

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Análisis de un perfil de microARNs como factor pronóstico en cáncer
de mama con afectación axilar**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Guillermo Antonio de Velasco Oria de Rueda

Directores

Eva María Ciruelos Gil
Juan Ángel Fresno Vara
Luis Paz-Ares Rodríguez

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



**Análisis de un perfil de microARNs
como factor pronóstico en cáncer de
mama con afectación axilar**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



**Análisis de un perfil de microARNs
como factor pronóstico en cáncer de
mama con afectación axilar**

Memoria presentada para la obtención del grado de

Doctor en Medicina por

Guillermo Antonio de Velasco Oria de Rueda

Dirigida por la Dra. Eva Ciruelos, el Dr. Juan Ángel Fresno y el

Dr. Luiz Paz-Ares

Madrid, 2015

Dña. Eva Ciruelos Gil, Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario “12 de Octubre” y Profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

D. Juan Ángel Fresno Vara, miembro de la unidad de Oncología translacional del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz

Dr. Luis Paz-Ares, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario “12 de Octubre” y Profesor titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Certifican:

Que D. Guillermo Antonio de Velasco Oria de Rueda ha realizado durante los últimos tres años, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado “**Análisis de un perfil de micro-ARNs como factor pronóstico en cáncer de mama con afectación axilar**”, **para optar al grado de Doctor en Medicina**

Estimamos que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptado para su presentación.

Madrid, 15 de Septiembre de 2015

Dra. Eva Ciruelos Gil

Dr. Juan Ángel Fresno Vara

Dr. Luiz Paz-Ares Rodríguez

“I doubt if it is worth while going on with the procedure. Nevertheless, as a scientific fact it is clear [...]”

W. WATSON CHEYNE, 1898.

Agradecimientos

El crecimiento profesional y académico es indudablemente un camino arduo, como la propia vida supone un esfuerzo diario y una determinación clara para llevar a cabo tus objetivos. Esta tesis doctoral surgió en medio de mi propia incertidumbre gracias a la ayuda incondicional de la Dra. Ciruelos, la cual me brindó la mano y me ofreció llevar a cabo este proyecto común. Desde ese momento lo que parecía difícil, se convirtió en un reto personal alcanzable, con la presencia constante de su apoyo y motivación, gracias a sus consejos, revisiones y su gran paciencia conmigo, he podido culminar un proyecto apasionante que me ha enriquecido en lo personal y profesional.

Al Dr. Juan Ángel Fresno quiero agradecer su apoyo, su visión global, la mirada de la ciencia aplicada de la forma más práctica y por sus inquietudes, accesibilidad y su conocimiento.

El Dr. Luis Paz-Ares es para mí un ejemplo en el mundo de la oncología desde que en 6º de Medicina tuve el privilegio de asistir a una de sus clases sobre los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y las terapias dirigidas. Es un honor que sea co-director de mi tesis doctoral.

Ángelo ha sido otro pilar fundamental, por su desinteresada ayuda, sus revisiones, consejos, respuestas y por toda la información solicitada en cada momento. Así mismo, quiero destacar que un proyecto de calidad no se puede realizar sin la integración de profesionales pertenecientes diferentes disciplinas. Agradezco a cada uno de los técnicos, patólogos, biólogos moleculares y oncólogos médicos que han colaborado de algún modo con este proyecto.

Me gustaría mostrar también mi agradecimiento hacia todo el Servicio de Oncología del Hospital 12 de Octubre, en especial al Dr. Hernán Cortés Funes gracias al cual este Servicio es uno de los mejores de España por su calidad asistencial y de investigación. A todos mis compañeros y los médicos adjuntos que durante estos años contribuyeron a mi formación.

La realización de la presente tesis no podría haberse realizado sin la financiación correspondiente al FIS PI 09/1394.

Agradezco a mi amigo Ismael cada uno sus consejos y comentarios, tan sofisticados algunas veces. Agradezco también a Tomás su tiempo y sus constructivos comentarios en la fase final.

Por último, no podría haber realizado esta tesis sin el apoyo siempre incondicional de Aida y desde la más absoluta ternura, agradezco también la casi imposibilidad para terminar esta tesis doctoral, por las infinitas interrupciones de mis adoradas hijas Daniela y Jimena.

TOC \O "1-3" \H \Z \U 1 INTRODUCCIÓN: CÁNCER DE MAMA

12

<u>1.1</u>	<u>Epidemiología del cáncer</u>	12
<u>1.2</u>	<u>Cáncer en el Mundo</u>	13
<u>1.3</u>	<u>Cáncer en España</u>	14
<u>1.4</u>	<u>Cáncer de mama en España</u>	17
<u>1.5</u>	<u>Factores de riesgo de cáncer de mama</u>	18
<u>1.6</u>	<u>Prevención del cáncer de mama</u>	20
<u>1.7</u>	<u>Situación actual del tratamiento del cáncer de mama precoz</u>	22
1.7.1	Cribado	22
1.7.2	Estadificación	23
1.7.3	Factores pronósticos	24
<u>1.8</u>	<u>Clasificación molecular del cáncer de mama</u>	30
1.8.1	Perfiles de expresión genética y clasificación pronóstica	30
1.8.2	Subtipos de Cáncer de Mama	31
1.8.3	Perfiles de expresión molecular	35
<u>1.9</u>	<u>Tratamiento del cáncer de mama localizado</u>	41
1.9.1	Tratamiento quirúrgico	41
1.9.2	Tratamiento con radioterapia adyuvante	42
1.9.3	Tratamiento hormonal adyuvante	43
1.9.4	Tratamiento con quimioterapia	44
1.9.5	Tratamiento con fármacos biológicos	45
<u>1.10</u>	<u>Perspectivas futuras en el tratamiento del cáncer de mama precoz</u>	46
<u>1.11</u>	<u>Características moleculares y funcionales en la regulación celular de los miARNs</u>	48
1.11.1	Introducción	48
1.11.2	Estructura y Biogénesis de los miARNs	50
1.11.3	Mecanismos de acción de los miARN	53
1.11.4	Regulación de la expresión de los miARNs	56
1.11.5	MiARNs y alteraciones en cáncer	57
1.11.6	Los microARNs como oncogenes	59
1.11.7	Los microARNs como supresores de tumores	60

1.11.8	<u>Los microARNs y vías de señalización en el cáncer</u>	62
1.11.9	<u>Aplicación terapéutica</u>	64
1.11.10	<u>Epigenética en el cáncer de mama</u>	64
<u>2</u>	<u>HIPÓTESIS</u>	67
<u>3</u>	<u>OBJETIVOS</u>	68
3.1	<u>Objetivos Principales</u>	68
3.2	<u>Objetivos Secundarios</u>	68
<u>4</u>	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	70
4.1	<u>Diseño del estudio</u>	70
4.2	<u>Aprobación por parte del Comité Ético del Centro</u>	70
4.3	<u>Selección de Pacientes</u>	71
4.3.1	<u>Criterios de Inclusión</u>	71
4.4	<u>Criterios para la Selección de Muestras</u>	75
4.5	<u>Procesamiento de las Muestras</u>	77
4.5.1	<u>Aislamiento del ARN total</u>	77
4.5.2	<u>Análisis de la calidad del ARN</u>	78
4.5.3	<u>Síntesis de ADNc</u>	78
4.5.4	<u>Cálculos para la cuantificación relativa</u>	80
4.5.5	<u>Análisis Estadístico de los perfiles de expresión de miARNs con valor pronóstico</u>	81
4.5.6	<u>Tratamiento de los Datos en los Perfiles de Expresión Génica con Valor Pronóstico</u>	82
<u>5</u>	<u>RESULTADOS</u>	84
5.1	<u>Desarrollo y Validación de un Modelo con Valor Pronóstico basado en la Expresión de miARNs en cáncer de mama</u>	84
5.1.1	<u>Selección de Pacientes. Características clínico-patológicas</u>	84
5.2	<u>Generación de un Perfil Génico Reducido con Valor Pronóstico</u>	89
5.2.1	<u>Identificación de miARNs medibles en FFPE</u>	89
5.2.2	<u>Selección de miARNs</u>	90

5.2.3	<u>Normalización de la expresión de los miARN</u>	92
5.2.4	<u>Identificación de los mejores housekeeping</u>	92
5.3	<u>Generación de modelos pronósticos</u>	93
5.4	<u>Meta-validación</u>	105
6	<u>DISCUSIÓN</u>	106
6.1	<u>Introducción</u>	106
6.2	<u>Limitaciones del Estudio.</u>	109
6.2.1	<u>Sesgo de selección de los pacientes</u>	109
6.2.2	<u>Sesgo del procedimiento de selección</u>	110
6.2.3	<u>Sesgos de medición</u>	110
6.2.4	<u>Sesgo del tiempo y evolución</u>	111
6.3	<u>Análisis y selección del Perfil de 8 miARN</u>	112
6.4	<u>Perfil de 8 miARNs con valor pronóstico</u>	113
6.5	<u>Meta-validación</u>	116
6.6	<u>Perfil biológico de los componentes del Perfil de 8 miARNs</u>	117
6.6.1	<u>MicroARN-30e ** miR-30e</u>	117
6.6.2	<u>MicroARN-30a ** miR-30a</u>	118
6.6.3	<u>MicroARN-21 ** miR-21</u>	119
6.6.4	<u>MicroARN-210 ** miR-210</u>	123
6.6.5	<u>MicroARN-93 ** miR-93</u>	126
6.6.6	<u>MicroARN-150 ** miR-150</u>	127
6.6.7	<u>MicroARN-99b ** miR-99b</u>	128
6.6.8	<u>MicroARN-572 ** miR-572</u>	128
6.7	<u>Razonamiento biológico del valor pronóstico del perfil de 8 miARNs</u>	129
7	<u>CONCLUSIONES FINALES</u>	135
8	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	136
9	<u>RESUMEN-SUMMARY</u>	155

Lista de Tablas

Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en España	14
Tabla 2. La incidencia global prevista de cáncer en mujeres españolas en el año 2015	15
Tabla 3. Mortalidad por tipo de tumor en Mujeres en España	16
Tabla 4. Prevalencia de tumores a 5 años en España	17
Tabla 5. Histologías seleccionadas de cáncer de mama menos frecuentes	26
Tabla 6. Selectiva descripción de miR y su implicación en el cáncer	58
Tabla 7. Características principales de las pacientes	85
Tabla 8. Tratamientos recibidos	89
Tabla 9. Variables con valor pronóstico	104
Tabla 10. Relación entre la selección de Hallmarks y el perfil de miARNs	130

Lista de Figuras

Figura 1. Evolución de la supervivencia en mujeres con cáncer en España	16
Figura 2. Perfiles Moleculares	36
Figura 3. Representación del programa Adjuvant!online. Se observan las variables que incluye el programa para el cálculo del riesgo	38
Figura 4. Modelo de la función del complejo humano RISC que implica miARN y siARN	55
Figura 5. TaqMan® Human MicroARN Assay Set	77
Figura 6. Platos que permiten 384 ensayos	79
Figura 7. Termociclador ABI PRISM 7900 HT	80
Figura 8. Presencia de carcinoma in situ en la muestra	86
Figura 9. Expresión de Ki-67 por IHQ	87
Figura 10. Subgrupos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo	87
Figura 11. Número de veces detectado los miARNs en las muestras de FFPE	90
Figura 12. Representación de la correlación entre las muestras de FFPE y FF	91
Figura 13. Representación del coeficiente de variación en FFPE	91
Figura 14. Modelo que muestra la correlación entre FF y FFPE dependiendo del número de housekeepings	93
Figura 15. Análisis de supervivencia libre de enfermedad (SLE) para toda la población en función del perfil de 8 miARNs	95
Figura 16. Análisis de supervivencia global para toda la población en función del perfil de 8 miARNs. Curvas de Kaplan-Meier para la población completa	96
Figura 17. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en la población Luminal A	97
Figura 18. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con fenotipo Luminal B	98
Figura 19. Análisis de la SLE en función del Perfil de 8 miARNs en pacientes sin expresión del receptor estrogénico	99
	10

Figura 20. Representa la Supervivencia libre de enfermedad para la población HER2-	100
Figura 21. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con fenotipo triple negativo	101
Figura 22. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes HER2+	102
Figura 23. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con RE+ y HER2+	103
Figura 24. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con RE- y HER2+	104
Figura 25. Representa el análisis de la supervivencia libre en la población de validación con RE+	105
Figura 26. Esquema genómico del miR30e (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	117
Figura 27. Esquema genómico del miR 30-a (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	118
Figura 28. Esquema genómico del <i>miR-21</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	120
Figura 29. Esquema de la implicación del <i>miR-21</i> en la apoptosis	120
Figura 30. Esquema genómico del <i>miR-210</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	123
Figura 31. Esquema genómico del <i>miR-93</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	126
Figura 32. Esquema genómico del <i>miR-150</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	127
Figura 33. Esquema genómico del <i>miR-99b</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	128
Figura 34. Esquema genómico del <i>miR-572</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)	129
Figura 35. Esquema de sondas de degradación	183
Figura 36. Curva estándar con los datos emitidos por la fluorescencia.	184

1 Introducción: Cáncer de mama

1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las enfermedades de mayor trascendencia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. En España, es la segunda causa de muerte por detrás de las enfermedades cardiovasculares, y es por tanto un problema grave de salud pública (1). Un 30% de los varones y un 25% de las mujeres serán diagnosticadas de cáncer a lo largo de su vida. La incidencia del cáncer aumenta gradualmente en España, pero también desciende su mortalidad, lo cual muestra el progreso en el manejo integral, el avance en los tratamientos y mejoras en diagnóstico precoz y cribado. Por otro lado, el continuo envejecimiento de nuestra población y el aumento de la supervivencia de los enfermos de cáncer conllevan un incremento significativo de la prevalencia de esta enfermedad (2).

Para la preparación de este capítulo se han examinado los datos de informes presentados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (3) que usaron diferentes fuentes: los datos de incidencia que regularmente facilitan GLOBOCAN¹ (5) y la Agencia Internacional del Cáncer (IARC) (5), uno de los órganos englobados dentro de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las estimaciones de GLOBOCAN que se presentan regularmente, aportaban información estratificada por sexo, y reportan la incidencia y mortalidad por grupos de edad. Los datos de prevalencia proporcionados incluyen exclusivamente población >15 años.

¹ El proyecto GLOBOCAN tiene como objetivo proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia de la mortalidad y la prevalencia de los principales tipos de cáncer, a nivel nacional, para 184

La fuente de información sobre la población española estimada para el año 2015 proviene de datos aportados por el Instituto Nacional de Estadística (INE). Los datos de mortalidad y de evolución de la mortalidad provienen del registro que facilita el Centro de Epidemiología del Instituto Carlos III, y que obtiene de los certificados de defunción. La prevalencia a 5 años, también es obtenida a partir de los datos generados por GLOBOCAN. Finalmente, los datos de prevalencia total de cáncer en España, provienen de los cálculos realizados por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI). Esta información se obtiene a partir del cálculo la estimación de la prevalencia total de cáncer en Estados Unidos.

1.2 Cáncer en el Mundo

El cáncer representa una de las principales causas de muerte en el mundo; en 2008 supuso más de 7,5 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total de muertes). Los tumores a los que más mortalidad se atribuye cada año son recurrentemente, los cánceres de pulmón, estómago, hepatocarcinoma, colorrectal y mama. Hasta un tercio de las defunciones por cáncer se producen debido a factores de riesgo que son evitables – sociales o relacionados con la dieta –: baja actividad física, elevado índice de masa corporal, escaso consumo de frutas y verduras, tabaquismo y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, y es la causa de casi la cuarta parte de las muertes mundiales por cáncer en general, y cerca del 75% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón. Los cánceres producidos o asociados a infecciones víricas, incluyendo virus de las hepatitis B (VHB), C (VHC), virus de Epstein-Barr (VEB) o papilomavirus humanos (PVH), son responsables de hasta una de cada cinco muertes por cáncer en los países con bajos o medios ingresos. La previsión de la OMS, es que las muertes por cáncer continúen creciendo en todo el mundo y excedan la cifra de 13 millones en 2030 (*Fuente: OMS).

1.3 Cáncer en España

En España, en el año 2012 se diagnosticaron cerca de 216.000 cánceres excluyendo los tumores de piel no melanoma. El cáncer más frecuente fue el colorrectal, seguido del de próstata y pulmón. El cáncer de mama fue el cuarto con mayor incidencia considerando la población general (**Tabla 1**).

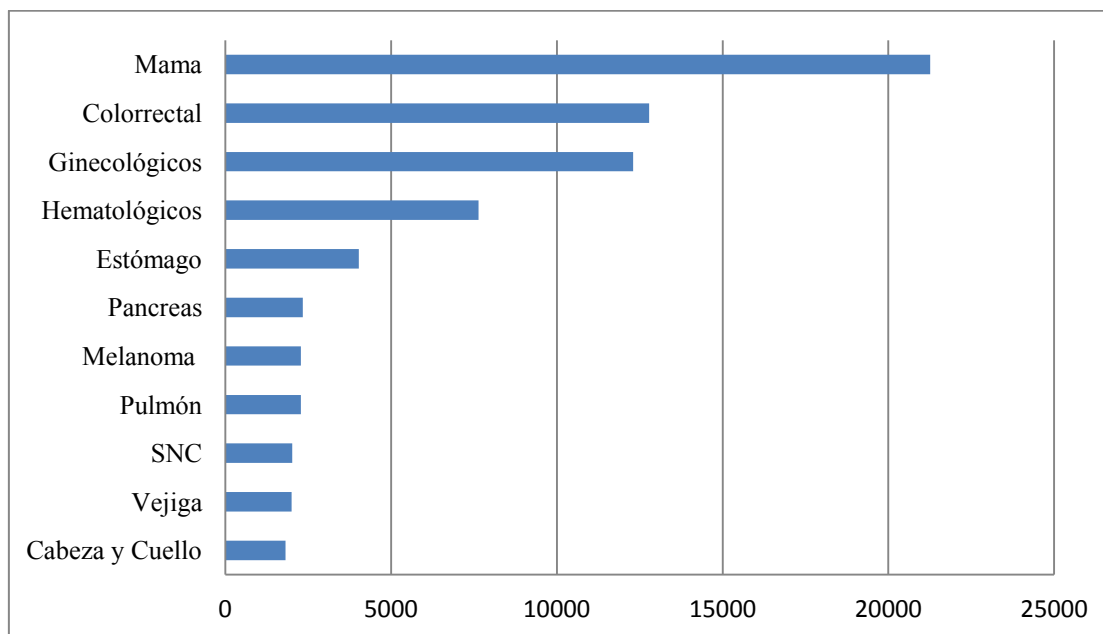
Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en España. Selección de tumores más frecuentes (datos de Globocam, 2012)

Tipo de Cáncer	Incidencia		Mortalidad	
	Número	Ratio/100.000hab	Número	Ratio/100.000hab
Colorrectal	32240	33.1	14700	12.3
Próstata	27853	65.2	5481	8.6
Pulmón	26715	30.3	21118	22.8
Mama	25215	67.3	6075	11.9
Hígado	5522	5.9	4536	4.3
Páncreas	6367	6.3	5720	5.5
Melanoma cutáneo	5004	6.9	967	1.0
Ovario	3236	7.7	1878	3.7
Todos los cánceres excluidos los cánceres de piel no melanoma	215534	249.1	102762	98.1

En España, la incidencia global de cáncer estimada en el año 2015 es de más de 222.000 casos (136.961 hombres y 85.108 mujeres); el tumor más frecuentemente diagnosticado será el cáncer colorrectal, seguido del cáncer de pulmón, mama e hígado. En varones, la incidencia global de cáncer estimada para el año 2015 es de ~137.000 casos (en los tumores de piel, los únicos tumores que se contabilizan son los melanomas). El cáncer de pulmón será el tipo de tumor más frecuentemente diagnosticado en los varones. Los diagnósticos tumorales con mayor frecuencia después del cáncer de pulmón serán el cáncer de próstata, colorrectal y el de vejiga.

La incidencia global pronosticada de cáncer en mujeres españolas en el año 2015 es de ~85.000 casos. En mujeres, el tumor con mayor incidencia es el de mama, colorrectal y los tumores ginecológicos, incluyendo tumores de útero, cáncer de ovario, trompas de Falopio y cáncer de cérvix (**Tabla 2**).

Tabla 2. La incidencia global estimada de cáncer en mujeres españolas en el año 2015. Fuente: GLOBOCAN. <http://www.dep-iarc.fr>. Datos que han sido extrapolados para la población estimada en el año 2015 en España por el INE.



El estudio Eurocare 4 (6) publica datos de supervivencia a 5 años en países europeos de pacientes diagnosticados entre 1995-99 y seguidos hasta el final de 2003. La supervivencia en las mujeres españolas con cáncer en general, según el estudio EURO-CARE, mostró un declive durante finales de los años 90, aunque en el periodo 2000-2002 se obtuvo una supervivencia de un 59% (**Figura 1**). La supervivencia global en el cáncer de mama en las últimas dos décadas se ha incrementado paulatinamente hasta situarse cerca del 83%.

