 Jan 28;48(8):1092–101.
 89. Lin F de ML, Pincerato KM, Bacchi CE, Baracat EC, Carvalho FM. Coordinated expression of oestrogen and androgen receptors in HER2-positive breast carcinomas: impact on proliferative activity. *J Clin Pathol*. 2012 Jan;65(1):64–8.
 90. Masuda K, Werner T, Maheshwari S, Frisch M, Oh S, Petrovics G, et al. Androgen receptor binding sites identified by a GREF_GATA model. *J Mol Biol*. 2005 Nov 4;353(4):763–71.
 91. Wang Y, He X, Ngeow J, Eng C. GATA2 negatively regulates PTEN by preventing nuclear translocation of androgen receptor and by androgen-independent suppression of PTEN transcription in breast cancer. *Hum Mol Genet*. 2012 Feb 1;21(3):569–76.
 92. Yan W, Cao QJ, Arenas RB, Bentley B, Shao R. GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2010 Apr 30;285(18):14042–51.
 93. Mehra R, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, et al. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11259–64.

94. Dydensborg AB, Rose AAN, Wilson BJ, Grote D, Paquet M, Giguère V, et al. GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2009 Jul 23;28(29):2634–42.
95. Chu IM, Michalowski AM, Hoenerhoff M, Szauter KM, Luger D, Sato M, et al. GATA3 inhibits lysyl oxidase-mediated metastases of human basal triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*. 2012 Apr 19;31(16):2017–27.
96. Wang Y, He X, Yu Q, Eng C. Androgen receptor-induced tumor suppressor, KLLN, inhibits breast cancer growth and transcriptionally activates p53/p73-mediated apoptosis in breast carcinomas. *Hum Mol Genet*. 2013 Jun 1;22(11):2263–72.
97. Wang Y, Yu Q, He X, Romigh T, Altemus J, Eng C. Activation of AR sensitizes breast carcinomas to NVP-BEZ235's therapeutic effect mediated by PTEN and KLLN upregulation. *Mol Cancer Ther*. 2014 Feb 1;13(2):517–27.
98. Hackenberg R, Hofmann J, Hölzel F, Schulz KD. Stimulatory effects of androgen and antiandrogen on the in vitro proliferation of human mammary carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1988;114(6):593–601.
99. Maggiolini M, Donzé O, Jeannin E, Andò S, Picard D. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):4864–9.
100. Chen J, Wang W-Q, Lin S-X. Interaction of Androst-5-ene-3 β ,17 β -diol and 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol with estrogen and androgen receptors: a combined binding and cell study. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Sep;137:316–21.
101. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557–63.
102. Luo X, Shi Y-X, Li Z-M, Jiang W-Q. Expression and clinical significance of androgen receptor in triple negative breast cancer. *Chin J Cancer*. 2010 Jun;29(6):585–90.
103. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb-Esfahani S, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov 12;130(2):477–87.
104. Tsutsumi Y. Apocrine carcinoma as triple-negative breast cancer: novel definition of apocrine-type carcinoma as estrogen/progesterone receptor-negative and androgen receptor-positive invasive ductal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 May 1;42(5):375–86.
105. Hickey TE, Irvine CM, Dvinge H, Tarulli GA, Hanson AR, Ryan NK, et al. Expression of androgen receptor splice variants in clinical breast cancers. *Oncotarget*. 2015 Dec 29;6(42):44728–44.
106. Hu DG, Hickey TE, Irvine C, Wijayakumara DD, Lu L, Tilley WD, et al. Identification of Androgen Receptor Splice Variant Transcripts in Breast Cancer Cell Lines and Human Tissues. *Horm Cancer*. 2014 Apr 26;5(2):61–71.
107. Garay JP, Park BH. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2012;2(4):434–45.
108. Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Feb 4;10(2):90–9.
109. Kemppainen JA, Wilson EM. Agonist and antagonist activities of hydroxyflutamide and Casodex relate to androgen receptor stabilization. *Urology*. 1996 Jul;48(1):157–63.
110. Arce-Salinas C, Riesco-Martinez MC, Hanna W, Bedard P, Warner E. Complete Response of Metastatic Androgen Receptor-Positive Breast Cancer to Bicalutamide: Case Report and Review of the Literature. *J Clin Oncol*. 2016 Feb 1;34(4):e21–4.
111. Toth-Fejel S, Cheek J, Calhoun K, Muller P, Pommier RF. Estrogen and androgen receptors as comediators of breast cancer cell proliferation: providing a new therapeutic tool. *Arch Surg*. 2004 Jan 1;139(1):50–4.
112. De Amicis F, Thirugnansampanthan J, Cui Y, Selever J, Beyer A, Parra I, et al. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 May 17;121(1):1–11.

113. Zhu A, Li Y, Song W, Xu Y, Yang F, Zhang W, et al. Antiproliferative Effect of Androgen Receptor Inhibition in Mesenchymal Stem-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(3):1003–14.
114. D’Amato NC, Gordon MA, Babbs B, Spoelstra NS, Carson Butterfield KT, Torkko KC, et al. Cooperative Dynamics of AR and ER Activity in Breast Cancer. *Mol Cancer Res*. 2016 Nov 1;14(11):1054–67.
115. Ciupek A, Rechoum Y, Gu G, Gelsomino L, Beyer AR, Brusco L, et al. Androgen receptor promotes tamoxifen agonist activity by activation of EGFR in ER α -positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Nov 20;154(2):225–37.
116. Kwilas AR, Ardiani A, Gameiro SR, Richards J, Hall AB, Hodge JW. Androgen deprivation therapy sensitizes triple negative breast cancer cells to immune-mediated lysis through androgen receptor independent modulation of osteoprotegerin. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):23498–511.
117. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O’Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor–Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 20;36(9):884–90.
118. Livraghi L, Garber JE. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med*. 2015 Aug 13;13(1):188.
119. Asangani IA, Dommeti VL, Wang X, Malik R, Cieslik M, Yang R, et al. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2014 Jun 12;510(7504):278–82.
120. Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011 Oct 6;13(5):R97.
121. Symmans WF, Hatzis C, Sotiriou C, Andre F, Peintinger F, Regitnig P, et al. Genomic Index of Sensitivity to Endocrine Therapy for Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 20;28(27):4111–9.