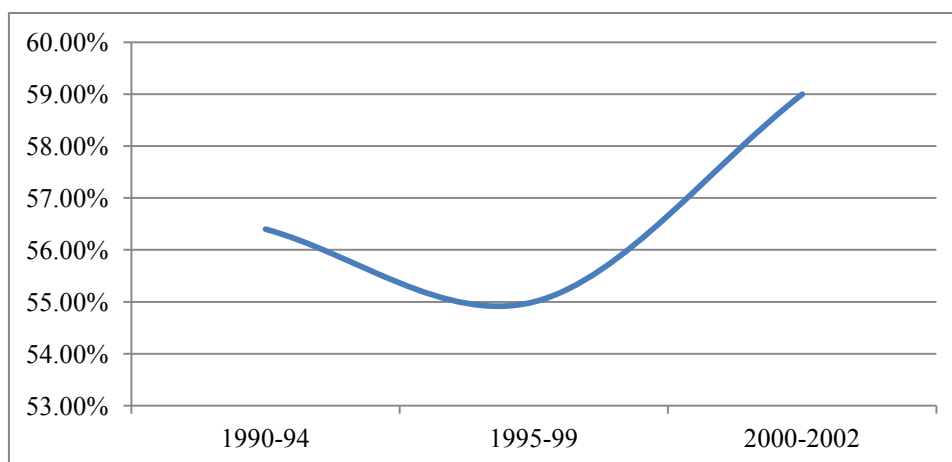
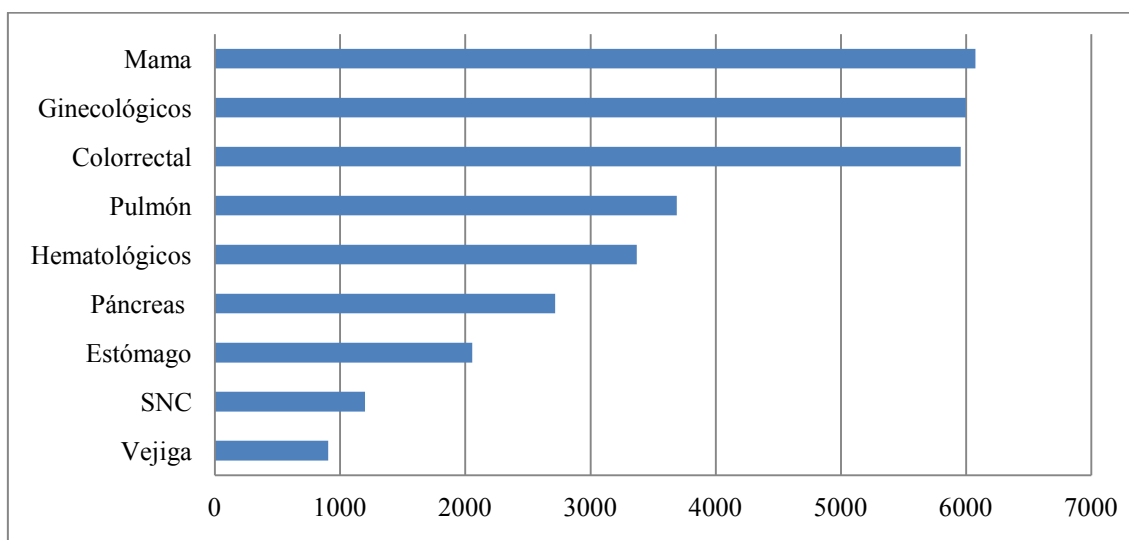


Figura 1. Evolución de la supervivencia en mujeres con cáncer en España (4)

Mortalidad por tipo de tumor en España

En España, el cáncer representa la primera causa de muerte en varones y la segunda en mujeres (cuando se analiza este dato las enfermedades cardiovasculares son considera como un único grupo, no sólo cardiopatías isquémicas) lo que supone la cuarta parte de las muertes de la población española. Sin embargo, el riesgo de mortalidad por cáncer ha ido paulatinamente disminuyendo desde 1990 hasta 2012. En las mujeres, el tumor que más muertes ocasiona es el de mama, el cáncer colorrectal y los ginecológicos (**Tabla 3**).

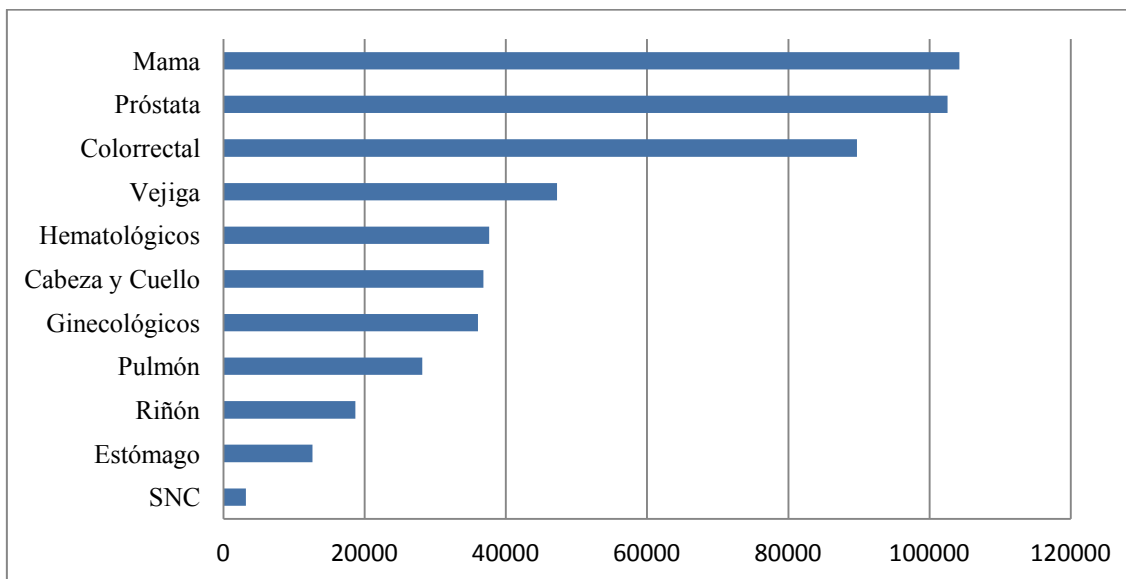
Tabla 3. Mortalidad por tipo de tumor en Mujeres en España (2012)



Prevalencia del cáncer en España

La prevalencia del cáncer (excluyendo tumores de piel que son contabilizados, salvo el melanoma) en España a 5 años es de 581.000; el tumor más prevalente globalmente es el tumor de mama y después próstata, colorrectal, vejiga, y hematológicos (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de tumores a 5 años en España (2012)



Fuente: Globocan 2012. IARC (<http://www-dep.iarc.fr/>).

1.4 Cáncer de mama en España

En España, en el año 2012 la tasa de incidencia de cáncer de mama fue de 67 casos de cada 100.000 habitantes. La incidencia global fue de 25215 casos (Tabla 1) y la mortalidad de aproximadamente 6.000 mujeres (Tabla 3). La prevalencia a 5 años representa aproximadamente 100.000 mujeres con cáncer de mama. Se calcula que el 5% de las mujeres desarrollará cáncer de mama antes de los 75 años, y entre las mujeres españolas representa la segunda causa más frecuente de muerte.

Un aspecto importante que no se debe olvidar es el impacto económico, social y sanitario del cáncer de mama en España, dado el número cada vez mayor de casos incidentes y de supervivientes. Este impacto se traduce en forma de costes asociados direc-

tos e indirectos. Los costes directos están determinados por la asistencia intrahospitalaria y los costes de los fármacos que representan alrededor del 15-20 % del gasto sanitario total para el cáncer. Los costes indirectos también son un aspecto substancial, ya que incluyen la pérdida asociada de productividad de las pacientes y en ocasiones de sus familias, lo que puede suponer una carga significativa para la sociedad española.

1.5 Factores de riesgo de cáncer de mama

Los factores de riesgo en el cáncer de mama están bien establecidos. Sin embargo, en la mayoría de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama no es posible identificar factores de riesgo específicos (6).

1. **Sexo.** El cáncer de mama en el hombre es extremadamente raro, su incidencia se estima en <1 por 100 000 hombres-año. Supone, aproximadamente, el 1% del cáncer de mama (8).
2. **Edad.** El envejecimiento es el segundo factor de riesgo en importancia. La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad, duplicándose cada 10 años hasta la menopausia (6).
3. **Factores hormonales naturales: menarquia, menopausia, embarazo y lactancia.** Los estudios epidemiológicos a gran escala sugieren que a mayor tiempo de exposición a estrógenos, mayor riesgo de cáncer de mama. El retraso en la menarquia se comporta como un factor protector (8). El embarazo y la lactancia reducen la cantidad total de ciclos menstruales en la vida de una mujer, y esto parece reducir el riesgo de cáncer de mama en el futuro (10). La ooforectomía bilateral antes de los 40 años disminuía el riesgo de cáncer de mama hasta un 45% cuando se comparaba con las mujeres que tenían menopausia entre los 50 y 54 años (11).
4. **Exposición hormonal exógena:** una de las acciones del estrógeno en las mujeres es la estimulación del crecimiento de las células mamarias. La exposición a estrógenos

durante períodos continuados aumenta el riesgo de cáncer de mama (12). **Uso de anticonceptivos orales.** El uso de anticonceptivos orales parece aumentar levemente el riesgo de desarrollar cáncer de mama, pero solo durante un período limitado de tiempo. A pesar de ello, la mayoría de los estudios no han demostrado aumento del riesgo del cáncer de mama (12,13). Por otro lado el uso de terapias de reemplazo hormonal combinadas (estrógeno y progesterona; TRH) durante varios años, o el uso de estrógeno en monoterapia durante más de 10 años aumentan el riesgo de cáncer de mama (14).

5. Antecedentes familiares. Aunque la historia familiar de cáncer de mama es un factor de riesgo establecido, sólo un 10% de los nuevos cánceres de mama diagnosticados tienen una historia familiar positiva (15).

6. Mutaciones genéticas. Se estima que la presencia de mutaciones específicas en el cáncer de mama representa entre un 5% y 10% de los casos (15). En las pacientes con historia familiar sugestiva de predisposición hereditaria se identifica un específico gen en menos del 30% de los casos (16). Las mutaciones más frecuentemente estudiadas son BRCA1 (BReast CAncer) y BRCA2 aunque existen muchas otras mutaciones como p53, PTEN, CDH1, MLH1, MLHT2 o STK11 (17). El gen BRCA1 fue clonado por primera vez en 1994 (18) y codifica una fosfoproteína nuclear que juega un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica, actuando también como un supresor de tumores (19). La proteína codificada se combina con otros supresores tumorales, sensores de daño celular en el ADN, y transductores de señal para formar un gran complejo de proteínas de múltiples subunidades conocido como el complejo de vigilancia del genoma BRCA1-(BASC). Las mutaciones en este gen son responsables de aproximadamente el 40% de los cánceres de mama heredados y más del 80% de cáncer de mama hereditario y cánceres de ovario (20). El

80% de los tumores BRCA1 mutados son basal-like, sin embargo la mayoría de los tumores basal-like son esporádicos y el gen y la proteína BRCA1 son normales (21).

7. **Peso.** El sobrepeso supone un riesgo elevado de cáncer de mama(22), en especial para mujeres postmenopáusicas (23).
8. **Consumo de alcohol.** Algunos estudios han indicado que el riesgo de cáncer de mama aumenta en relación con la cantidad de alcohol que consume una mujer (24). Sin embargo, esta relación no está claramente establecida por el momento (25,26).
9. **Tabaquismo.** Algunos estudios epidemiológicos sugieren un aumento leve del riesgo de cáncer de mama en mujeres fumadoras (27).
10. **Estrés y ansiedad.** No existen estudios sólidos que evidencien que el estrés y la aumentan el riesgo de cáncer de mama. Un metaanálisis publicado en 2013 con datos de 116.000 pacientes de 12 cohortes y 5700 casos de cáncer concluyó que el estrés no es un factor importante en el desarrollo de cáncer de colon, pulmón, próstata o mama (28).
11. **Radioterapia previa en la región torácica.** El mayor riesgo se da cuando la radiación se aplica durante la etapa de desarrollo de las mamas (29).
12. **Densidad mamaria.** La densidad mamaria se ha descrito como factor de riesgo en todos los subgrupos, pero particularmente en tumores de gran tamaño y con afectación axilar; sin embargo, esta asociación puede estar afectada por la dificultad para detectar estos tumores en fases precoces mediante técnicas de imagen de cribado. Este factor es de especial interés en pacientes jóvenes (30).

1.6 Prevención del cáncer de mama

La prevención es uno de los más indispensables aspectos en la lucha contra el cáncer de mama. Para mujeres con alto riesgo de cáncer de mama (riesgo de cáncer de mama mayor del 50% a lo largo de la vida) hay diferentes posibilidades: la mastectomía

profiláctica reduce al riesgo de desarrollar y morir de cáncer de mama en un 90% en mujeres portadoras de mutación BRCA1/2 (31). Es una opción efectiva pero no se debe olvidar que es una opción dramática e irreversible. Hay otras posibilidades como el screening anual con resonancia magnética (RM) y mamografía, aunque la mastectomía profiláctica es coste-efectiva comparado con vigilancia activa hasta los 70 años (32). Actualmente, la RM de mama demuestra una alta sensibilidad de entorno al 93-100% (33). La Sociedad Americana del Cáncer (ACS) recomienda la revisión con RM de mama como un complemento a la mamografía para las pacientes portadores de mutaciones BRCA y sus familiares de primer grado, las mujeres con un riesgo de cáncer de mama durante la vida superior al 25%, las mujeres con antecedentes de radioterapia en el pecho en edades entre 10 y 30 años y en mujeres con predisposición debido síndromes genéticos (33).

La quimioprevención utiliza fármacos para disminuir el desarrollo de cáncer invasivo de mama. El tamoxifeno reduce un 33% el riesgo relativo de cáncer de mama en mujeres de alto riesgo y el raloxifeno reduce el riesgo de cáncer de mama RE+ en un 50% aproximadamente, también en las mujeres de alto riesgo (34). La quimioprevención debería ser considerada en personas de alto riesgo, sin embargo deben mejorar los análisis coste-beneficio para proporcionar recomendaciones específicas (35). Los estudios actuales se basan en inhibidores de la aromatasas (IA) para prevenir el cáncer en mujeres posmenopáusicas. El exemestano reduce significativamente la incidencia relativa de cáncer de mama invasivo (del 55% al 19%) en mujeres posmenopáusicas con riesgo moderadamente mayor de cáncer de mama (con alguno de los siguientes criterios: mayor o igual a 60 años; riesgo superior al 1,66% en “Gail Score²” a 5 años, hiper-

²Gail Score o Puntuación Gail es un modelo diseñado por investigadores del National Cancer Institute y el NSABP (Proyecto nacional adyuvante a la cirugía de mama e intestino). El modelo calcula el

plasia ductal o lobulillar atípica; carcinoma lobular in situ, o carcinoma ductal in situ con mastectomía) (36).

1.7 Situación actual del tratamiento del cáncer de mama precoz

1.7.1 Cribado

La progresiva implantación de la mamografía en los años 80 y 90 ha permitido detectar tumores de mama de forma precoz y disminuir la mortalidad (37–39). Actualmente nadie duda del beneficio de la mamografía anual entre los 50 y los 69 años. Entre las pacientes entre los 40 y 49 años es más controvertido. Sin embargo, los últimos estudios muestran eficacia similar en estos grupos de edad (40). La mamografía en esta población está recomendado por la ACS, las guías clínicas del cáncer de mama y National Comprehensive Cancer Network (NCCN)³ (41,42). Si las mujeres eligen someterse a la mamografía, deben realizarse un cribado bienal con la mamografía digital (43). Además, debe orientarse el cribado hacia las mujeres de 40-49 años con factores de riesgo que incrementan sustancialmente el riesgo de cáncer de mama, tales como alta densidad de la mama, antecedentes familiares de cáncer de mama, e historia de biopsia de mama benigna, lo que podría maximizar los beneficios y minimizar los daños de la cribado de este grupo de edad. No hay datos que apoyen el cribado en mayores de 70 años, pero requiere individualizar en función de la comorbilidad y esperanza de vida de cada paciente ya que existen pocos datos en esta población (44). Las preferencias de las

riesgo de una mujer de desarrollar cáncer por una mujer en los siguientes 5 años y en una vida (hasta los 90 años). Considera 7 factores: edad, fecha de menarquía, edad de primer parto, historia familiar de cáncer de mama, número de biopsias de mama en el pasado, número de biospias previas con hiperplasia atípica y raza. Mujeres con un riesgo a 5 años mayor de 1.67% son consideradas de alto riesgo. Este es el corte de las guías de la FDA para indicar tamoxifeno o raloxifeno para reducir el riesgo de cáncer de mama.

³ Red nacional (Estados Unidos) integral del cáncer.

mujeres y daños potenciales del cribado por un pequeño aumento de la esperanza de vida deben jugar un papel importante en la decisión acerca de emitir recomendaciones claras al respecto (45).

La RM tiene mayor sensibilidad que la mamografía, pero con menor especificidad para detectar microcalcificaciones. La adicción de RM al screening de población de alto riesgo ha demostrado un beneficio significativo (46). La RM ha demostrado ser más efectiva en el screening secundario de la mama contralateral comparado con la mamografía normal en el momento del diagnóstico inicial (47). Además, el diagnóstico precoz permite un procedimiento quirúrgico mejor al detectar lesiones menores sospechosas de malignidad. Hay que puntualizar que el 20% de los cánceres de mama no son visibles mediante mamografía.

1.7.2 Estadificación (Anexo 1)

La elección del tratamiento depende del estadio y la extensión de la enfermedad. Aunque las decisiones al inicio del manejo del cáncer de mama, como el tratamiento neoadyuvante o la cirugía conservadora dependen del estadio clínico, la comorbilidad y la condición general de las pacientes, son los hallazgos quirúrgicos los que finalmente determinan el estadio patológico y la necesidad y tipo de tratamiento adyuvante. El examen físico es necesario pero necesita ser complementado con técnicas de imagen: aproximadamente un tercio de las mujeres con examen negativo tienen metástasis en el estudio de extensión y un tercio de las mujeres con axila con ganglios palpables son patológicamente negativos.

1.7.3 Factores pronósticos

1.7.3.1 Factores Histológicos Pronósticos

El pronóstico y la evolución clínica del cáncer de mama presentan una gran variabilidad de unas pacientes a otras. Desde hace años se conocen factores pronósticos “clásicos” que determinan la evolución y pronóstico de la enfermedad. Los factores más determinantes en la elección del tratamiento son la edad, afectación axilar, el tamaño tumoral, la expresión de receptores hormonales, la expresión de HER2, el estado ganglionar y el tamaño tumoral.

❖ Tamaño del tumor primario

Numerosos estudios han demostrado que el tamaño de un carcinoma invasivo es uno de los factores pronósticos más importantes (48). Es un factor pronóstico independiente de la afectación axilar y es el principal factor pronóstico en las pacientes con afectación axilar negativa. El cribado sistémico ofrece la posibilidad de reducir el tamaño de los tumores al diagnóstico y reducir la muerte por carcinoma de mama en todas las edades (49,50). La rigurosidad en la medida del tamaño es esencial para el manejo posterior. Los primeros estudios no fueron homogéneos pero actualmente se define como tamaño tumoral únicamente el componente invasivo (51).

❖ Estado ganglionar

Desde 1960, se ha aceptado que cuánto más grande es el tamaño del cáncer de mama invasivo, mayor es la probabilidad de que los ganglios linfáticos axilares sean positivos y las tasas de recurrencia y de mortalidad sean mayores. Los datos que dieron origen a esa conclusión se obtuvieron cuando el 80-85% de los cánceres de mama se detectaban por examen físico y eran mayores de 2 cm (52).

La extensión del cáncer de mama a los ganglios axilares predice el riesgo de extensión a distancia y de recurrencia local. Es el factor pronóstico individual más im-

portante en el cáncer de mama localizado, y actualmente implica que la práctica totalidad de las mujeres con afectación axilar después de un tratamiento local deben recibir un tratamiento adyuvante sistémico. La evidencia del beneficio de la quimioterapia adyuvante sistémica en pacientes con cáncer de mama con ganglios linfáticos axilares positivos se demostró en la década de los 70 (53,54). La disección axilar se considera desde hace muchos años como un procedimiento excelente para protocolizar el cáncer de mama, y como control quirúrgico de la enfermedad regional (55,56). Además, la realización de biopsia del ganglio centinela (primer o más cercano ganglio donde drena el tumor) es el estándar para la estratificación en pacientes con cáncer de mama clínicamente negativo evitando la disección axilar completa (40). La información que aporta la afectación axilar es importante para definir el pronóstico e individualizar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

❖ Histología

El subtipo histológico determina en gran medida el pronóstico del cáncer de mama. Hay varios tipos de histología en el cáncer de mama.

Carcinoma in situ.

Las células tumorales se encuentran dentro del ducto o el lobulillo sin invadir la membrana basal. El término carcinoma ductal in situ (CDIS) representa un grupo heterogéneo de lesiones que difieren en su presentación clínica, aspecto histológico, y el potencial biológico (57). El CDIS se caracteriza por la proliferación de las células epiteliales malignas dentro del sistema ductal mamario, sin evidencia de invasión en el estroma circundante al examen microscópico.

Carcinoma Invasivos

El carcinoma invasivo de mama representa un grupo heterogéneo de lesiones que difieren en la presentación clínica, radiológicas, características patológicas y el po-

tencial biológico. La clasificación más ampliamente utilizada es la de la World Health Organization (WHO) (58).

Ductal (57): El cáncer ductal infiltrante o invasor es el tipo histológico más frecuente de cáncer de mama que se presenta y abarca entre 70 y 80% de todos los casos.

Lobulillar (59): Es la segunda histología más frecuente. Representa aproximadamente el 10% de los tumores infiltrantes.

Otras histologías menos frecuentes se presentan resumidas en la **Tabla 5** (60).

Tabla 5. Histologías seleccionadas de cáncer de mama menos frecuentes

Tipo	Características	Frecuencia	Pronóstico
Mucinoso	Pacientes mayores Crecimiento de células tumores en una sustancia mucinosa	1-2%	Favorable
Tubular	Células formando estructuras glandulares o tubulares	2%	Favorable
Medular	Asociados a infiltración linfocitaria Asociados a mutación BRCA1	1-10%	Favorable
Tubulolobular	Combinación de tumor lobulillar infiltrante y tubular	--	

❖ Grado Histológico

La importancia de la gradación de tumores como factor pronóstico ha sido claramente demostrada en numerosos ensayos clínicos. Los estudios han repetido los mismos datos: los tumores de mama con peor pronóstico son los tumores de más alto grado, es decir los pobremente diferenciados (18). El grado histológico es un factor pronóstico incluso para aquellos tumores <1 centímetro (cm). El sistema de gradación más comúnmente empleado es el de Elston and Ellis que contabiliza las mitosis por campo, el porcentaje de formación tubular y el grado de pleomorfismo nuclear (61). Algunos estudios han sugerido que el grado puede aportar información sobre la respuesta a quimioterapia e incluso ser un factor predictivo de respuesta. Los tumores de mayor grado

suelen tener menor tiempo libre de recaída pero suelen responder mejor a la quimioterapia.

❖ Invasión Linfática

La invasión linfática ha sido validada en diferentes estudios como factor pronóstico independiente. Su valor clínico más importante se da en los tumores con afectación axilar negativa porque podría indicar aquéllos con con peor pronóstico (62).

❖ Otros Factores (63,64)

La invasión de vasos sanguíneos, la necrosis tumoral, el infiltrado mononuclear inflamatorio, la extensión del carcinoma ductal in situ asociado o la invasión perineural aunque se asocian a peor pronóstico en diferentes estudios, no son claramente factores pronósticos independientes.

1.7.3.2 Factores moleculares pronósticos

Un factor pronóstico es cualquier parámetro medible disponible en el momento de la cirugía que se correlaciona con el tiempo libre de enfermedad o con la supervivencia global después del tratamiento local. Por lo tanto, es indicativo de la biología inherente a cada tumor. En contraste un factor predictivo de respuesta es aquel que indica el comportamiento que tendrá un tumor ante un determinado tratamiento. Es importante remarcar que ser un factor pronóstico no excluye ser predictivo como ocurre con el receptor de estrógenos (RE), progesterona (RP) y HER2 entre otros factores.

❖ Receptores Hormonales (65)

El RE y el RP pertenecen a una familia de receptores hormonales nucleares que actúan como factores de transcripción cuando se unen a sus respectivos ligandos, y pueden ser utilizados como factores pronósticos y predictivos.

Inicialmente se demostró que tanto RE como RP eran factores predictivos de respuesta al tratamiento hormonal en la enfermedad avanzada (66). El meta-análisis de

Oxford (2000-2005) que incluye datos de más de 48,000 pacientes en 56 ensayos clínicos con tamoxifeno y con un seguimiento de 15-20 años, establece con rigurosidad que el RE es un factor predictivo del beneficio a 5 años del tratamiento en adyuvancia con tamoxifeno (67).

Los receptores hormonales, además de ser factores predictivos de respuesta al tamoxifeno, predicen una respuesta positiva al tratamiento con IA en mujeres postmenopáusicas (68,69). Los receptores hormonales son, además, un factor predictivo de no respuesta a quimioterapia. Los estudios de neoadyuvancia han confirmado que la presencia de RE o RP representa un factor predictivo de una menor respuesta patológica al tratamiento con quimioterapia (70), aunque no queda establecido que la respuesta patológica completa (pCR) en tumores de proliferación lenta tenga implicación pronóstica. Los datos sugieren que la medida cuantitativa del RE y RP benefician el manejo posterior las pacientes.

En la práctica clínica, el RE es más valorable como factor predictivo pero también puede utilizarse como factor pronóstico. Las tasas de recurrencia en las mujeres con tumores RE+ que no reciben tratamiento sistémico después de la cirugía son muy bajas en comparación con los tumores RE- (71). Desde el trabajo de *Barbara Mason et al.* en 1983, en el que se determinó la expresión de RP y RE de todos los cánceres de mama incidentes entre 1976 y 1980 de la ciudad de Auckland (1.136), se acepta la importancia clínica de la positividad de la expresión de RE y RP; en este estudio se constató que cuando ambos receptores eran positivos, existía una supervivencia significativamente mayor que cuando eran negativos. Dicho efecto se demostró en ausencia de los tratamientos hormonales existentes hoy en día para bloquear la actividad replicativa inducida por esteroides femeninos (72).

❖ Sobreexpresión de HER2

El gen ERBB2 (HER2) codifica para una fosfoproteína p185ERBB2 (73). La proteína ERBB2 es un receptor tirosina quinasa miembro de la familia EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). El gen está localizado en el Cromosoma 17q 21. El gen está amplificado o sobreexpresado en 20-30 % de los carcinomas de mama (73) y en un 80% de los DCIS. La amplificación o sobreexpresión de ERBB2 es un marcador de mal pronóstico en ausencia de tratamiento adyuvante y un importante predictor de respuesta a tratamientos como terapia anti-HER2 y antraciclina. La alteración de ERBB2 ha sido asociada con un aumento de la tasa de metástasis, menor supervivencia libre de recaída y menor supervivencia global. Desde hace más de 25 años se sabe que es un factor pronóstico independiente del estatus nodal, del tamaño tumoral, del grado y del estatus del receptor hormonal (74).

❖ Ki67

Ki67 es una proteína necesaria para la proliferación celular (75). En el cáncer está particularmente asociada con pronóstico en linfomas, mama, tumores neuroendocrinos y en los tumores cerebrales (76). Es comúnmente usado como un complemento a los sistemas de clasificación que incluyen el recuento mitótico como una señal de proliferación (77). Ki67 ha sido extensamente estudiada como biomarcador en cáncer de mama, aunque no está actualmente aceptado como un estándar (78). Ki67 es un excelente biomarcador candidato para seleccionar tumores luminal B por técnicas de inmunohistoquímica (79,80).

Diferentes estudios han demostrado que se puede realizar una precisa subtipificación biológica mediante el uso de un panel inmunohistoquímico de cuatro biomarcadores: RE, RP, HER2, y Ki67 (81,82). Aunque el punto de corte de Ki67 es contradictorio, 14% es quizá el valor más utilizado como referencia entre los subtipos luminal A y

luminal B (78,79,82). El Consenso Internacional “St. Gallen” de expertos sobre el tratamiento primario de cáncer de mama precoz, en 2013 definió el valor >20% como indicativo de alto Ki67 (81).

1.8 Clasificación molecular del cáncer de mama

1.8.1 Perfiles de expresión genética y clasificación pronóstica

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con fenotipos diferentes y bien caracterizados. Se ha avanzado mucho desde la identificación empírica de la dependencia hormonal hace más de 100 años (83), hasta la identificación de los perfiles génicos. En nuestros días, sabemos que el cáncer de mama se compone de muchos subtipos biológicos con comportamientos y respuesta a tratamientos muy dispares (84,85). A pesar de ello, la hormonoterapia sigue siendo el hito más importante en la historia del tratamiento del carcinoma de mama. La incorporación de la información molecular basada en la expresión génica del tumor junto a la información procedente de factores convencionales como el grado y subtipo histológico, inmunohistoquímica y la sobreexpresión de HER2, definen subtipos intrínsecos que predicen la evolución clínica y la respuesta a los diferentes tratamientos. La heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama y el elevado número de genes controlando el crecimiento, la muerte y la diferenciación celular entre otros procesos, sirve para enfatizar la importancia de estudiar las múltiples alteraciones moleculares que definirán la evolución de cada tipo de cáncer de mama.

A finales de los años 80, se desarrolló una revolucionaria tecnología para la cuantificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en muestras procedentes de tumores. Esta tecnología desembocó en la primera plataforma de microarrays de ADN (74).

Estos arrays⁴ de expresión han supuesto un gran hito en el conocimiento molecular en el cáncer: miden el nivel de expresión de un grupo de genes de forma semicuantitativa determinando el nivel de ácido ribonucleico (ARNm) mensajero que se compara con genes de referencia. Una vez identificado el perfil, más o menos limitado a un número concreto de genes, puede ser utilizado para categorizar un tumor. En los últimos años los patrones de expresión de genes mediante análisis de microarrays han proporcionado un camino para mejorar el diagnóstico y estratificación de muchos tumores (87). El desarrollo de las secuenciación masiva (de todo el material genético, incluyendo exoma y transcriptoma) probablemente termine por definir las alteraciones genéticas del cáncer de mama.

1.8.2 Subtipos de Cáncer de Mama

Los estudios de expresión génica han identificado diferentes subtipos de cáncer de mama (88). Estos incluyen 2 subtipos de cáncer de mama con RE positivo: luminal A y luminal B; y 2 subtipos de cáncer de mama con RE negativo (basal-like y fenotipo HER2). Estos subtipos difieren marcadamente en pronóstico y tratamiento. La lista de genes que diferencian estos subtipos se llama lista intrínseca y se realizó con el análisis de muchos grupos de genes que relacionan la expresión de RE (clúster luminal), expresión HER2, proliferación, y un único clúster de genes llamados “clúster basal”. El patrón de expresión de genes y el clúster están disponibles de forma pública (88).

Los subtipos intrínsecos se dividen en 2 grupos que se corresponden con la expresión de los genes relacionados con el receptor hormonal (88). Se denominan fenotipos luminales porque se caracterizan por la expresión de genes que también se expresan

⁴ Matriz sobre un sustrato sólido que permite analizar de forma simultánea miles de ensayos que buscan conocer la estructura y el funcionamiento genético. No existe un estándar en microarrays de ADN.

en el epitelio luminal normal de la mama, y se superponen con la expresión de genes en tumores de mama RE+. Hay otros subtipos caracterizados por la baja expresión de RE (RE negativo), uno de ellos es el fenotipo HER2/RE-, y otro “basal like” llamado así porque expresan muchos genes de las células epiteliales basales de la mama normal.

Los diferentes subtipos fueron identificados usando el análisis de subgrupos de datos de expresión génica en tejido congelado. Esto dificultó inicialmente la adaptación y reproducibilidad de los subtipos en la práctica clínica habitual porque la mayor parte del tejido tumoral está fijado en parafina⁵.

Subtipos luminales. Típicamente expresan citoqueratinas 8 y 18. Estos son los subtipos más frecuentes y se caracterizan por la expresión de RE, RP y otros genes asociados con la activación de RE. En términos generales, se divide en subtipo Luminal A y B.

El subtipo Luminal A, representa aproximadamente el 40% de los tumores. Normalmente son tumores con alta expresión de los genes relacionados con RE, baja expresión de los genes relacionados con HER2, y baja expresión de genes relacionados con la proliferación (89,90). Representa el subtipo de mejor pronóstico.

El subtipo Luminal B, representa el 20% de los tumores, con menor expresión de genes relacionados con RE, variable expresión de los genes HER2, y alta expresión de los genes de proliferación. Implica peor pronóstico que el subtipo Luminal A (91), con un mayor riesgo de recurrencia local y a distancia.

⁵ La fijación en parafina habitualmente se realiza con formol al 4-10%, posteriormente se deshidrata con alcoholes y finalmente se usa una parafina líquida caliente (56°). El objetivo último de la fijación es evitar la autólisis.

El subtipo HER2, representa el 10-15% de los tumores de mama y se caracteriza por la alta expresión de HER2 y genes de proliferación, y baja expresión de genes relacionados con el RE. Por esta razón, estos tumores son típicamente negativos para RE, RP y positivos para HER2. El gen HER2, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17. Se descubrió y se clonó en 1983; además se demostró que es un miembro de la familia EGFR (92). La amplificación (un exceso en el número de copias de genes) o la sobreexpresión (exceso de producción de proteínas) de HER2 confiere a las células rasgos de un comportamiento más agresivo, incluyendo el aumento del crecimiento y de la proliferación celular, el aumento de la capacidad invasiva y metastásica, y la estimulación de la angiogénesis. Este subtipo, sólo implica la mitad de los cánceres de mama con expresión y/o amplificación de HER2+ (la otra mitad corresponde a subtipo luminal B con RE+ y fenotipo HER2). La presencia de HER2 implica un peor pronóstico (93) pero gracias al desarrollo de terapias anti-HER2, actualmente, tiene más importancia como factor predictivo de respuesta. De hecho, en 2001 se publicó el primer estudio demostrando que trastuzumab⁶ aumentaba la supervivencia en combinación con quimioterapia en pacientes que tenían sobreexpresión de HER2 en cáncer de mama metastásico (94). Posteriormente, se confirmó también su beneficio en adyuvancia con reducción de las tasas de recurrencia y muerte (95,96). Existen varios estudios que han valorado el papel del tratamiento adyuvante con trastuzumab en cáncer de mama precoz HER2+: el estudio HERA (NCT000450329) (97), los estudios NCCTG N9831 (NCT00005970) y NSAPB B31 (NCT00004067) (98), y el estudio BCIRG 006 (NCT00021255) (99); todos ellos han demostrado una reducción del riesgo de recidiva y muerte por cáncer de mama de alrededor del 40%.

⁶ Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

El subtipo basal-like, se denomina así por la semejanza con la expresión de las células epiteliales basales. Representa el 15% de los tumores de mama (100). Se caracteriza por la escasa expresión de genes luminales y genes relacionados con HER2. Son típicamente triple negativos (ausencia de expresión del RE, RP y HER2) aunque pueden expresar RE y sobreexpresar HER2 (101). El subtipo basal-like se relaciona con la mutación en el gen BRCA1. El subtipo basal-like también se relaciona con la edad y la raza: estudios poblacionales sugieren una mayor incidencia en mujeres premenopáusicas y afroamericanas (102,103). Este subtipo, implica un peor pronóstico aunque presenta una mayor sensibilidad a la quimioterapia (104). La ausencia de terapia biológica dirigida, representa un serio obstáculo en el tratamiento de este subtipo de tumores. Sólo el 77% de los cánceres de mama basal-like son triple negativo, y un 71-91% de los tumores de fenotipo triple negativo son tipo basal-like (105). Se debe enfatizar en el hecho de que aunque los cánceres de mama triple negativo y basal-like se superponen parcialmente, representan diferentes clasificaciones. Utilizando perfiles de expresión génica y mediante herramientas bioinformáticas se han descrito al menos 5 diferentes subtipos biológicamente distintos (106,107) el grupo triple negativo de cáncer de mama no es una entidad homogénea, y sin embargo, una fracción sustancial de estos tumores pertenece al tipo de tumor de tipo basal-like, lo cual sí forma un grupo homogéneo.

En estudios recientes se ha descrito un nuevo subtipo “claudin-low” que se caracteriza por la expresión de genes de transición epitelio-mesénquima, ausencia de genes luminales, genes de respuesta inmune y presencia de características reminiscentes de células pluripotenciales (108). Presentan elevada expresión de genes de proliferación, suelen ser de alto grado y suelen evidenciar inestabilidad genómica incluso en la enfermedad precoz. Además, este subtipo presenta alta expresión de EGFR, y del conjunto de genes del subtipo basal que incluye citoqueratinas (CK) 5,14 y 17. Clínicamente, la

mayoría son RE-, RP- y HER2- . Con alta frecuencia son carcinomas ductales invasivos con diferenciación metaplásica y medular. También tienen una tasa de respuesta a la quimioterapia intermedia entre la del tipo basal y los tumores luminales (109).

1.8.3 Perfiles de expresión molecular

En los microarrays de expresión, el nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana se indica habitualmente mediante fluorescencia y se mide por análisis de imagen, posibilitando la cuantificación de los genes en la muestra. Desde su creación, la tecnología de microarrays ha proporcionado una poderosa herramienta para la comunidad científica debido a su capacidad para medir simultáneamente la expresión de decenas de miles de genes. En particular, la investigación y el desarrollo terapéutico del cáncer de mama ha sido testigo de grandes beneficios gracias a esta tecnología. Existen muchos estudios que describen los patrones de expresión de múltiples genes asociados a las subclases de diagnóstico y pronóstico (84,110,111). Estos estudios, también han establecido la capacidad de predecir la respuesta a tratamientos basado en los patrones de expresión génica del tumor (112).

En el año 2000, *Perou et al.* (84) comunica por primera vez cómo la diversidad fenotípica de los tumores de cáncer de mama se corresponde con la diversidad en los patrones de expresión genética. Esto fue demostrado mediante estudios de microarrays de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Este estudio, y otros posteriores ayudaron a perfeccionar la descripción de la taxonomía molecular en el cáncer de mama (**Figura 2**).

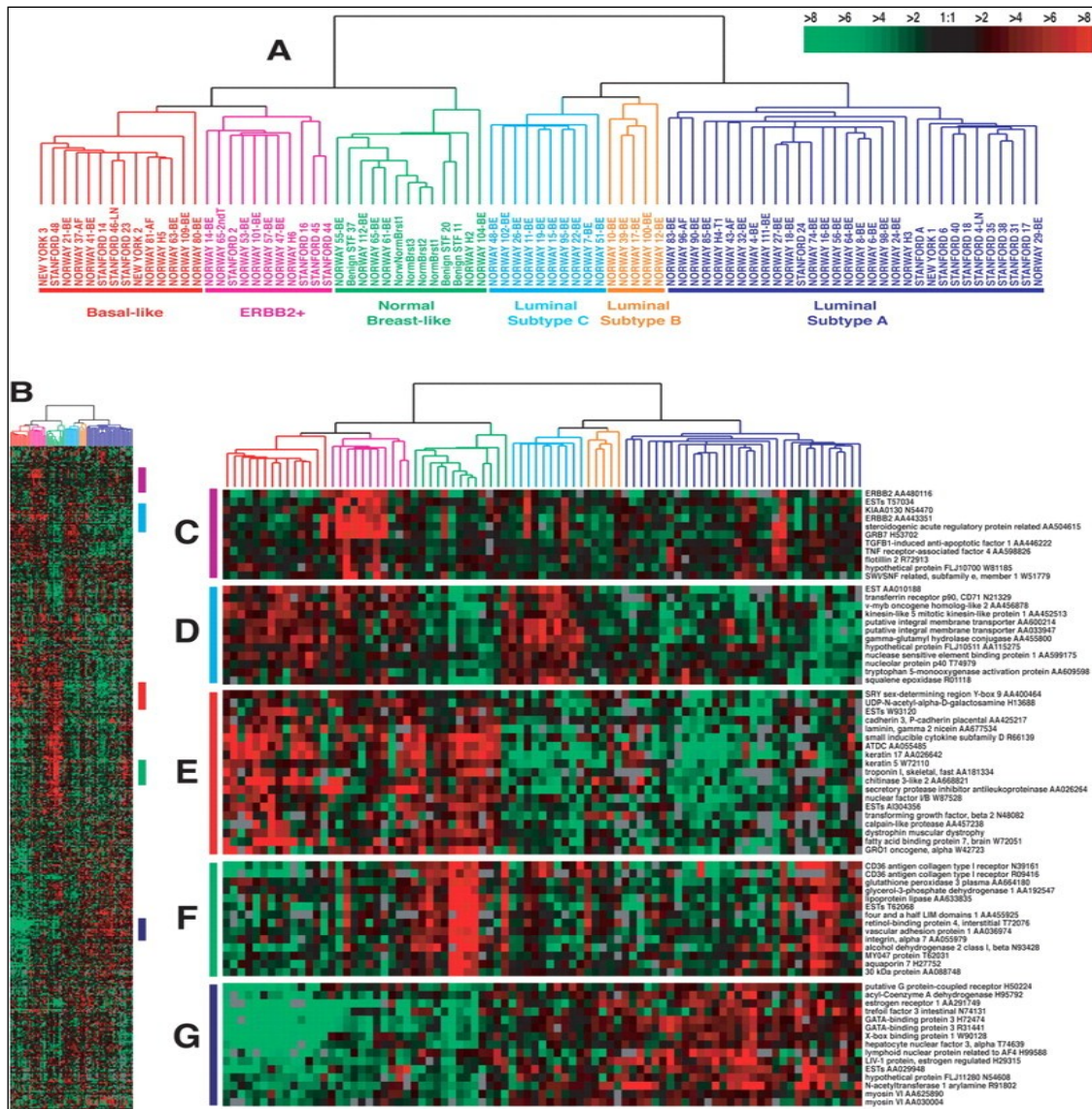


Figura 2. Perfiles Moleculares (111). Los datos se presentan en un formato de matriz. Cada fila representa un gen y las columnas son cada una de las muestras analizadas. En cada muestra se representa la expresión de cada gen en función de la mediana de las muestras, de forma que si la expresión está por encima de la mediana se muestra en rojo, igual en negro y por debajo en verde. Existen algunos cuadrados grises que representan que los datos estaban incompletos o ausentes.

Aún es necesario asegurar una adecuada adaptación clínica de estos patrones génicos. Es imprescindible determinar los factores que pueden influir en la precisión y la exactitud de los microarrays realizados en los diferentes estudios. Entre estos factores

destaca la variabilidad de las mediciones de la expresión de genes, que se puede ser debida a la técnica (intrínseca a la plataforma), o preanalítica (intrínseca a la muestra). Por ejemplo, el Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus plataforma de 2,0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA), tiene un alto grado de reproducibilidad y la variación técnica es baja según lo analizado por diferentes grupos (113,114). Controlar la variación intrínseca es más difícil, sobre todo teniendo en cuenta que en los tejidos tumorales sólidos predomina la heterogeneidad intratumoral, lo que puede resultar fácilmente en un sesgo de muestreo. El efecto de la heterogeneidad del tumor en los ensayos basados en microarrays se ha evaluado en algunos tipos de cáncer (115). Sin embargo, existen estudios que certifican que la heterogeneidad entre tumores es mayor que la intratumoral y que ésta suele presentar un nivel de expresión baja que puede ser filtrada para evitar el sesgo.

El 80% de los tumores de mama se diagnostican en estadios precoces y curables, sin embargo todos tienen cierto riesgo de recurrencia (116). El rol del tratamiento adyuvante es reducir, mediante tratamiento sistémico (hormonal, quimioterápico o biológico) o local (radioterapia), ese riesgo. El desarrollo de estos perfiles moleculares ha sido especialmente útil en la decisión del tratamiento adyuvante. Los factores clínicos tradicionales como el programa “Adjuvant!Online” (117) se basan en factores clínicos como la edad, el tamaño tumoral, el grado o el estatus ganglionar. El programa Adjuvant!online <http://www.adjuvantonline.com/> es una aplicación que ayuda a calcular los riesgos y beneficio del tratamiento adyuvante (la quimioterapia, terapia hormonal o ambos) después de la cirugía (**Figura 3**).

El objetivo de estas herramientas es ayudar a los profesionales de la salud a estimar el riesgo de cada paciente: la mortalidad relacionada con el cáncer o recaída sin terapia adyuvante sistémica, las estimaciones de la reducción de los riesgos asociados a

la terapia, y los riesgos de los efectos secundarios de la terapia. Estas estimaciones se basan en la información introducida sobre los pacientes individuales y sus tumores. La propia aplicación subraya que es un complemento que no debe sustituir al juicio clínico.

Adjuvant! Online
Decision making tools for health care professionals

Adjuvant! for Breast Cancer (Version 8.0)

Patient Information

Age:

Comorbidity:

ER Status:

Tumor Grade:

Tumor Size:

Positive Nodes:

Calculate For:

10 Year Risk:

Adjuvant Therapy Effectiveness

Horm:


Chemo:

Hormonal Therapy:

Chemotherapy:


Combined Therapy:

No additional therapy:




87.8 alive in 10 years.
3.8 die of cancer.
8.4 die of other causes.

With hormonal therapy: Benefit = 0.8 alive.



With chemotherapy: Benefit = 0.3 alive.



With combined therapy: Benefit = 1.1 alive.




Figura 3. Representación del programa Adjuvant!online. Se observan las variables que incluye el programa para el cálculo del riesgo

Los perfiles de expresión génica han permitido el desarrollo de firmas moleculares.

1.8.3.1 Perfil Génico Amsterdam- 70 (Mammaprint®, Agendia)

Es uno de los primeros perfiles génicos, que basándose en la expresión de arrays, clasifica los tumores según el riesgo de recurrencia. El resultado del test es binario, bajo o alto riesgo. El desarrollo se realizó en el Netherlands Cancer Institute, Ámsterdam, donde los investigadores realizaron un análisis supervisado de expresión génica, directamente del tejido congelado de tumores de mama (110). De las 98 muestras de tumores, la mayoría tenían ganglios positivos y las pacientes era menores de 55 años. Treinta

y cuatro pacientes (44%) tuvieron metástasis a distancia en menos de 5 años, 44 pacientes no recayeron, y 20 muestras pertenecían a mujeres con cáncer de mama hereditario. El análisis supervisado permitió seleccionar 70 genes con una potencia para detectar recaída a distancia del 83%. Este test genético fue el primero en ser aprobado por la FDA⁷ en 2007 como predictor pronóstico en cáncer de mama precoz. La utilidad clínica se clarificará con el ensayo MINDACT (Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy) NCT00433589, donde las pacientes con predicciones clínicas y genómicas discordantes son aleatorizadas a recibir o no quimioterapia (EORTC Trial 10041 (BIG 3-04) – MINDACT). Aunque está pendiente esta validación prospectiva, este perfil parece predecir el beneficio a regímenes convencionales de quimioterapia (118).

1.8.3.2 Oncotype Dx® (Genomic Health) o Recurrent Score (RS)

Permite predecir la probabilidad de recidiva en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadios tempranos de la enfermedad con tumores luminales (110). El resultado final es una fórmula matemática que incluye 16 genes (más cinco de referencia) que pondera el riesgo y predice la recaída a distancia a pesar del tratamiento con tamoxifeno. El RS fue validado en una base de datos independiente con 668 muestras (de un total de 2617) recogidas del brazo tratado con tamoxifeno del estudio NSABP-14 (NCT00256243) (119), un ensayo clínico prospectivo que estudiaba el beneficio de tratamiento adyuvante en tumores de mama con receptores hormonales positivos y ganglios negativos. OncotypeDx está siendo validado de forma prospectiva en un ensayo clínico (TailorX, NCT00310180). Es un estudio en pacientes con tumores de mama

⁷ La FDA (Food and Drug Administration) es el organismo que controla los alimentos y los medicamentos en Estados Unidos.

RE+ y ganglios negativos, que son aleatorizadas mediante el uso Oncotype DX, y cuyo objetivo es averiguar si la terapia hormonal en monoterapia o combinada con la quimioterapia es mejor para las mujeres que tienen una puntuación de recurrencia en Oncotype DX entre 11-25 (puntuación intermedia). La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) recomienda su uso para pacientes con tumores menores de 5 centímetros, RE+ y sin afectación ganglionar desde el año 2007 (81).

1.8.3.3 Firma de 76 genes de Rotterdam

La firma génica Rotterdam/Veridex fue desarrollada a partir de un test en 115 tumores de mama, sin afectación axilar, que no habían recibido tratamiento adyuvante y fueron seguidas durante al menos 8 años (120). Se realizó un test pronóstico en función del RE. El test se validó en una muestra de 171 tumores demostrando una sensibilidad del 93% y una especificidad del 48%. En análisis multivariante demostró ser una variable independiente ajustada para el riesgo clínico definido por el Adjuvant!online para la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global. Especialmente, identificó los pacientes de alto riesgo para desarrollar metástasis de forma precoz.

1.8.3.4 PAM 50

En este estudio se analizaron cohortes de pacientes con muestras frescas congeladas y fijadas parafina (FFPE) recogidos en la Universidad de British Columbia (Vancouver, British Columbia, Canadá), la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, Carolina del Norte), Thomas Universidad Jefferson (Filadelfia, PA), la Universidad de Washington (St. Louis, MO), y la Universidad de Utah (Salt Lake City, UT). El subtipo intrínseco y la predicción de riesgo basado en el PAM50 (107) añaden un valor pronóstico significativo y valor predictivo para la estadificación patológica, el grado histológico, y el ensayo estándar clínico de marcadores moleculares. En 2014, se demostró que el PAM 50 ROR score era un sistema efectivo para clasificar el riesgo de recurrencia

tardía a las pacientes postmenopáusicas después de tratamiento hormonal (121).

1.8.3.5 Otras firmas genómicas

Existen otras firmas genómicas de menor validación clínica por el momento como Breast Cancer IndexSM (HOXB13:IL17BR) (122) o MapQuant Dx (123).

Con esta evidencia, se sabe por tanto que los perfiles moleculares pronósticos son un complemento en la práctica diaria pero no pueden reemplazar los factores pronósticos clásicos. El beneficio de estos perfiles es particularmente evidente identificando buen o pobre pronóstico entre los tumores RE+. El valor clínico de estas plataformas entre los tumores RE- es menos claro.

1.9 Tratamiento del cáncer de mama localizado

1.9.1 Tratamiento quirúrgico

La mastectomía radical *de Haslsted*, realizada por primera vez en 1882, ha sido sustituida por una cirugía más conservadora, extirpando la glándula mamaria con el complejo pezón-areola y la piel. Después de numerosos ensayos clínicos prospectivos la cirugía conservadora más radioterapia ha reemplazado la mastectomía para la mayoría de los pacientes mejorando la estética sin perjudicar la supervivencia (124,125). Las contraindicaciones absolutas para la cirugía conservadora son la presencia de márgenes con infiltración tumoral tras varios intentos de resección, enfermedad multicéntrica en diferentes cuadrantes, microcalcificaciones difusas sugiriendo multicentricidad, historia de radioterapia previa en la pared torácica o la mama y primer y segundo trimestre del embarazo. La cirugía de mama no está restringida a estadios precoces. Estudios retrospectivos muestran aumento de supervivencia con cirugías del tumor primario de mama en pacientes con cáncer de mama metastásico controlado. Este beneficio parece

más claro en pacientes con tumores con resección completa, buena situación basal, metástasis solitarias y largo intervalo libre de enfermedad (67).

1.9.2 Tratamiento con radioterapia adyuvante

La radioterapia está indicada siempre después de la cirugía conservadora y puede estar indicada después de la mastectomía. El objetivo de la RT es erradicar la enfermedad subclínica y minimizar la tasa de recurrencia local. Se recomienda en tumores mayores de 5cm con márgenes próximos a 1 milímetro (mm). La pared torácica y la axila deben ser irradiadas si hay más de 3 ganglios afectados, y si la afectación es entre 1 y 3 ganglios se recomienda irradiación de pared torácica y región supraclavicular.

Uno de los estudios claves en la instauración de la cirugía conservadora seguida de radioterapia es el estudio NSABP 06 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project). Este ensayo incluyó a 1600 mujeres entre 1976 y 1984 con tumores de hasta 4 cm. Las pacientes fueron aleatorizadas en 3 opciones: mastectomía radical modificada, tumorectomía seguida disección axilar y tumorectomía seguida de disección axilar con radioterapia posterior (126). Los datos con seguimiento a 20 años indican que los resultados son comparables y que no existen ventajas con la mastectomía radical (38). La radioterapia después de tumorectomía ha permitido que la mayoría de las pacientes con estadios I y II puedan conservar su mama.

En algunos casos seleccionados, la radioterapia puede ser omitida: pacientes mayores de 70 años con estadio I, receptores hormonales positivos y afectación axilar negativa, ya que la radioterapia no ha demostrado aumentar la supervivencia (127). Actualmente, la investigación en el campo de la radioterapia busca la reducción del campo, la dosis y la extensión de la irradiación. La administración de una dosis menor de 42,5Gy en 16 fracciones para la cirugía conservadora de mama con márgenes libres ha demostrado no ser inferior que el esquema estándar de 54Gy (128). En un reciente estu-

dio publicado para mujeres seleccionadas con estadios precoces, la radioterapia intraoperatoria no fue inferior para recurrencia local y toxicidad comparada con la radioterapia externa (129). La principal ventaja de este método es la rapidez y el bajo coste.

1.9.3 Tratamiento hormonal adyuvante

La mayoría de los tumores de mama tienen receptores hormonales positivos, que permitirá que las pacientes reciban un tratamiento adyuvante hormonal. El tamoxifeno se une al receptor de estrógeno actuando como un antagonista en el tejido mamario. Fue el primer fármaco que demostró un beneficio en el tratamiento hormonal adyuvante con beneficio tanto para ganglios negativos como positivos en supervivencia libre de progresión y supervivencia global (67), y constituye el tratamiento de elección en pacientes premenopáusicas durante 5 años. La fuente esencial de estrógenos en estas pacientes es la función ovárica, por lo que su abolición podría mejorar el pronóstico. Los ensayos clínicos aleatorizados de fase III SOFT (Suppression of Ovarian Function Trial) y TEXT (Tamoxifen and Exemestane Trial), evaluaron la eficacia de la supresión de la función ovárica con la aplicación mensual de inyecciones del agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) triptorelina, la extirpación quirúrgica de ambos ovarios o la radioterapia (130,131). En estos estudios, la supresión del funcionamiento ovárico se combinó con tamoxifeno o exemestano. El análisis conjunto de las ramas con supresión ovárica de ambos estudios demostró que el tratamiento con exemestano combinado con supresión de la función ovárica redujo el riesgo de recidiva de cáncer de mama invasivo en un 34%, en comparación con el tratamiento de tamoxifeno combinado con supresión ovárica. El análisis de las ramas de tamoxifeno frente a tamoxifeno con supresión ovárica del estudio SOFT demostró que añadir la supresión ovárica al tratamiento adyuvante con tamoxifeno redujo las recidivas del cáncer de mama de mujeres jóvenes con cáncer de mama precoz hormonosensible que habían recibido quimio-

rapia y no habían alcanzado aún la menopausia. El tratamiento con tamoxifeno más supresión ovárica redujo el riesgo relativo de recidiva del cáncer de mama invasivo en un 22%, en comparación con el tratamiento con tamoxifeno solo en este grupo. El beneficio que supuso la adición de la supresión ovárica al tamoxifeno resultó más destacado entre las pacientes menores de 35 años, un grupo de edad con un riesgo particularmente alto de recaída.

En mujeres postmenopáusicas, los IA han demostrado un beneficio en supervivencia libre de progresión en varios ensayos clínicos. Los resultados de un meta-análisis reciente indican que los IA reducen el riesgo de recurrencia en un 30% comparado con tamoxifeno y el tratamiento con IA durante 5 años reduce la tasa de mortalidad a 10 años en un 15% comparado con 5 años de tamoxifeno (132). Existen diferentes esquemas de administración para los IA: a) monoterapia durante 5 años (133,134); b) tratamiento secuencial después de 2-3 años de tamoxifeno (BIG 1-98) (135); c) tratamiento extendido durante 3 a 5 años después de 5 años de tamoxifeno (136).

1.9.4 Tratamiento con quimioterapia

En 1958, se publicó el primer estudio demostrando el beneficio de la quimioterapia adyuvante en pacientes con afectación axilar positiva; fue un estudio del NSABP comparando el beneficio de una quimioterapia intra y postoperatoria con tiotepa⁸ frente a placebo (52).

⁸ La tiotepa es un citotóxico polifuncional relacionado química y farmacológicamente con la mostaza de nitrógeno. La acción radiomimética de la tiotepa se atribuye a la liberación de radicales de etileniminas que, como ocurre en el caso de la radioterapia, actúan sobre los puentes del ADN, por ejemplo, mediante alquilación de la guanina en N-7, rompiendo el enlace entre la base de purina y el azúcar y liberando guanina alquilada (Fuente: informe Comisión Europea, <http://ec.europa.eu/>)

En el año 2012, se publicó un meta-análisis de datos individuales de unas 100.000 mujeres con cáncer de mama precoz en más de 120 ensayos clínicos de quimioterapia adyuvante; fue el primer meta-análisis del Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) incluyendo tratamiento adyuvante con taxanos (137). Se analizaron los ensayos clínicos de quimioterapia actual comparada con las pautas más tradicionales, además de los ensayos de los últimos 25 años de quimioterapia adyuvante en general, comparados con no quimioterapia. Los resultados demostraron una reducción significativa, tanto de la mortalidad por cáncer de mama, como de la mortalidad global con las pautas con CMF y las pautas basadas en antraciclinas, comparado con la no administración de quimioterapia. Los ensayos con esquemas de quimioterapia más contemporánea comparada con esquemas de quimioterapia más antiguos muestran reducciones importantes de la mortalidad. La adición de un tratamiento adyuvante con taxanos a los esquemas basados en antraciclinas reduce la mortalidad por cáncer de mama en un 5% adicional en términos absolutos. Se observó que la reducción de la mortalidad por cáncer de mama con estas pautas fue igualmente significativa en los tumores de mama receptor estrogénico positivo como negativo, y tanto en mujeres jóvenes como mayores. La poliquimioterapia sigue disminuyendo la mortalidad, pero todavía es preciso determinar en qué pacientes el beneficio es menor para disminuir la comorbilidad y evitar sobretratamiento.

1.9.5 Tratamiento con fármacos biológicos

En las pacientes de mama HER2+, el tratamiento con trastuzumab en adyuvancia es un estándar. Un meta-análisis con 13.493 pacientes de 5 ensayos clínicos consolidaron la evidencia de aumento de supervivencia y disminución en la tasa de recurrencia (138). Ninguna otra molécula ha demostrado beneficio en supervivencia en adyuvancia.

1.10 Perspectivas futuras en el tratamiento del cáncer de mama precoz: Oncología personalizada

El desarrollo de tecnologías rentables capaces de evaluar a fondo el ADN, ARN, proteínas y metabolitos en los tumores de los pacientes ha impulsado los esfuerzos de la investigación a la atención médica a medida y la medicina personalizada (destacadamente la oncología). De hecho, la evaluación de las pruebas moleculares validadas en tejido tumoral o en la línea germinal del ADN de los pacientes ha conducido a la toma de decisiones terapéuticas (139). Sin embargo, existen todavía muchos desafíos teóricos, prácticos y regulatorios que deben ser superados para el abordaje de esta medicina molecular personalizada (140). Actualmente, se generan un número inmenso de datos, producidos por las nuevas tecnologías de alto rendimiento. El problema es que estos datos son muy difíciles de gestionar, visualizar y convertir en los conocimientos necesarios para mejorar los resultados del paciente de forma práctica. La biología de sistemas integra la ingeniería, la física, y aproximaciones matemáticas con conocimientos moleculares, biológicos y médicos en un proceso para visualizar la red interconectada de eventos y procesos dentro de una célula que se producen debido a las modificaciones genómicas adquiridos por los tumores de los pacientes (140). Las diferentes modificaciones genómicas determinan el comportamiento celular y el pronóstico de los tumores. La biología de sistemas se aproxima a la identificación molecular de los conductores y los biomarcadores de los que dependen los tumores. Esto posibilitará la aplicación de una medicina más barata y personalizada y que debería permitir incrementar el éxito de los ensayos clínicos para acelerar la puesta en práctica de terapias en la clínica.

Gran parte de la práctica médica está fundamentada en los estándares de atención al paciente. Las intervenciones, decisiones y actos médicos se basan, en parte, en el conocimiento teórico de los diferentes niveles de evidencia epidemiológica, los estudios

clínicos y la medicina basada en la evidencia. Después de los metaanálisis, los grandes estudios aleatorizados son el mejor nivel de evidencia, diseñados para determinar el mejor enfoque para la media de las poblaciones pero no están concebidos para determinar el enfoque preciso en individuos específicos. El desarrollo de las tecnologías de creación de perfiles moleculares ofrece la posibilidad de personalizar la atención médica, a nivel del tumor y, específicamente del paciente (141). Estos enfoques tienen el potencial para cumplir la promesa de determinar el fármaco, la dosis precisa, el momento y el paciente exacto que debe recibir un específico tratamiento. El objetivo ulterior de la terapia personalizada pretende aumentar la eficacia de un fármaco y disminuir las toxicidades en función de las características genómicas del individuo (142). Existen varios test moleculares en tejido tumoral o genoma que determinan parte de la toma de decisiones en cáncer de mama, colorrectal o pulmón. Sin embargo, el campo de la medicina personalizada plantea muchos desafíos como las dificultades en la identificación y validación de biomarcadores, retroalimentación de vías no conocidas u otros mecanismos que pueden llevar a efectos tóxicos o de eficacia inesperados en el paciente (143).

El incremento en el conocimiento de los perfiles moleculares de expresión indica que puede existir una relación entre éstos y la supervivencia o respuesta a las terapias en las pacientes con cáncer de mama. En los últimos años, los esfuerzos han ido encaminados a descubrir y definir factores pronósticos independientes que pueden complementar o incluso sustituir a los factores clínicos clásicos.

1.11 Características moleculares y funcionales en la regulación celular de los miARNs

1.11.1 Introducción

Los Micro-ARNs (miARNs) son pequeñas moléculas de ARN endógeno de unos 22 (21-25) nucleótidos (nt) que se forman a partir de ARNs precursores, que no codifican para proteína y que actúan como elementos reguladores de la expresión génica (144). Se han descrito en animales y plantas como elementos protranscripcionales uniéndose a los ARN mensajeros (ARNm) y regulando su traducción a proteínas. Representan un elemento regulador muy abundante en las células que influye en la regulación de genes y proteínas.

En 1993, por primera vez se describen dos pequeñas secuencias de ARNs producidas por la endoribonucleasa Dicer en *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) (145). *Ambros, Lee y Feinbaum* (146) descubrieron que *lin-4*, un gen que controla el desarrollo de *C.elegans*, no contenía información para proteína, sin embargo originaba dos pequeños ARNs, uno mayor de 61nt y otro de 22nt de longitud. El más largo (61nt) adquiriría una conformación en forma de asa y era el precursor del más corto. Este descubrimiento describía que estos ARNs presentaban zonas antisentido complementarias a múltiples sitios de la zona 3'UTR⁹ del gen *lin-14* (147). El grupo de *Ruvkun* estudió la mutación *lin-14* en su región no traducida 3'UTR y comprobó que existía una disminución de la cantidad de proteína sin que hubiera una reducción de los niveles de ARNm, descubriendo una nueva forma de regulación génica (146). El descenso de la proteína LIN-14 es parcialmente dependiente de la actividad de *lin-4* y de la región 3'UTR de *lin-14*. Los

⁹ La región no traducida 3' (3'-UTR) es la sección de RNA mensajero (mRNA) que sigue inmediatamente al codón de terminación de la traducción.

niveles de *ARNm de lin-14* y la asociación del polirribosoma parecían no influir en la regulación de *lin-4*. Es decir descubrieron la complementariedad antisentido de *lin-4* y *lin-14*; porque existen sitios en la región no traducida 3' de *lin-14* que son complementarios a *lin-4* (146,147).

Los posteriores estudios realizados en *C. elegans*, estudiaron e identificaron *lin-28*, otra diana de la regulación de *lin-4* mediado por una única zona complementaria en su región 3'UTR (148). Los sucesivos análisis de los niveles de ARNm y asociación con el polirribosoma de *lin-28* concluyeron que existía una inhibición directa también de este ARNm (147,149).

El siguiente gen de miARN descubierto fue *let-7* (LETha1), que regula el desarrollo tardío mediante la inhibición de la expresión de *lin-41* en algunos tejidos (150). *Lin-41* contiene dos espacios próximos complementarios de *let-7* (LCSs¹⁰) con los que puede formar complejos binarios que incluyen regiones centrales no emparejadas. La fusión de la región 3'UTR de *lin-41* a determinados genes resulta en la regulación post-transcripcional que depende del miARN *let-7* y secuencias específicas y estructuras en la región LCS. Este control es dependiente de la región LCS y no precisa estricta complementariedad de bases entre el miARN y su lugar diana. Estos resultados indicaron que la regulación de los niveles de ARNm podía contribuir a la inhibición de la expresión de la proteína, mediada por los miARNs *lin-4* y *let-7* durante el desarrollo en *C. elegans* (151).

Basado en el precedente de la relación entre *lin-4/lin-14*, se predijo que el reconocimiento de *let-7* a través de la región LCS, inhibiría su traducción por complementariedad del ARNm. Poco después del descubrimiento de *let-7* en *C. elegans*, se descubrió

¹⁰ LCS: Hace referencia a los sitios complementarios del miRNA.

el gen en muchas otras especies animales (152). Miles de diferentes miARNs se han descrito en plantas y animales, y se están intensificando los esfuerzos por determinar sus objetivos y dianas reales. La mayoría de las dianas de los miARNs han sido relacionadas con un único ARNm aunque muchas de estas uniones son predicciones que están pendientes de validación (153).

1.11.2 Estructura y Biogénesis de los miARNs

Los miARNs forman una familia de pequeños nucleótidos, no codificantes aunque representan ARN funcional. Se estima que puede haber más de 1500 miARNs en el genoma humano (154). Los miARNs tienen expresión diferencial y específica por tejido y los cambios en la expresión de miARNs dentro de un tejido pueden estar relacionados y variar con el estatus de la enfermedad neoplásica.

Los genes que codifican para los miARNs están situados dentro de los exones e intrones de ADN no codificantes, pero también pueden localizarse en otras zonas como las regiones intergénicas o en intrones codificantes (155). En el último caso, la expresión de los miARNs se relaciona con la regulación transcripcional del gen asociado y de esta manera se entiende que pueda existir especificidad por tejidos, dependiendo de la expresión de diferentes grupos de genes. En los otros casos, la expresión de los miARNs tiene una regulación autónoma a través de sus específicos elementos reguladores. También se ha descrito que los miARNs pueden proceder de secuencias repetitivas de ADN (156). Los miARNs maduros (moléculas de ~22 nt), característicamente presentan un grupo hidroxilo en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5'. El procesamiento de los miRNAs comienza en el interior del núcleo celular. Posteriormente es exportado al citoplasma donde son funcionales (157). Los miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II o III como grandes moléculas de ARN que pueden exceder 1kb (1000 nt), lo que se denomina miARN primario (148). Los precursores de miARN for-

man una estructura que en uno de sus extremos tiene forma de horquilla, ésta es cortada en el núcleo por la ribonucleasa ARNasa III conocida con el nombre de Drosha, que está ligada a la proteína DGCR8¹¹ (DiGeorge syndrome critical region protein 8) en mamíferos (158). La endonucleasa Drosha, corta asimétricamente ambas cadenas cerca de la base de la molécula primaria con estructura de horquilla, de forma que el producto resultante es una molécula de ~70 nt denominada pre-miARN. El pre-miARN se exporta activamente al citoplasma mediante un complejo dependiente de RAN-GTP, exportina-5. Ran se encarga de la unión de Guanosina trifosfato (GTP) durante la exportación de pre-miARN (159,160). La hidrólisis de GTP a Guanosina difosfato (GDP) en el citoplasma genera la energía necesaria para que el pre-miARN sea liberado del complejo exportador. En el citoplasma, el pre-miARN (~70nt) es cortado por otra endonucleasa ARNsa II, conocida como Dicer, y que está asociada a dos proteínas en mamíferos TRBP¹² (Transactivation Response ARN Binding Protein) (161) y PACT¹³ (Protein ACTivaTor of PKR). La acción de Dicer provoca la formación de una molécula de doble cadena, el miARN doble (162). Posteriormente, se separaran las dos cadenas del miARN doble; una de las cadenas genera el miARN maduro (~22 nt) que se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como ARN-induced silencing complex (RISC)¹⁴. El complejo RISC degrada el ARNm diana o bloquea la traducción del ARNm; es el elemento responsable de la degradación o inhibición del ARNm, mientras

¹¹ Región crítica de la proteína 8 asociada al síndrome de DiGeorge.

¹² Proteína de unión al RNA en respuesta a la transactivación.

¹³ Proteína celular activadora de proteína quinasa.

¹⁴ Complejo de silenciamiento inducido por el RNA

que la otra cadena es degradada. MiRISC es el término usado para designar al complejo RISC si actúa como miARN (163).

Los miARNs modulan la expresión de genes regulando la transducción y degradación de ARNm. El mecanismo por el que el ARNm es regulado, depende del grado de complementariedad del miARN con el ARNm. El objetivo de la complementariedad perfecta es la degradación del ARNm por el RISC mientras que si la complementariedad no es perfecta la transducción del ARNm es bloqueada por el ribosoma (164).

La identificación de las diana de los miARNs fue muy compleja porque sólo los segmentos con pequeñas secuencias de un determinado tamaño ensamblan perfectamente con el ARNm 3' UTR. Por eso, aunque los primeros miARNs se descubrieron a principio de los años 90, su funcionalidad no se evidenció hasta comienzos del siglo XXI. Del mismo modo, el miARN remanente posee la capacidad de unirse perfectamente al ARNm.

El complejo miRISC en humanos está formado por varias proteínas que incluyen a Dicer, a las proteínas de Argonauta 2 (AGO2), a TRBP y a PACT (la enzima cuya función es dividir el ARNm diana es AGO2) (165). Dicer es una proteína muy conservada y en algunas especies tiene funciones específicas en el silenciamiento génico. En *Drosophila melanogaster*, Dicer-1 se encarga del procesamiento del pre-miARN y Dicer-2 interviene en la formación de ARNs silentes (siARN). Dicer es una enzima formada por seis dominios funcionales: un dominio DEAD-box ARN-helicasa (dominio que usan la hidrólisis de ATP para abrir ARN de doble cadena), un dominio DUF283, dos dominios RIII (dominio conservado que participa en la reacción endonucleasa que produce la rotura de sustratos de ARN de doble cadena), un dominio de unión a ARN de doble cadena (dsARN) y un dominio PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) (166). Argonauta,

otra de las proteínas que forman parte complejo miRISC también ha sido relacionadas con la represión génica.

Existen 2 pasos importantes para la formación del complejo miRISC: 1) la selección de la cadena de miARN sentido o anti-sentido y, 2) la destrucción (no es fundamental) de la otra cadena. Se sigue investigando cómo se producen estos mecanismos y cuál es el destino final de la cadena sentido. Cuando el complejo miRISC se ha ensamblado con la cadena que le hace guía, se ensamblará al ARNm diana en la región UTR 3' para inhibir la traducción. Además, existen otras vías alternativas en la formación de miARNs (167).

Además de los miARNs, existen diferentes moléculas con la función de silenciamiento génico, un ejemplo son los ARNs de interferencia (siARN). Poseen una longitud de ~21 nucleótidos. También son generados por Dicer a partir de ARN de doble cadena (dsARN). Las 2 hebras de 21 nucleótidos del siARN forman un complejo de 19 nucleótidos de dsARN y dos nucleótidos que no están emparejados en los extremos. El siARN media su función a través de un complejo RISC funcional. Los siARNs actúan mediante la degradación del ARNm o la metilación directa del ADN. La alta complementariedad entre la secuencia del siARN y el ARNm produce la degradación del ARNm. Si no existe esa complementariedad el siARN puede inducir la metilación en las islas CpG¹⁵ del promotor suprimiendo la transcripción (149,168).

1.11.3 Mecanismos de acción de los miARN

No existen certeza sobre cuáles son todos los efectos y dependencias de los miARNs porque su expresión aparentemente está regulada espacial y temporalmente. Por ello, cuando se estudia cada miARN con su diana correspondiente, puede suceder

¹⁵ Regiones del genoma con alto contenido de dinucleótidos citosina (C) – guanosina (G).

que esa diana que se estudió en un ARN no se encuentre expresada en las mismas células o tejido que el miARN. El estudio de los mecanismos de acción de los miARN es aún más complejo ya que se han descrito incluso polimorfismos¹⁶, incluso de los pre-miARN (169).

Los miARNs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: degradando el ARNm o mediante la represión traduccional. La utilización de un mecanismo u otro dependerá del ARNm diana. Una vez el miARN se incorpore al complejo citoplasmático RISC, actuará un mecanismo u otro dependiente del grado de complementariedad del miARN con su diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del ARNm, mientras que si la complementariedad no es absoluta o es insuficiente se producirá una inhibición de la traducción. La habilidad de los miARNs para suprimir o inhibir la traducción depende de la energía libre de unión entre los primeros 8nt de los extremos 5' del miARN y del ARNm diana. Gracias a esta capacidad un miARN puede actuar sobre muchas zonas UTR 3' de un gran número de genes (170).

Los miARNs para inducir la degradación del ARNm y los siARNs, actúan en la misma localización, en regiones que comprenden preferiblemente zonas de 10-11 nt. Después de la degradación del ARNm, se mantiene la integridad del miARN y tiene la habilidad de reconocer y posibilidad de actuar sobre otros ARNm. En general, la complementariedad se produce en regiones codificantes pero también en regiones 3'UTR, pero cuando los miARNs actúan inhibiendo la traducción suelen unirse a la región 3' UTR del ARNm. RCK o p54 (componente del complejo miRISC) es el efector fundamental para la inhibición traduccional. Cuando el complejo miRISC contiene el efec-

¹⁶ Presencia de diferentes alelos para un gen.

tor RCK/p54 puede iniciar un evento de oligomerización, secuestrando al ARNm y transportándolo a los P-bodies¹⁷ (Figura 4). En los P-bodies, el ARNm reprimido puede permanecer en estructuras oligoméricas para su almacenamiento o puede constituir un complejo con enzimas para degradar el ARNm. En el miRISC, el miARN es el elemento encargado de indicar cuál es la secuencia diana, y entonces, RCK/p54 transporta el ARNm hacia el procesamiento o almacenamiento en los P-bodies (171).

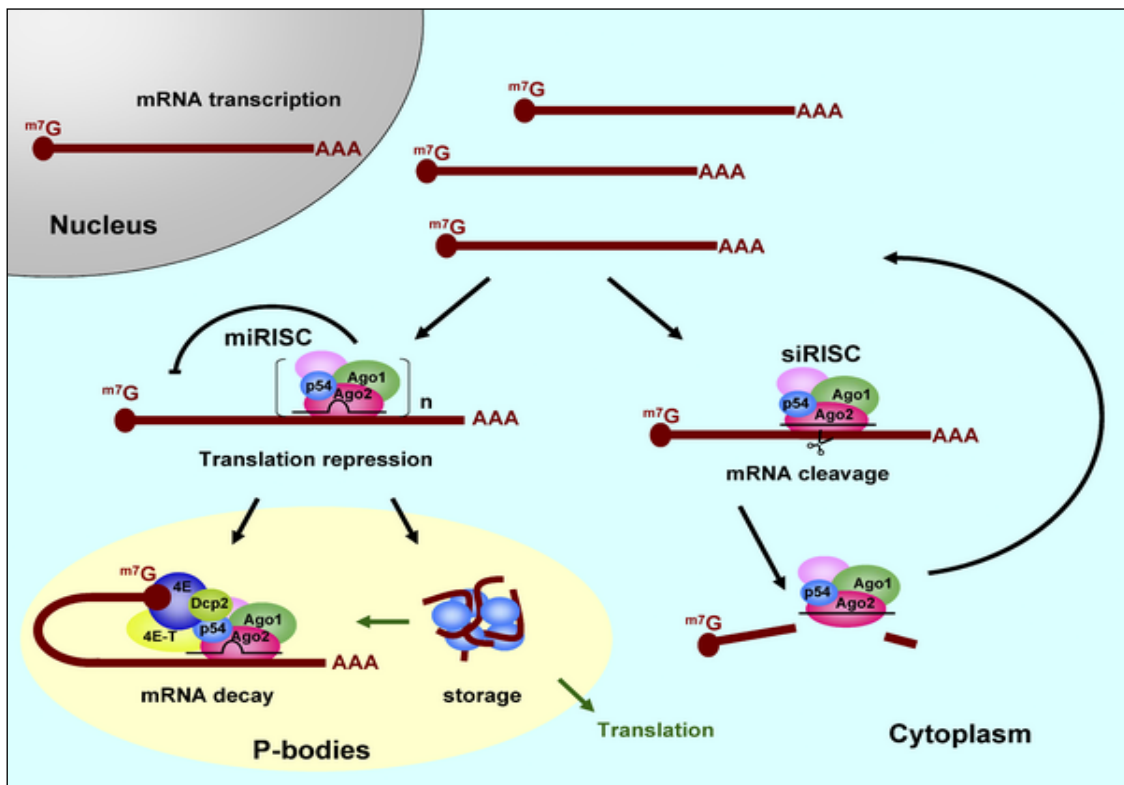


Figura 4. Modelo de la función del complejo humano RISC que implica miARN y siARN (172).

¹⁷ Los P-bodies o “cuerpos de procesamiento” son focos de enzimas implicadas en el procesamiento del mRNA dentro del citoplasma de las células eucariotas.

1.11.4 Regulación de la expresión de los miARNs

Los miARNs pueden aparecer sobreexpresados o infraexpresados debido a diferentes procesos. Distintos mecanismos postranscripcionales pueden controlar la expresión de muchos genes, y como los miARNs sean generalmente transcritos por la Pol II, se ha postulado que la epigenética también pueda regular el control de la expresión de los miARNs. De hecho, se ha descrito que mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y las modificaciones de histonas, pueden afectar a la expresión de miARNs (173). Por ejemplo, miR-127 se sobreexpresa en líneas celulares tumorales después del tratamiento con inhibidores de la metilación o inhibidores de las histonas deacetilasas (174). El uso combinado de estos dos fármacos reduce la metilación de la célula, provocando la apertura de la estructura de la cromatina, y la expresión de genes silenciados epigenéticamente. El *miR-127*, fue uno de los primeros miARNs que indicó que diversos mecanismos epigenéticos podían controlar la expresión de miARN. En los intrones de genes que codifican para proteínas existen muchos miARNs, y se hipotetiza que puedan estar corregulados con sus genes huésped. Sin embargo, es posible que estos miARNs puedan tener sus propios promotores y otros elementos independientes que regulen su expresión. Además se ha postulado que los miARNs localizados en intrones puedan actuar como promotores (175).

Algunas líneas de evidencia indican que los miARNs participan en procesos reguladores que modulan su propia regulación, es decir tienen un sistema de autorregulación. Se ha identificado, que el *miR-145* tiene efecto apoptótico, dependiente de la activación de TP53¹⁸, y la activación de TP53 podía estimular la expresión de *miR-145* formando ciclo (176). Este fenómeno se ha estudiado en diferentes tumores como en

¹⁸ Gen que codifica para la oncoproteína p53.

pulmón, colon o mama. Esta hipótesis ha sido apoyada por el hecho de que la expresión de *miR-145* está inversamente correlacionada con el tamaño, grado y proliferación tumoral del cáncer de mama. Además de la regulación de miARNs a través de los mecanismos de retroalimentación, existen determinadas condiciones ambientales que también pueden influir y modificar la expresión de miARN. En concreto, estudios in vitro han demostrado que las células sometidas a estrés o hipoxia tienen mayor expresión de *miR-210*, y que esta expresión se halla regulada por la interacción de HIF1A¹⁹ (*Hipoxia Inducible Factor*) (177). Se están estudiando nuevos y alternativos objetivos/dianas de los miARN y la interacción entre estos de forma que puedan ilustrar su rol dependiendo de la función normal, o de la progresión de la enfermedad.

1.11.5 MiARNs y alteraciones en cáncer

El ARNm clásicamente se ha reconocido como una molécula intermediaria en el proceso de expresión genética en células eucariotas, y cuya función fundamental es transmitir el mensaje genético, desde el núcleo celular al citoplasma, para ejercer como molde para la síntesis proteica. En la actualidad, se ha descubierto el substancial papel que los miARNs poseen en la regulación funcional y la estabilidad del ARNm, lo que se traslada en la intervención en múltiples e importantes procesos celulares y moleculares. El cáncer, considerado como conjunto de enfermedades con una base genética muy compleja, tiene una serie de elementos comunes: se produce por mutaciones en el material genético, las modificaciones producidas evaden los sistemas de control celular, la célula dañada no tiene control sobre los mecanismos de proliferación y la célula adquiere nuevas capacidades como invadir y acceder tejidos a los que antes no podía (178).

¹⁹ Factor inducido por hipoxia 1A.

El control de la expresión génica es ejecutado por secuencias nucleotídicas, por proteínas y por sus interacciones. Los microARNs pueden ser elementales reguladores de la expresión génica: modulando vías supresoras y oncogénicas pueden contribuir a la tumorigénesis. Coincidiendo con esta hipótesis, alteraciones recurrentes genéticas y epigenéticas de miARNs se han descrito en diferentes tumores (**Tabla 6**). Distintos estudios intentan evidenciar los verdaderos mecanismos de acción y las auténticas implicaciones de estos procesos; estudios bioinformáticos complejos han permitido relacionar a los miARNs con los procesos celulares necesarios para el desarrollo del cáncer: adhesión, neovascularización, invasión tisular, proliferación y diferenciación celular (179,180).

Tabla 6. Selectiva descripción de miR y su implicación en el cáncer (181)

MicroARNs y Cáncer		
Mutación/Cambio epigenético	Consecuencia Funcional	Ejemplo
Delección de miARN	Disminución del oncogen	<i>miR-15a</i> (182)
Silenciamiento epigenético del locus de miARN	Disminución del oncogen	<i>miR-29</i> (183)
Mutación puntual afectando a un miARN o a un precursor del miARN	Disminución de la afinidad por oncogen. Aumento de la afinidad por un gen supresor	<i>miR-181</i> (184)
Amplificación genómica o traslocación del locus del miARN	Aumento de la represión de un gen supresor	<i>miR-17</i> (185)
Mutación puntual en un oncogen	Disminuye afinidad por miARN	<i>miR-21</i> (186)
Mutación puntual en un gen supresor	Aumenta afinidad por miARN	<i>miR-155</i> (115)
Reordenamiento de la región 3'UTR	Pérdida de la represión mediada por miARN	HMGA-2 (179)

El primer ejemplo de la importancia que los miARNs tienen en el desarrollo de neoplasias se observó en el proceso de maduración de las células linfoides, donde se describieron miARNs específicos que intervienen en pasos concretos de su diferenciación (188). Por ejemplo, el *miR150* interviene en la detención de la célula durante su desarrollo (189), el *miR155* es capaz de inducir defectos en las células plasmáticas, y la pérdida del *miR-15a* y del *miR-16-1* resulta en una expresión aumentada del oncogén *bcl2* (190).

Otros miARNs, como *let-7*, parecen tener un importante papel antiproliferativo y supresor de varios oncogenes como *Myc* y *Ras*, y se encuentran suprimidos en muchos tumores (191). En la medida que estos procesos se relacionan directamente con los hitos del cáncer, se ha especulado que mutaciones afectando a los miARNs o sus interacciones funcionales con oncogenes o genes supresores podrían contribuir a la tumorigénesis. Existen múltiples y diversos mecanismos oncogénicos en los que podrían estar implicados ya que actúan mediante la represión de genes a través de la interacción directa con sus ARNm. La sobreexpresión, amplificación o la pérdida del silenciamiento epigenético de un gen que codifica un miARN podría implicar la inhibición una vía anti-oncogénica. Por otro lado, las mutaciones más sutiles podrían afectar a la secuencia madura de los miARN reduciendo o eliminando su especificidad alterando la regulación proteica. Mutaciones en la secuencia de ARNm de unión puede provocar efectos similares (181).

No todos estos mecanismos han sido documentados en tumores humanos. Los datos en conjunto plantean consistencia al demostrar que la regulación alterada de miARN-ARNm puede promover el desarrollo o el progreso de tumores. Los datos más convincentes vinculando los miARNs a la tumorigénesis provienen de las alteraciones genéticas en las células tumorales. Ya en el año 2002, se demostró que 2 miARNs eran eliminados con cierta frecuencia en la leucemia linfática crónica (176). Además, los estudios que comparaban perfiles de expresión en tejido tumoral frente al tejido normal demostraron cambios de expresión en los miARNs, algunos de los cuales se han vinculado con el estado de metilación (192).

1.11.6 Los microARNs como oncogenes (oncomiRs)

Los microARNs que se encuentran amplificados o sobreexpresados en tumores pueden actuar como oncogenes. A pesar de la complejidad genética que dirige la géne-

sis tumoral, ciertos tipos de cáncer pueden exhibir una dependencia crítica sobre la expresión de un único oncogén como en el cáncer de mama con sobreexpresión de HER2. Notablemente, esta dependencia puede incluir a los miARNs. Ciertos tipos de cáncer exhiben una dependencia de la expresión de un único miARN oncogénico. Por ejemplo el *miR-155* se encuentra incrementado en diversas neoplasias hematopoyéticas y en tumores sólidos como el cáncer de páncreas, pulmón o mama (193). Otro integrante destacado de la familia de miARNs oncogénico es el *miR-17~92 clúster* (194). Consta de siete miARNs y se relacionó inicialmente con el cáncer en el contexto de los linfomas B (195). En un importante estudio in vivo estudiando el potencial oncogénico de *miR-17~92*, se demostró que podría cooperar con *c-Myc*²⁰ y acelerar la tumorigénesis en un modelo de ratón de linfoma de células B. Sin embargo, esta desregulación de *miR-17~92* no parece ser suficiente para iniciar la formación de tumores per se. Averiguar cómo algunos específicos miARNs pueden perpetuar el cáncer o iniciarlo podría revelar dianas moleculares críticas para generar tratamientos específicos dirigidos (149).

1.11.7 Los microARNs como supresores tumorales (tumor suppressor miRs)

Numerosos microARNs han sido definidos como supresores de tumores en función de su desaparición o reducción en la expresión durante la tumorigénesis. Aparte de estas asociaciones, estudios funcionales en cultivos celulares indican que la sobreexpresión de miARNs puede controlar el crecimiento de células tumorales o inducir la apoptosis (181). La lista de microARNs que han sido asociados al cáncer es cada vez mayor, ya sea como miARNs individuales o como grupos de miARNs actuando como supresores (196). Entre los mejores estudiados y definidos se encuentra la familia del *let-7* (197), que actúan inhibiendo la tumorigénesis; se han descrito como factor pronóstico

²⁰ c-Myc es un gen regulador que codifica para un factor transcripcional.

en algunos tumores como en cáncer de pulmón. Además los genes del *let-7* pueden ser directamente reprimidos por la oncoproteína c-Myc (198). Funcionalmente, *let-7* puede reprimir a los miembros de la familia *Ras*²¹, así como al oncogen *HMGA2*²² (High-mobility group AT-hook 2). La sobreexpresión del miARN *let-7* influye en el desarrollo de tumores de pulmón y mama en modelos animales (199). Otros estudios se han centrado en estudiar la regulación de miARNs por genes supresores, como los miARNs regulados por *p53*. La familia *miR-34* es un importante mediador en la actividad y función de *p53*. Esta familia se compone de 3 miARNs, cuya expresión está muy relacionada pero que están condicionados por 2 loci diferentes: *miR34a* en el cromosoma 1p36 y *miR-34b/34c* en el cromosoma 11q23. La transcripción de ambos loci está regulada directamente por *p53* y media supresión tumoral (200).

Los miARNs que son codificados por la familia *let-7* fueron el primer grupo de onco-miARNs en el que se demostró que regulan la expresión de un oncogén, en particular los genes *Ras* (201). Las proteínas RAS son proteínas de señalización GTPasa, asociadas a la membrana que regulan el crecimiento celular y la diferenciación. Aproximadamente un 15-30% de los tumores poseen mutaciones en los genes *Ras*, y estas mutaciones producen un incremento en la expresión de RAS produciendo la proliferación celular (202). Los miARNs que se codifican por la familia *let-7* funcionan como supresores de tumores; se localizan en zonas inestables del genoma asociado a tumores sólidos (201,203). Estos estudios demostraron que la región 3'UTR del gen *Ras*

²¹ Ras es una superfamilia de proto-oncogenes (genes normales que pueden convertirse en oncogenes debido a mutaciones).

²² HMGA2 este gen codifica para una proteína que forma parte de un conjunto de una familia de proteínas de alta movilidad y que actúan como un factor regulador de la transcripción.

humano contiene múltiples sitios de unión complementarios de *let-7*, permitiendo que *let-7* regule negativamente la expresión de Ras (149).

1.11.8 Los microARNs y su implicación en las vías de señalización tumoral

Los miARNs están implicados en la regulación de las diferentes vías de señalización en el cáncer. Una de las primeras vías en la que se describió esta asociación fue en la vía de señalización Phosphatidylinositide 3-kinases/Protein Kinase B (PI3K²³/Akt²⁴) (204). En un gran número de tumores esta vía está activada, provocando una proliferación celular y comportamiento tumoral más agresivo. El gen supresor de tumor PTEN²⁵ (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) inhibe la función de PI3K. La pérdida de expresión PTEN está asociada con la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt en muchos tipos de tumores (205). Lewis et al. (206) demostraron que miR-19a,b se une a la región 3'UTR del ARNm del gen PTEN en condiciones in vitro. Actualmente se han descrito miARNs implicados en prácticamente todas las vías de señalización como RAS, daño celular (207) o la vía de MAPK²⁶/ERK (208).

1.11.9 Los microARNs y su implicación en progresión tumoral y metástasis

Además de su papel en el desarrollo y génesis tumoral, los miARNs también se han implicado en la progresión del tumor y en variados procesos biológicos celulares que incluyen control de la adhesión, migración, y la invasión; además, se ha evidencia-

²³ PI3k, Fosfatidil inositol 3 quinasa es una familia de enzimas implicados en múltiples procesos tumorales.

²⁴ Akt o proteína quinasa B es una seronina/treonina quinasa implicada en múltiples procesos tumorales.

²⁵ PTEN es un gen supresor tumoral que codifica para una proteína fosfatasa.

²⁶ MAPK o proteína quinasa activada por mitógenos

do su contribución en las metástasis (181). Los miARNs, también regulan estos procesos, y las alteraciones de los diferentes miARNs pueden influir y alterar el potencial metastásico de los tumores (209). En este proceso, los miARNs, *miR-10b* y *miR-373*, fueron los primeros miARNs en proporcionar específica información. El *miR-10b* es un objetivo directo de la transcripción de TWIST1²⁷ (Twist-related protein 1), un inductor de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la progresión metastásica. La expresión de *miR-10b* en líneas celulares de cáncer de mama sin metástasis demostró que inducía la invasión y diseminación como consecuencia de la represión directa de las proteínas HOXD10²⁸. El *miR-373* fue identificado como promotor de la migración de células in vitro (210) y su potencial pro-metastásico ha sido validado en líneas celulares de cáncer de mama. Los miembros de la familia *miR-200* se dirigen sobre los factores de transcripción ZEB²⁹ (Zinc finger E-box-binding homeobox 19), inductores conocidos de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y así reducen la migración e invasión celular (211). Basado en la expresión diferencial entre cáncer de mama metastásico y no metastásico diferentes miARNs han sido propuestos como inhibidores de la progresión tumoral: *miR-126*, *miR-206*, y *miR-335*. De hecho, la sobreexpresión de algunos miARNs puede inhibir la metástasis en modelos celulares, por ejemplo la reducción de expresión de *miR-126* y *miR-335* se correlaciona con peor supervivencia libre de metástasis de pacientes con cáncer de mama (212). Diversos estudios han revelado que los miARNs pueden estar infraexpresados en el tumor en comparación con los tejidos nor-

²⁷ TWIST1 o proteína 1 relacionada con TWIST es un factor de transcripción.

²⁸ HOXD10 o Homeobox D10 es una familia de proteínas que actúan como factor de transcripción.

²⁹ ZEB es una familia de proteínas que actúan como factor de transcripción y que contienen un dominio con forma de dedo de zinc.

males (213). Aunque es posible que este fenómeno evidencie los estados con menos diferenciación de las células tumorales o de mayor tasa de proliferación; una explicación alternativa que se ha postulado es que los niveles de reducción de miARN se seleccionan durante la tumorigénesis, porque esta mismo proceso es el que proporciona algunas ventajas proliferativas o de supervivencia. Estas dos posibilidades son no necesariamente excluyentes entre sí y de hecho no hay demostración empírica (181).

1.11.10 Aplicación terapéutica

Debido al potencial de los miARNs de afectar a la regulación de la expresión genética en el desarrollo de tumores, se han destacado como una atrayente diana terapéutica. Los llamados anti-miARN son secuencias de oligonucleótidos complementarias a los miARNs que pueden bloquear su función, y que por su pequeño tamaño (20 a 22 nucleótidos) son fáciles de sintetizar (214). En este momento existe un activo programa de desarrollo de estos anti-miARN para facilitar su estabilidad y difusión en el medio intracelular. Actualmente existen ensayos clínicos con estos compuestos para demostrar su utilidad en diversas patologías incluyendo patología no tumoral.

1.11.11 Epigenética en el cáncer de mama

El término epigenética con frecuencia, se usa ampliamente y con diferentes significados. En general el término engloba la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, la expresión de miARNs, el posicionamiento de los nucleosomas y la condensación de la cromatina como factores epigenéticos que modifican la regulación de los genes.

La epigenética fue definida en 1942, por *C.H. Waddington*³⁰. En el manuscrito “The Epigenotype” definió de manera informal el término epigenética: el conjunto de los mecanismos causales que intervienen entre el genotipo y el fenotipo, describiendo por primera vez los cambios en el desarrollo de organismos que no podían ser explicados por cambios en el ADN. Posteriormente quedó claramente establecidos que estos cambios epigenéticos tenían un rol en muchas enfermedades incluido el cáncer de mama. Existe una necesidad apremiante de entender el genoma funcional, es decir la superposición de cambios que produce una expresión génica final. Durante los últimos años ha habido una explosión en estudios de epigenética en el cáncer de mama, lo que refleja el aumento exponencial de los manuscritos publicados. Las primeras publicaciones sobre epigenética en cáncer de mama aparecen en 1983 (215). El progreso ha sido lento hasta hace aproximadamente 15 años cuando el número de estudios empezó a aumentar de manera constante y exponencial gracias a los avances tecnológicos. Inicialmente los miARNs era un concepto englobado dentro de la epigenética pero actualmente y debido al desarrollo, la epigenética ha quedado circunscrita a los cambios transcripcionales fundamentalmente metilación del ADN y modificación de histonas.

³⁰ Conrad Hal Waddington (1905-1975). Británico, biólogo, paleontólogo, genetista, y filósofo.

These genomes, these 23 chromosomes, they don't in any way represent the quality of our relationships or the nature of our society -- at least not yet. And like any new technology, it's really in humanity's hands to wield it for the betterment of mankind, or not. And so I urge you all to wake up and to tune in and to influence the genomic revolution that's happening all around you". Richard Resnick

2 Hipótesis

La hipótesis de trabajo que se plantea es que mediante la medición cuantitativa de la expresión de un conjunto de miARNs mediante RT-qPCR³¹ (reverse transcription-polymerase chain reaction) se puede seleccionar un perfil de miARNs que actúen como un factor pronóstico independiente de los factores pronósticos convencionales en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz con afectación axilar al diagnóstico.

³¹ RT-PCR transcripción reversa seguido de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real

3 Objetivos

3.1 Objetivos Principales

Establecer el valor pronóstico, medido en supervivencia libre de enfermedad, de un set de miARNs que han mostrado un papel patogénico en carcinoma de mama, seleccionados tanto en base a la literatura como en base a los hallazgos obtenidos en nuestra serie, dentro de un panel de 667 miARNs, considerando el estado clínico y fenotipo tumoral al diagnóstico y los tratamientos adyuvantes recibidos.

3.2 Objetivos Secundarios

Analizar la correlación entre la expresión alterada de los miARNs seleccionados y: a) el patrón de recaída; b) la supervivencia global; c) la expresión de los genes por ellos reguladas.

Desarrollar un perfil de expresión génica con valor pronóstico en cáncer de mama localmente avanzado compuesto por un número reducido de miARNs utilizando muestras FFPE (tejido fijado en formalina e incluido en parafina).

“Despréndete de todas las impresiones de los sentidos y de la imaginación, y no te fíes sino de la razón”. René Descartes

4 Material y Métodos

4.1 Diseño del estudio

Estudio retrospectivo observacional de cohorte y con muestreo desde el diagnóstico de la enfermedad. Todas las muestras pertenecen a un único centro (Hospital Universitario 12 de Octubre).

4.2 Aprobación por parte del Comité Ético del Centro

Antes de la realización del estudio el proyecto fue presentado en el Comité Ético del Centro para su aprobación (Comité Ético del Hospital Universitario 12 de Octubre) (**Anexo 2**). En el Comité Ético se reúnen personas de diferentes sectores médicos y pacientes para discutir las características del proyecto, sus implicaciones sobre el paciente, y sus problemáticas. Tienen que garantizar el respeto a la dignidad, integridad e identidad del ser humano. El **Real Decreto 561/1993** (Real Decreto 561/1993) establece los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos y que éstos deberán ceñirse a unas **normas de Buena Práctica Clínica (BPC)**. Las BPC son unas normas internacionales de calidad ética y científica referida a la investigación con seres humanos para diseñar, implementar y reportar ensayos clínicos, de forma que exista una garantía pública respecto a la validez de los datos y de que los derechos, integridad y confidencialidad de los sujetos participantes han sido protegidos (216). La Buena Práctica Clínica es un estándar ético, internacional y de calidad científica para diseñar, realizar, registrar y reportar estudios que involucran la participación de seres humanos. El cumplimiento con este estándar proporciona una garantía pública de que los derechos, el bienestar de los seres humanos y su seguridad en el estudio están protegidos, acorde a

los principios que tienen su origen en la Declaración de Helsinki³² y, además confirma que los datos clínicos del estudio son creíbles.

4.3 Selección de Pacientes

Se revisaron los registros de las historias clínicas de los casos consecutivamente diagnosticados de carcinoma de mama infiltrante con afectación ganglionar al diagnóstico, en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre el 1 de Enero de 1995 y el 31 de Diciembre de 2000. Los estudios histológicos y genético-moleculares se realizaron utilizando los bloques de tumor incluidos en parafina del archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre. Solo se incluyeron pacientes con muestra disponible. Las muestras fueron revisadas por un patólogo del centro que confirmó el diagnóstico. Se incluyeron en el estudio los pacientes con resecciones tumorales completas, independientemente del tratamiento adyuvante posterior, en que existía tejido tumoral suficiente conservado en parafina y seguimiento clínico actualizado para realizar todos los análisis previstos.

4.3.1 Criterios de Inclusión:

1. Diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de mama infiltrante. Se define infiltrante cuando el tumor atraviesa la membrana basal.
2. Estadio II-III anatomopatológico según la clasificación TNM (217).

³² La Declaración fue originalmente adoptada en junio de 1964 en Helsinki, Finlandia. La Declaración es un documento en la historia de la investigación ética, que reúne un conjunto de principios éticos y es el resultado del esfuerzo de la comunidad médica para autorregularse, y guiar la experimentación en humanos. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

3. Muestra conservada en parafina disponible.
4. Tratamiento óptimo, definido como:
 - a. Mastectomía o tumorectomía con márgenes quirúrgicos libres de infiltración. Se considera mastectomía simple o total la exéresis de toda la glándula mamaria y el complejo de la areola-pezones. Los márgenes quirúrgicos libres de infiltración implican que no existe afectación microscópica en el borde externo del tejido circundante extirpado por células tumorales. No hay un claro estándar sobre la distancia mínima pero normalmente se consideran libres si al menos hay 1mm de borde libre de estroma fibroadiposo. Se considera margen próximo si el margen es milimétrico, y margen positivo focal si existen menos de 3 focos microscópicos de tumor en contacto con el margen quirúrgico. En caso de que los márgenes sean positivos deberá estar ampliada la cirugía hasta bordes quirúrgicos libres.
 - b. Radioterapia mamaria tras una cirugía conservadora (38,218). Además en caso de mastectomía se considera necesaria la radioterapia en todos los casos de pacientes con tumores mayores de 5 cm y en aquellos con 4 o más ganglios axilares afectados por tumor (219). La dosis correcta de radioterapia es de 45 a 50 Gy de la mama ipsilateral administrada en 25-28 fracciones.
 - c. Hormonoterapia mínima indicada: tamoxifeno durante al menos 5 años en las mujeres premenopáusicas (220), tamoxifeno y/o un inhibidor de aromatasa durante al menos 5 años en las mujeres posmenopáusicas (133,220). Esta indicación de hormonoterapia mínima recogida en nues-

tro estudio es previa a la reciente publicación del beneficio de tamoxifeno a 10 años (221).

d. Esquemas de quimioterapia adyuvante considerados válidos:

i. Esquema CMF (222). Ciclofosfamida 100mg/m² V.O./d1-14, Metotrexate 40mg/m²/IV/d1,d8 y Fluorouracilo 600mg/m² IV/d1,d8.

ii. Adriamicina 75mg/m²/cada 21 días seguida de CMF (223).

iii. AC (Adriamicina, Ciclofosfamida) seguido de CMF (224).

iv. Esquemas con taxanos. No hay un tratamiento estándar con taxanos en cáncer de mama. Se permiten regímenes tanto con paclitaxel (225) como docetaxel (226) cada semana o cada 3 semanas.

5. Seguimiento clínico superior a 60 meses (excepto en casos de recidiva precoz).

6. Ausencia de cáncer de mama contralateral.

Las Variables clínicas y anatomopatológicas que se recogieron de manera retrospectiva fueron las siguientes:

1. Fecha de nacimiento;

2. Sexo;

3. Antecedentes familiares oncológicos;

4. Antecedes personales oncológicos;

5. ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) (227) al diagnóstico; **(Anexo 3).**

6. Localización del tumor (mama derecha o mama izquierda);

7. Fecha de la cirugía;

8. Fecha del diagnóstico histológico;
9. Tipo de cirugía; mastectomía total o tumorectomía.
10. Diagnóstico histológico; Carcinoma lobulillar o carcinoma ductal. Descripción de la existencia de carcinoma in situ.
11. Grado tumoral; G1: bien diferenciado. G2: moderadamente diferenciado. G3: pobremente diferenciado
12. Invasión vascular;
13. Estadio patológico;
14. Fenotipo del tumor medido en el Servicio de Anatomía Patológica del centro: RE (positivo/negativo), RP (positivo/negativo), HER2neu (positivo/negativo); Se considera positivo si tiene IHQ 3 cruces y/o FISH + (Hibridación in situ con fluorescencia).
15. Índice proliferativo;
16. Presencia o ausencia de carcinoma in situ;
17. Infiltración de bordes quirúrgicos;
18. Compromiso extracapsular;
19. Afectación axilar. Deberán estar disponible el número de ganglios aislado y el número de ganglios afectados.
20. Estado menopáusico de la paciente. Es un diagnóstico clínico considerando postmenopausia la ausencia de menstruación en los 12 meses previos al diagnóstico;
21. Radioterapia adyuvante. Se consideraron sólo las pacientes que recibieron radioterapia estándar del centro;
22. Quimioterapia adyuvante. Número de ciclos y tipo de quimioterapia; fecha de inicio y fin de la quimioterapia adyuvante.

23. Hormonoterapia adyuvante y tipo;
24. Tratamiento adyuvante con anticuerpos monoclonales;
25. Fecha de la recidiva;
26. Lugar de recidiva;
27. Tratamiento de primera línea hormonal en la recidiva y respuesta al mismo;
28. Supervivencia libre de progresión en 1ª línea hormonal;
29. Tratamiento de primera línea de quimioterapia en la recidiva y respuesta al mismo;
30. Supervivencia libre de enfermedad (SLE): tiempo transcurrido desde la cirugía del tumor de mama hasta la recaída local o a distancia de la enfermedad;
31. Supervivencia global (SG): tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta el fallecimiento de la enferma por cualquier causa.
32. Situación al final del seguimiento y última fecha de seguimiento.

4.4 Criterios para la Selección de Muestras

Inicialmente se seleccionaron 19 muestras de tumores de mama conservadas tanto en fresco (FF) (congelación) como en parafina (FFPE) para testar los miARNs de secuencia disponible comercialmente en el momento del diseño del estudio, con el objeto de comparar los resultados de análisis de expresión de miARNs para las diferentes formas de conservación del tejido en un mismo tumor.

De cada muestra tumoral incluida en parafina de los casos restantes (hasta completar 172 muestras) se obtuvieron secciones de tejido que se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para analizar al menos 20 campos de carcinoma invasivo (objetivo 40x).

Se realizó el estudio de inmunohistoquímica para receptores hormonales, Ki-67³³ y HER2 de todos los casos en que no se hubiese realizado previamente. Para el estudio de receptores hormonales se empleó el anticuerpo 6F11³⁴ (Novocastra, Newcastle-upon Tyne, UK) (228) dirigido frente al receptor de estrógeno α y el ³⁵PGR-1A6 para el receptor de progesterona (Ventana, Tucson, AZ). El índice de proliferación se determinó mediante el anticuerpo MIB1³⁶.

El análisis de expresión del HER2 se hizo mediante la medición semicuantitativa por el método HercepTest TM (Dako)³⁷. En los casos en que dicha valoración fue dudosa (++) , se realizó el estudio de la amplificación del gen HER2 mediante la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (Dako) mediante el análisis de la expresión de al menos 20 núcleos celulares de cada muestra analizada. Se consideró positivo el resultado en los casos en que el ratio de núcleos amplificados frente a no amplificados era superior a 2:1.

³³ Ki-67 es un gen que codifica una proteína nuclear asociado con la proliferación celular (Gerdes, J., 1986).

³⁴ El anticuerpo monoclonal receptor de estrógenos (6F11) está destinado a utilizarse en la identificación cualitativa por microscopía óptica del receptor de estrógeno (RE) humano en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, mediante tinción histoquímica. El clon de receptor de estrógeno 6F11 [ER(6F11)] se une específicamente al antígeno ER ubicado en el núcleo de las células ER positivas normales y neoplásicas (Kaplan, 2005).

³⁵ El anticuerpo monoclonal PGR-1A6 pertenece a la clase IgG1 (inmunoglobulina) y fueron diseñados para la detección del receptor de progesterona ya sea en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina o en secciones de tejidos congelado.

³⁶ El anticuerpo MIB1 es un anticuerpo dirigido contra la proteína Ki-67.

³⁷ HercepTest TM es una técnica inmunohistoquímica semi-cuantitativa utilizada para la determinación de la proteína HER2 y la sobreexpresión en tejidos de cáncer de mama procesados rutinariamente para la evaluación histológica y fijado con formalina. HercepTest TM específicamente demuestra la sobreexpresión de la proteína HER2.

4.5 Procesamiento de las Muestras

4.5.1 Aislamiento del ARN total

A partir de las secciones de los tejidos teñidas con H&E fueron seleccionadas para los estudios muestras con más de un 70% de contenido en células tumorales. Para la extracción del ARN se cortaron entre 5 y 10 secciones seriadas de 10 micras según el tamaño de la biopsia. Las muestras FFPE se desparafinaron mediante lavados con xilol seguidos de lavados con etanol con concentraciones decrecientes (100%, 90% y 70%). El ARN total de las muestras se aisló de las muestras tumorales empleando el RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) para tejido fijado en formalina y embebido en parafina, y el mirVana™ miARN Isolation Kit (Ambion) para muestras en fresco (Ver características del kit en el Anexo 4).

En una primera fase se realizó un estudio preliminar entre las muestras congeladas en fresco y las fijadas en formol e incluidas en parafina. Se analizaron 38 muestras (19 congeladas y sus homólogas parafinadas del mismo paciente) mediante arrays de expresión que utiliza sondas TaqMan.



Figura 5. TaqMan® Human MicroARN Assay Set

Estos Arrays (**Figura 5**) permiten la medición simultánea de un panel de múltiples miARNs humanos y se basan en una RT Multiplex seguida de una reacción de PCR cuantitativa (Anexo 5).

4.5.2 Análisis de la calidad del ARN

El ARN aislado se cuantificó mediante espectrofotometría UV, midiendo la absorbencia a 260 y 280 nm. Así mismo, la calidad de los distintos ARNs fue evaluada a través de electroforesis nativa en geles de agarosa al 1%³⁸.

4.5.3 Síntesis de ADNc

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción partiendo de 1 µg de la fracción de ARN total aislada de las muestras empleando el “TaqMan® MicroARN Reverse Transcription Kits” Applied Biosystems (los kits realizan reacción de RT-qPCR).

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT ® Sequence Detection System (Applied Biosystems). El Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7900HT es un instrumento de detección de segunda generación, diseñado para, de forma automatizada y con alto rendimiento, detectar las reacciones químicas relacionadas con los fluorescentes de la PCR. A través de una plataforma que consta de 384 pocillos de colores diferentes, y mediante la PCR con reactivos de fluorescencia se realiza la detección cuantitativa de secuencias de ácido nucleico en tiempo real.

Se puede realizar una cuantificación absoluta o relativa. Los resultados de un experimento de cuantificación absoluta se expresan en la misma medida utilizada para hacerlos. La cuantificación absoluta utilizando el termociclador 7900HT se lleva a cabo

³⁸ En los ácidos nucleicos la dirección de migración es del electrodo negativo al positivo, y esto es debido a la carga negativa presente en el azúcar-fosfato. En fragmentos simples de de RNA (una sola cadena), dichas moléculas tienden a plegarse de forma compleja y a migrar de forma más complicada, según la estructura terciaria formada tras el plegamiento.

mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa y el ensayo de la 5-fluor-nucleasa (Anexo 6).

En cada uno de los puertos del TaqMan Array se introdujo un volumen final de 100 μL , 50 μL de Taqman Universal PCR Master Mix y 50 μL del ADNc equivalente a 100 ng del ARN total. Las tarjetas contienen pocillos alineados que permiten realizar 384 ensayos en paralelo (**Figura 6**).

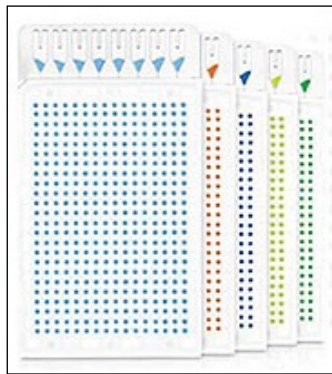


Figura 6. Platos que permiten 384 ensayos

El termociclador recopila datos de fluorescencia en diferentes puntos de la PCR (**Figura 7**). Los puntos de recogida de datos constan de tres fases diferentes:

1. Excitación: se enciende todos los pocillos en la placa de reacción, excitando los fluoróforos en cada reacción.
2. Fase de emisión: la óptica del termociclador recoge la fluorescencia residual emitida desde los pocillos situados en la placa de reacción. La imagen resultante recogida por el dispositivo consiste en los haces de luz que corresponden sólo a la gama de longitudes de onda de emisión.
3. Fase de colección. El termociclador produce una representación digital del residuo fluorescencia recogidos durante un intervalo de tiempo fijo.



Figura 7. Termociclador ABI PRISM 7900 HT

4.5.4 Cálculos para la cuantificación relativa

Se obtuvieron los valores medios de C_q mediante el software SDS 2.4 (Applied Biosystems). El valor máximo de C_q se fijó en 40. Estos valores de C_q fueron anotados en Microsoft Excel 2007³⁹ para cálculos posteriores. Los valores de expresión de miARNs se calcularon mediante el método ΔC_q descrito previamente (229). Los valores de expresión relativa fueron calculados como la diferencia entre el valor de C_q de cada gen y un factor de normalización.

Para la normalización se empleó el método NorMean (230). Este método permite seleccionar genes de referencia basándose en el coeficiente de variación de la expresión de dicho gen de referencia, y en su correlación de Pearson⁴⁰ con la media de expresión de todos los genes (231).

³⁹ Es la versión 12 de Microsoft Excel.

⁴⁰ El coeficiente de variación de Pearson es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Fue desarrollada por Karl Pearson en relación a una idea de Francis Galton en 1880 (Stigler, 1989).

$$a_i = \sum CV_{ij} / \sum r_{ij}$$

Donde CV_{ij} es el coeficiente de variación del gen de referencia i en el material j , y r_{ij} es el coeficiente de correlación de Pearson entre la expresión del gen i y la media de expresión en el material j . Esta ecuación proporciona un valor a que permite ordenar los genes de referencia: aquellos genes control con menor valor son aquellos con la expresión más estable (bajo CV) y mayor correlación positiva con la expresión génica media por muestra. Aquellos genes con correlación $r < 0$ no se considerarían para el análisis de NorMean. A partir de esta clasificación se calcularon los diferentes factores de normalización mediante la inclusión por pasos de genes de referencia y calculando la media geométrica de sus niveles de expresión.

4.5.5 Análisis Estadístico de los perfiles de expresión de miARNs con valor pronóstico

Para evaluar el valor pronóstico de cada modelo basado en expresión de los miARN, se calcularon las curvas de supervivencia mediante las estimaciones de Kaplan-Meier⁴¹ (232) y se compararon los grupos mediante la prueba del log-rank test. También se aplicó un análisis multivariante de Cox⁴² a cada perfil individualmente en un modelo que incluía el grado tumoral, afectación axilar y el tamaño. Los criterios de valoración fueron SLE y SG, como en otros estudios de perfiles génicos previamente realizados en cáncer de mama. Los valores p , se consideraron bilaterales y estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

⁴¹ Estimador no paramétrico de la función de la supervivencia.

⁴² Modelo de los riesgos proporcionales.

4.5.6 Tratamiento de los Datos en los Perfiles de Expresión Génica con Valor

Pronóstico

Trabajos en genes han demostrado que la reducción en el número de genes dentro de los perfiles no tenía impacto en el comportamiento clasificador (233). Para el tratamiento de datos se siguió la metodología previamente empleada por el grupo (230):

- a) En primer lugar se realizó el estudio de 19 muestras. Se seleccionaron aquellos miARNs que se expresaban en FFPE. Se seleccionaron los miARNs con elevada expresión en la muestras. Es decir, con expresión medible en 7 de las 19 muestras.
- b) Después se seleccionaron los miARNs que presentaron una alta correlación en los niveles de expresión entre las muestras de tejido FF y tejido FFPE. Para determinar la concordancia entre los datos de muestras FF y FFPE se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de expresión.
- c) Posteriormente se aplicó un coeficiente de variación sobre la serie de muestras de FFPE mayor del 7%, con el objetivo de encontrar posteriormente diferencias en los resultados de los miARNs analizados.
- d) Aplicando estos 3 criterios se seleccionan los microARNs que configuran el TaqMan Array final que se aplica sobre todas las muestras.
- e) Para el control del proceso, se identificaron los mejores miARNs housekeeping (miARNs de referencia), empleando el método Normean. Se realizaron diferentes modelos para determinar la mejor correlación en las muestras.
- f) Tras seleccionar el grupo de miARNs apropiados que funcionaban como miARNs de referencia se calculó el Factor de Normalización (FN) mediante la media geométrica de los miARNs seleccionados en cada método. Una vez

establecidos los factores de normalización según cada método, se calculó el valor de expresión para cada gen según la siguiente expresión: ΔCq , donde:

$$\Delta Cq = Cq_{miARN} - FN$$

Con la selección final de miARNs se generó un nivel de significación estadística para cada miARN basándose en un modelo de riesgo proporcional univariante (232) con el objetivo de identificar miARNs cuya expresión sea significativa al correlacionarla con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Estos miARNs fueron filtrados posteriormente en base a sus valores de p ($p < 0.005$) y la correlación entre ellos. Se seleccionaron los miARNs con los valores más bajos de p en cada grupo de correlación (234). Estos miARNs fueron seleccionados para desarrollar un modelo de predicción basado en expresión genes. El valor de la p de la prueba de log-rank para el riesgo entre los grupos se evaluó utilizando 1000 permutaciones aleatorias. Los análisis se realizaron en BRB-ArrayTools v3.6.2⁴³ desarrollado por R. Simon y A. Peng (235).

⁴³ BRB-Arrays Tools es un paquete integrado para el análisis estadístico de los datos de expresión de genes de microarrays.

5 Resultados

5.1 Desarrollo y Validación de un Modelo con Valor Pronóstico basado en la Expresión de miARNs en cáncer de mama

5.1.1 Selección de Pacientes. Características clínico-patológicas

Las características clínicas y anatómo-patológicas de las 172 pacientes incluidas en el estudio se describen en la **Tabla 7**. Se siguieron las recomendaciones REMARK (REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies)⁴⁴ para la recolección y descripción de las variables incluidas (236–238).

La mediana de edad fue de 53 años (rango: 27-78). El tumor primario se localizaba en la mama derecha en 77 pacientes (44.5%) y 95 (54.9%) en la izquierda. No hubo pacientes con tumores bilaterales.

La cirugía local que se realizó fue conservadora en 65 pacientes (37.6%) frente a radical en 107 (61.8%). En 57 pacientes (32.9%) se confirmó afectación extracapsular de los ganglios de la axila. Sólo se dispone de datos sobre la infiltración de bordes quirúrgicos en 67 pacientes, de las que sólo 2 (1.2%) tenían bordes positivos y en las que se amplió la cirugía según el protocolo del centro hasta conseguir márgenes quirúrgicos negativos.

Sesenta y siete pacientes (38,7%) tenían tumores pobremente diferenciados frente a un 62,3% que tenían tumores moderadamente o bien diferenciados. En el tejido tumoral se objetivó la presencia de carcinoma in situ en 51 pacientes (30%) (**Figura 8**).

⁴⁴ Recomendaciones para reportar estudios de marcadores tumorales pronósticos.

Tabla 7. Características principales de las pacientes

Variable	Número de pacientes (%)
Edad	Mediana: 53 (Rango 27-78)
Sexo	Mujeres 172 (100%)
T	
1	52 (30,1%)
2	93 (53,8%)
3	22 (12,7%)
4	4 (2,3%)
N	
1	99 (57,2%)
2	54 (31,2%)
3	19 (11,0%)
M0	172(100%)
Grado	
1	14 (8,1%)
2	59 (34,1%)
3	67 (38,7%)
X	33 (19,1%)
Fenotipo	
Luminal A	50 (29,0%)
Luminal B	50 (29,0%)
Her2/RE+	30 (17,5%)
Her2/RE-	23 (13,4%)
Tripe negativo	19 (11,0%)

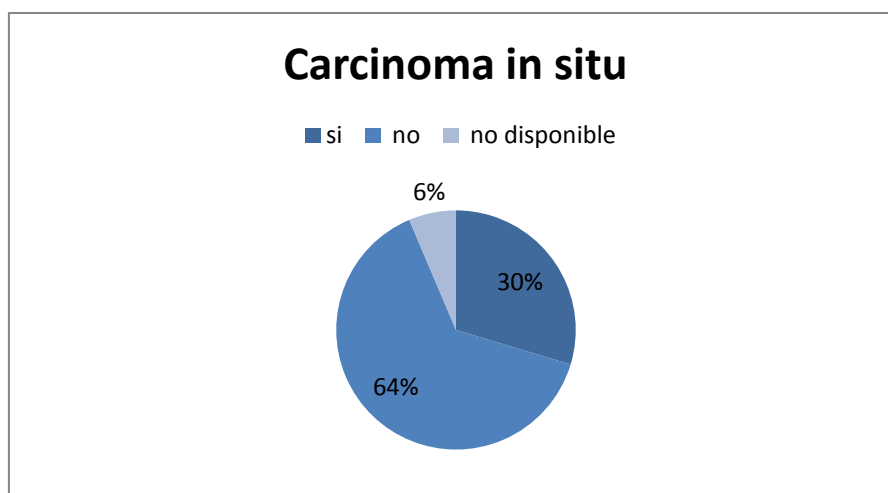


Figura 8. Presencia de carcinoma in situ en la muestra

La distribución del tamaño tumoral se puede observar en la **Tabla 7**. Todas las pacientes tenían afectación axilar al diagnóstico: N1 99(57%), N2 54(31,2%), N3 19(11%).

Ciento treinta (75.1%) pacientes tenían receptores hormonales positivos. La sobreexpresión de HER2 fue negativa en 75 pacientes (43.4%), HER2 + en 37 (31.4%), HER2++ en 7 pacientes (4.0%) y HER2+++ en 53 pacientes (30.6%). En las pacientes HER2++ (7 pacientes) y en 2 pacientes con HER2+++ se confirmó el resultado mediante técnica FISH en las que el test resultó negativo en 8 (4.6%) y en una paciente se confirmó la positividad (0.6%) de HER2. La expresión de Ki67% se representa en la **Figura 9** y los porcentajes de subgrupos moleculares se presentan en la **Figura 10**.

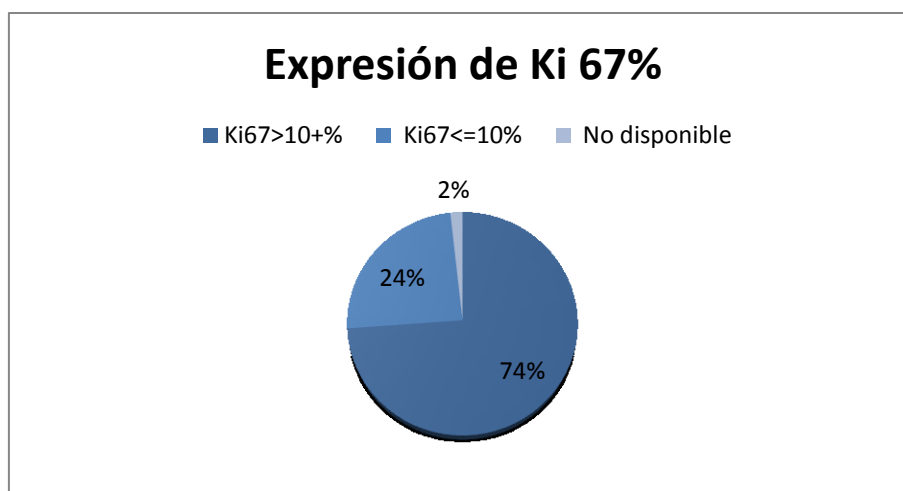


Figura 9. Expresión de Ki-67 por IHQ

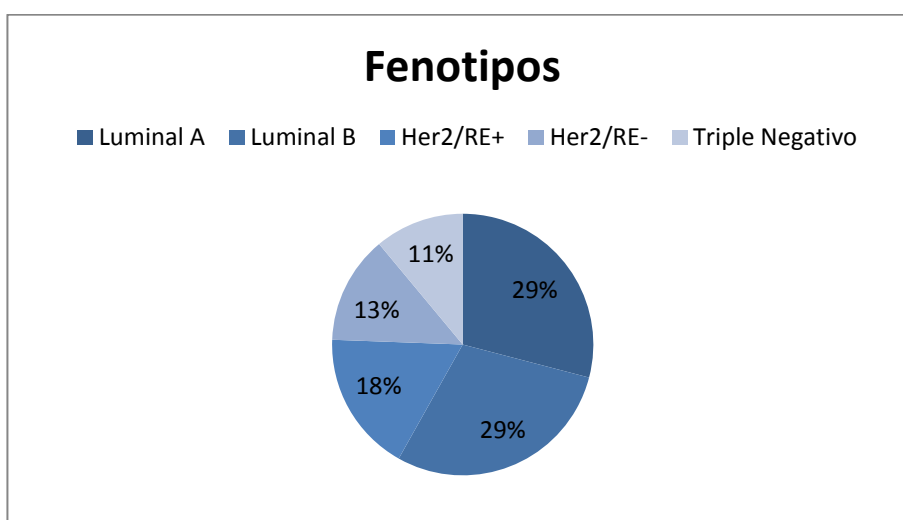


Figura 10. Subgrupos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo

De la población a estudio, 76 (43.9%) pacientes eran pre-menopáusicas al diagnóstico frente a 96 (55.8%) que eran postmenopáusicas. El tratamiento hormonal adyuvante que recibieron las pacientes con receptores hormonales fue el siguiente: 55 pacientes (31.8%) recibieron tamoxifeno, 6 (3.5%) pacientes anastrozol, 2 (1.2%) letrozol, 36 (20.8%) recibieron la secuencia tamoxifeno-letrozol, 9 (5.2%) recibieron la secuencia tamoxifeno-exemestano, y 6 (3.5%) tamoxifeno combinado con análogo LH-RH. La duración de la hormonoterapia fue de 5 años porque la cohorte no incluía pacientes des-

pués del 2007. Además no se aplicó ningún perfil genético de predicción del riesgo a las pacientes por los mismos motivos.

El tratamiento quimioterápico adyuvante que recibieron las pacientes fue el siguiente: 9 (5.2%) pacientes no recibieron ninguna quimioterapia, 42 (24.3%) pacientes recibieron esquemas sin antraciclinas (fundamentalmente esquema CMF ya descrito), 106 (61.3%) recibieron un esquema con antraciclinas (AC seguido de CMF, adriamicina seguido de CMF y esquemas con epirrubicina, fundamentalmente FEC), y 15 (8.7%) recibieron tratamiento con antraciclinas y taxanos. El número de ciclos de quimioterapia adyuvante fue variable siendo la mediana de 6 ciclos (rango 1-8). El 75% (131) de las pacientes recibieron tratamiento adyuvante con radioterapia (**Tabla 8**).

Siete pacientes (4.1%) recibieron tratamiento con bifosfonatos (4mg de ácido zoledrónico intravenoso cada 6 meses durante el tiempo que recibieron tratamiento adyuvante).

Con una mediana de seguimiento de 8,8 años, el 41% de los pacientes (71) presentaron recaída a distancia, con resultado de muerte en 41 casos, con pérdida de seguimiento en una de las pacientes que recayeron.

De las 106 recidivas, sólo 19 pacientes tenían confirmación histológica que corresponde al 11% de las recidivas. En una de las pacientes que recidivó se realizó cirugía de rescate (mastectomía derecha y posteriormente la paciente recibió tratamiento adyuvante con letrozol). En todas las demás pacientes se realizó tratamiento con quimioterapia (**Tabla 8**). De toda la población a estudio, 41 pacientes (23.7%) han fallecido durante el periodo de seguimiento.

Dos pacientes tenían antecedentes de otro cáncer (un cáncer de cérvix y un carcinoma papilar de tiroides). Durante el seguimiento de las pacientes, 6 pacientes desarrollaron un segundo tumor: 1 (0.6%) un carcinoma endometriode, 1(0.6%) un carci-

noma de ovario, 1(0.6%) un carcinoma de pulmón, 1(0.6%), un carcinoma de recto, 1(0.6%) un carcinoma de tiroides, y 1(0.6%) un sarcoma de endometrio.

Tabla 8. Tratamientos recibidos

Quimioterapia adyuvante	Número de pacientes (%)
No Quimioterapia adyuvante	9 (5,2%)
QT sin antraciclinas	42 (24,3%)
QT con antraciclinas	106 (61,3%)
QT con antraciclinas y taxanos	15 (8,7%)
Radioterapia	
No	41 (23,7%)
Sí	131 (75,7%)

5.2 Generación de un Perfil Génico Reducido con Valor Pronóstico

No todos los miARNs pudieron ser incluidos en el estudio, probablemente debido a las diferencias de expresión tisular de cada miARN. Para cada uno de los miARNs con expresión positiva se calculó la supervivencia libre de enfermedad a distancia, clasificando a las pacientes en el grupo de riesgo que les correspondería según cada perfil.

5.2.1 Identificación de miARNs medibles en FFPE

En primer lugar el estudio se realizó sobre 19 muestras de la población seleccionadas aleatoriamente. Se seleccionaron aquellos miARNs que se expresaban en FFPE. Dentro de esas 19 muestras analizadas, se seleccionaron inicialmente los miARNs que al menos presentaran expresión medible en 7 de las 19 muestras, esto significa que al menos estuvieran en un tercio de las muestras (exactamente en un

36,8%) generando un modelo robusto. De los 663 miARNs, sólo 245 se expresaban en al menos 7 muestras, lo que supuso una reducción del 63% de los miARNs (**Figura 11**).

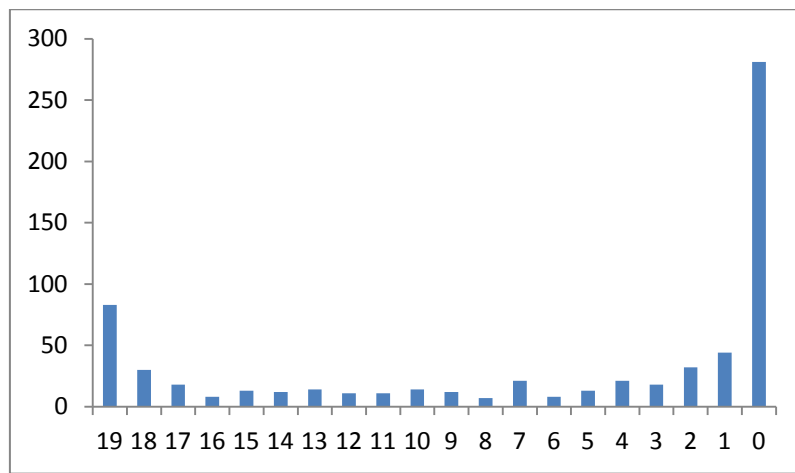


Figura 11. Número de veces detectado los miARNs en las muestras de FFPE

El eje de abscisas representa el número de veces que cada miARN se expresa en las muestras, de tal forma que se observa que más de 250 miARNs no se expresaban en ninguna muestra, probablemente en relación a la variedad tisular, y 80 miARNs aparecían de forma constante en las 19 muestras analizadas. El eje de ordenadas representa el número de miARNs que estará repetido a lo largo de las muestras. De esta forma se observa que hay unos 125 miARNs que aparecen casi de forma constante (suma del 19+18+17), mientras que hay un número de miARNs (unos 80) que tienen una expresión errática (suma de 1+2+3).

5.2.2 Selección de miARNs

Posteriormente se seleccionaron aquellos miARNs que presentaron una alta correlación en los niveles de expresión entre las 19 muestras de tejido FF y tejido FFPE. Para determinar la concordancia entre los datos de muestras FF y FFPE se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de expresión. De los 245 miARNs la correlación era aceptable para 161 miARNs basado en el modelo de miARNs con el mismo comportamiento (**Figura 12**).

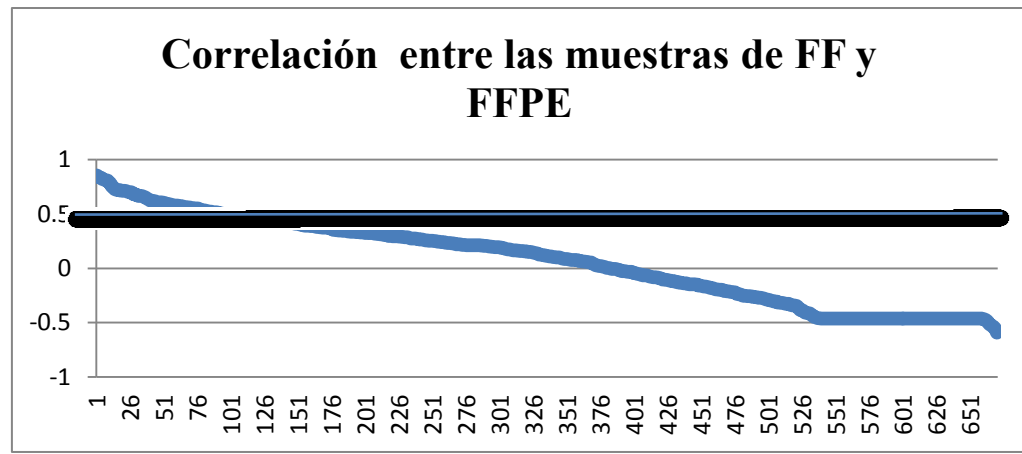


Figura 12. Representación de la correlación entre las muestras de FFPE y FF

Por último se aplicó un coeficiente de variación en la serie de muestras de FFPE mayor del 7%, para poder encontrar posteriormente diferencias en los resultados analizados. La **Figura 13** muestra la aplicación del coeficiente de variación.

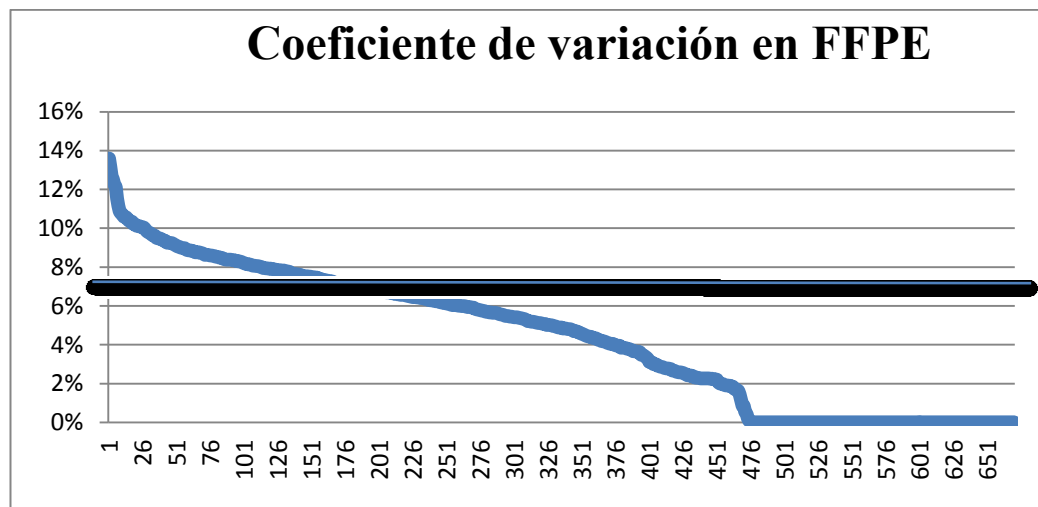


Figura 13. Representación del coeficiente de variación en FFPE

Para la selección de los microARNs que van a configurar el TaqMan Array final se aplicaron, por tanto, estos 3 criterios: 1) frecuencia: miARNs que estuvieran presentes en al menos 7 de las 19 muestras; 2) correlación: miARNs con una buena correlación entre las muestras de FF-FFPE; 3) variación: miARNs con un coeficiente de variación mayor del 7% entre las muestras de FFPE. De esta forma se seleccionaron 91

miARNs para medirlos en las 172 muestras. Esto representa una reducción del 86% de los miARNs iniciales.

5.2.3 Normalización de la expresión de los miARN

Tras seleccionar el grupo de miARNs apropiados que funcionasen como miARNs de referencia se calculó el Factor de Normalización (FN) mediante la media geométrica de los miARNs seleccionados en cada método (Ver metodología 5.4.5). Una vez establecidos los factores de normalización según cada método, se calculó el valor de expresión para cada gen según la siguiente expresión: ΔCq , donde:

$$\Delta Cq = Cq_{miARN} - FN$$

5.2.4 Identificación de los mejores housekeeping⁴⁵

Un punto determinante en todo análisis cuantitativo con RT-PCR es la de utilizar genes “housekeeping”. Las características generales de los genes housekeeping es que se expresen en todas las células, de forma constante para poder asegurar un control interno en el proceso. En este estudio se identificaron los 4 mejores miARNs housekeeping (miARNs de referencia), empleando Normean. Para determinar el número de miARN housekeeping se hicieron modelos con 1, 2, 3, 4,5 y 6 (**Figura 14**).

⁴⁵ Los genes housekeeping son los genes de mantenimiento o constitutivos que se expresan en todos los tejidos.

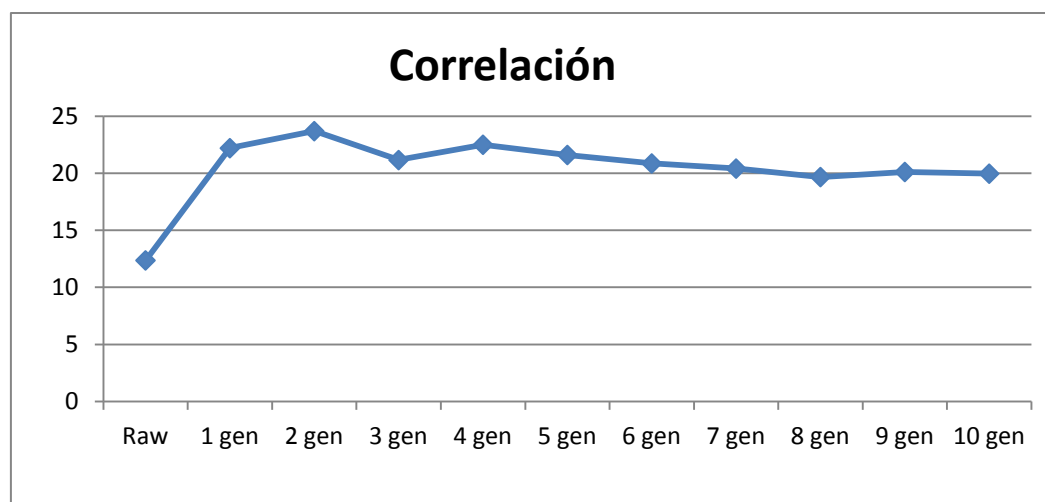


Figura 14. Modelo que muestra la correlación entre FF y FFPE dependiendo del número de housekeepings. Se observa que la correlación es máxima en 2, luego decrece con cada housekeeping. En el estudio se incluyeron 2 genes para la normalización pero por seguridad técnica se incluyeron un total de 4 genes.

Finalmente se incluyeron 4 por seguridad en el proceso pero sólo se utilizaron 2 para hacer la normalización. El análisis final se realizó en 91 miARNs seleccionados más los 4 miARNs de referencia para el control interno más 1 miARN control mandatorio. En cada tarjeta se analizaron 2 pacientes. Se empleó una configuración personalizada de TaqMan Arrays de 384 ensayos correspondientes a 2 pacientes estudiados por duplicado.

5.3 Generación de modelos pronósticos

Se seleccionó un modelo basado en la expresión de 8 *miARNs* porque fue el que generó un modelo pronóstico más funcional. El *Perfil de 8 miARNs* fue calculado para cada muestra utilizando las medidas de expresión normalizadas.

Para definir un punto de corte que estratificara a las pacientes según su riesgo de recaída se utilizó la herramienta bioinformática BRB Array Tools de manera que el 60% de las pacientes quedaran en el grupo de bajo riesgo. El valor p del log-rank test usado para calcular el riesgo de recaída entre los grupos de riesgo basado en 1.000 permuta-

ciones fue de 0,018. El perfil de 8 miARNs está formado por *miR-21*, *miR-93*, *miR-99b*, *miR-572*, *miR-210* actuando como oncogenes y por *miR-30e*, *miR-150* y *miR-30a* actuando como supresores tumorales. A continuación se muestran las curvas de Kaplan-Meier para la población completa de los 172 pacientes (**Figura 15**). Se observa que se diferencian claramente 2 grupos con diferente probabilidad de recaída en función del *perfil de 8 miARNs*. Es por ello que se puede asignar un riesgo alto al grupo con alta probabilidad de recaída y se asigna riesgo bajo al grupo de baja probabilidad de recaída.

Curvas de Kaplan-Meier para la población completa (n=172) con una mediana de seguimiento de 8,8 años. La mediana de SLE para las pacientes en el grupo de alto riesgo fue de 5.85 años y no se alcanzó en el grupo de bajo riesgo (HR: 3,75 CI 95%: 2,27-6,19; p<0,0001).

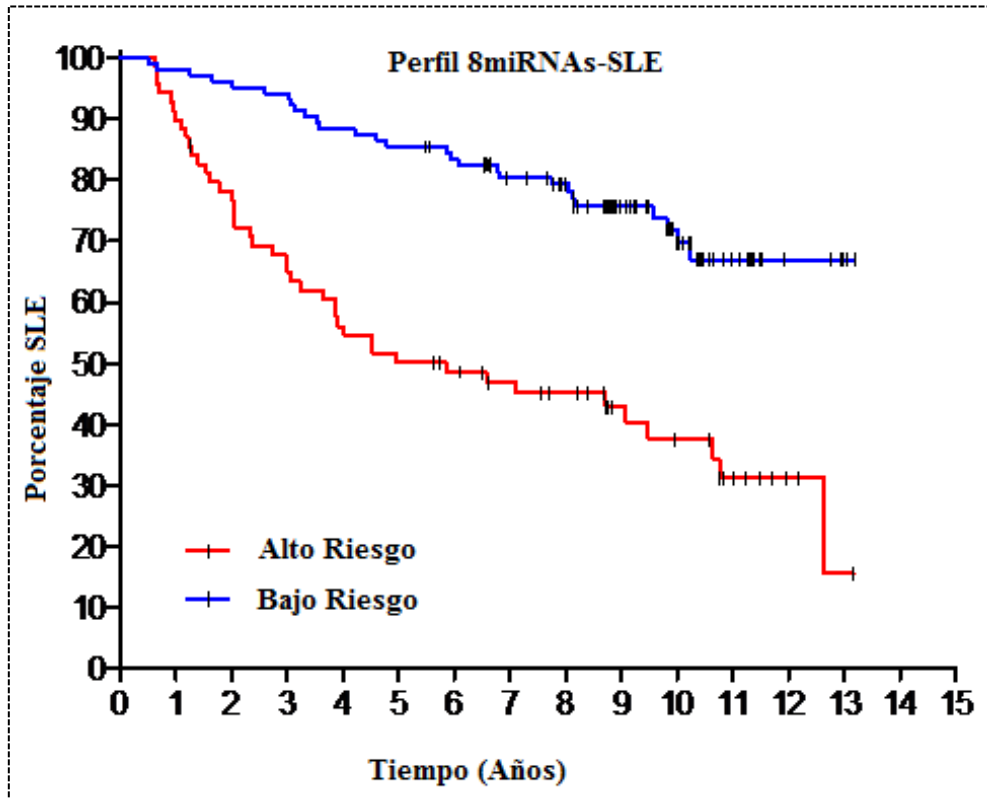


Figura 15. Análisis de supervivencia libre de enfermedad (SLE) para toda la población en función del perfil de 8 miARNs

En el análisis de supervivencia global, los datos también se reproducen y diferencia 2 poblaciones, la de alto riesgo en rojo y la de bajo riesgo en azul (**Figura 16**). La mediana de SG no se alcanzó en ninguno de los subgrupos. La SG a los cinco años para las pacientes en el grupo de bajo riesgo fue 98% frente a 72% para las de alto riesgo (HR: 4,51 CI 95%: 2,6-8,61 $p < 0,0001$).

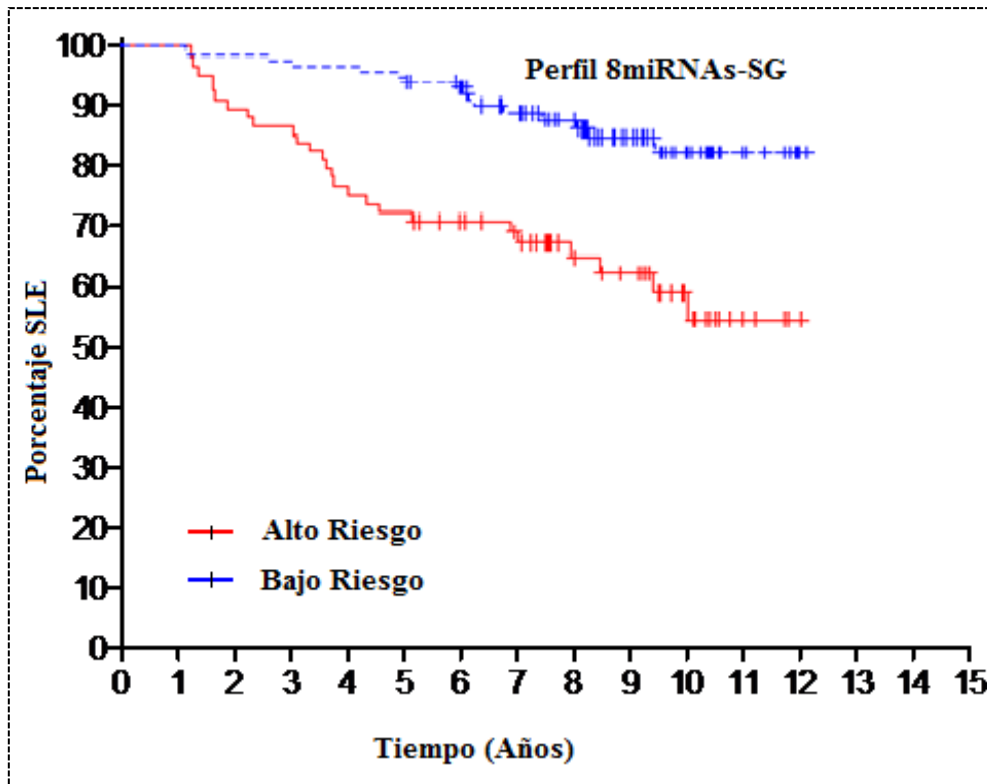


Figura 16. Análisis de supervivencia global para toda la población en función del perfil de 8 miARNs. Curvas de Kaplan-Meier para la población completa (n=172)

También se analizó si el perfil de 8 miARN tenía implicación pronóstica función de los subgrupos moleculares.

Población Luminal A. No se encontraron diferencias durante los primeros 4 años (**Figura 17**). La supervivencia libre de enfermedad a los 8 años es del 78% para el grupo de bajo riesgo y del 30% para el grupo de alto riesgo. La mediana de SLE en el grupo de alto riesgo (n=10) es de 4.95 años y no se alcanzó en el grupo de bajo riesgo (n=40) (HR: 6,71 CI 95%: 1,65-27,52 p<0,0112).

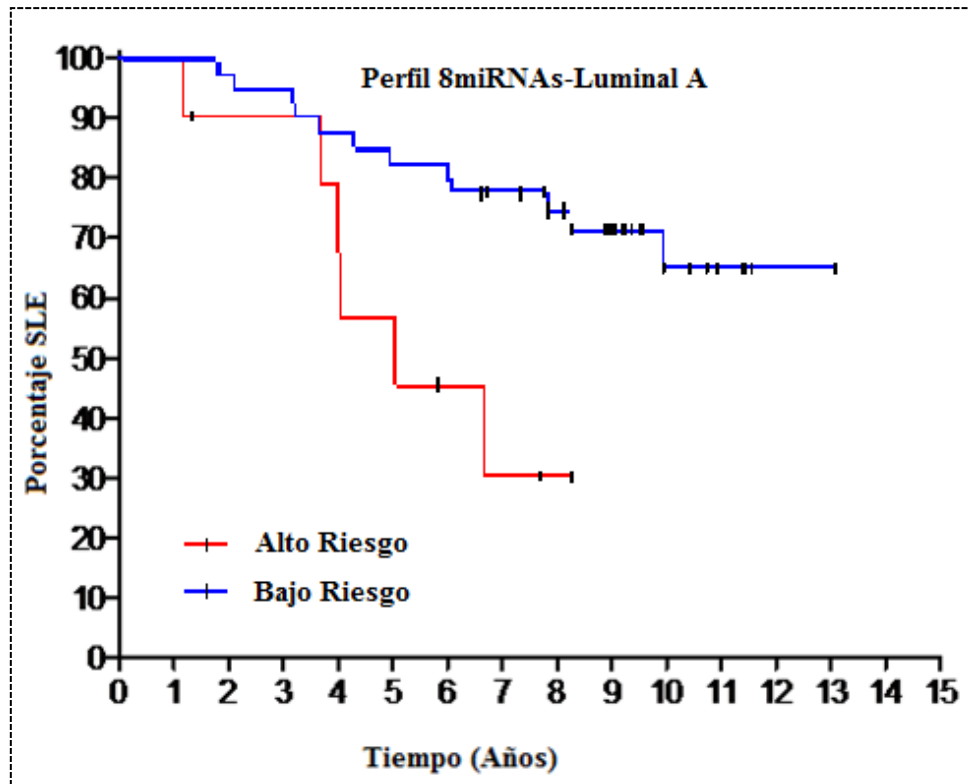


Figura 17. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en la población Luminal A (n=50)

Población Luminal B. En este subgrupo la SLE a los 5 años es del 95% en el grupo de bajo riesgo y del 45% en el grupo de alto riesgo (**Figura 18**). La mediana de SLE en el grupo de alto riesgo (n=15) es de 4.52 años y no se alcanzó en el grupo de bajo riesgo (n=35) (HR: 6,93 CI 95%: 2,14-22,42 p<0,0003).

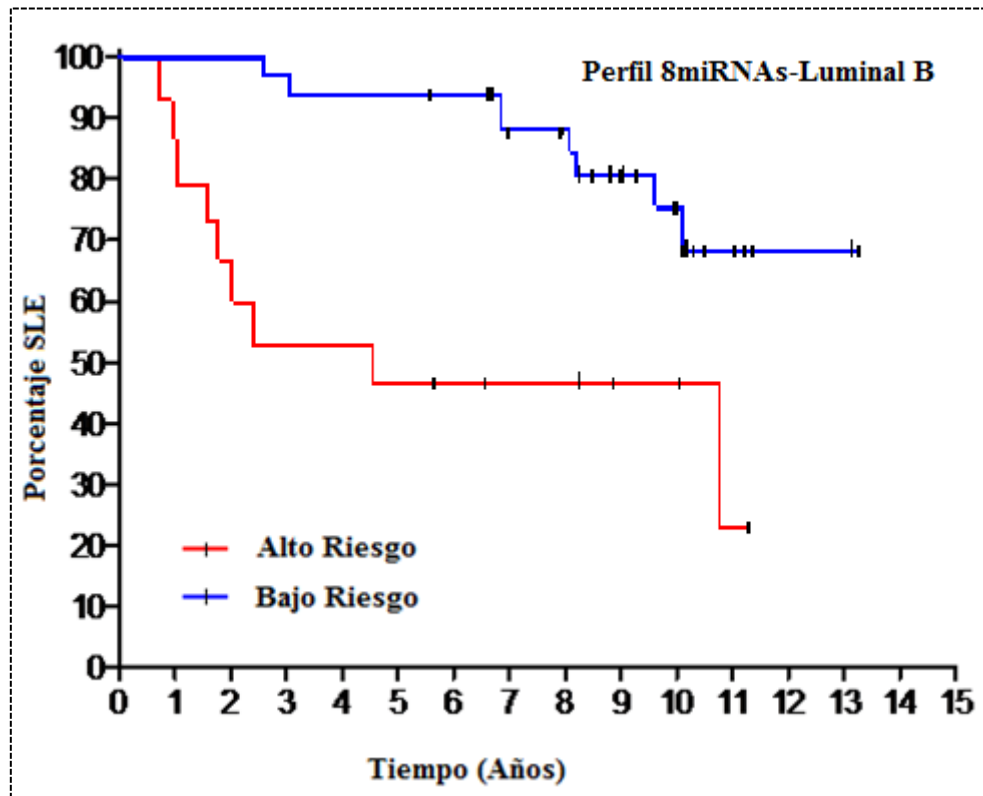


Figura 18. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con fenotipo Luminal B (n=50)

Población con RE-. En el subgrupo de pacientes con RE-, la mediana de SLE fue de 7.01 años para el grupo de alto riesgo (n=23) y no alcanzada para el grupo de bajo riesgo (n=18) (HR: 2,62 CI 95%: 0.98-7,026 p<0,061) (**Figura 19**).

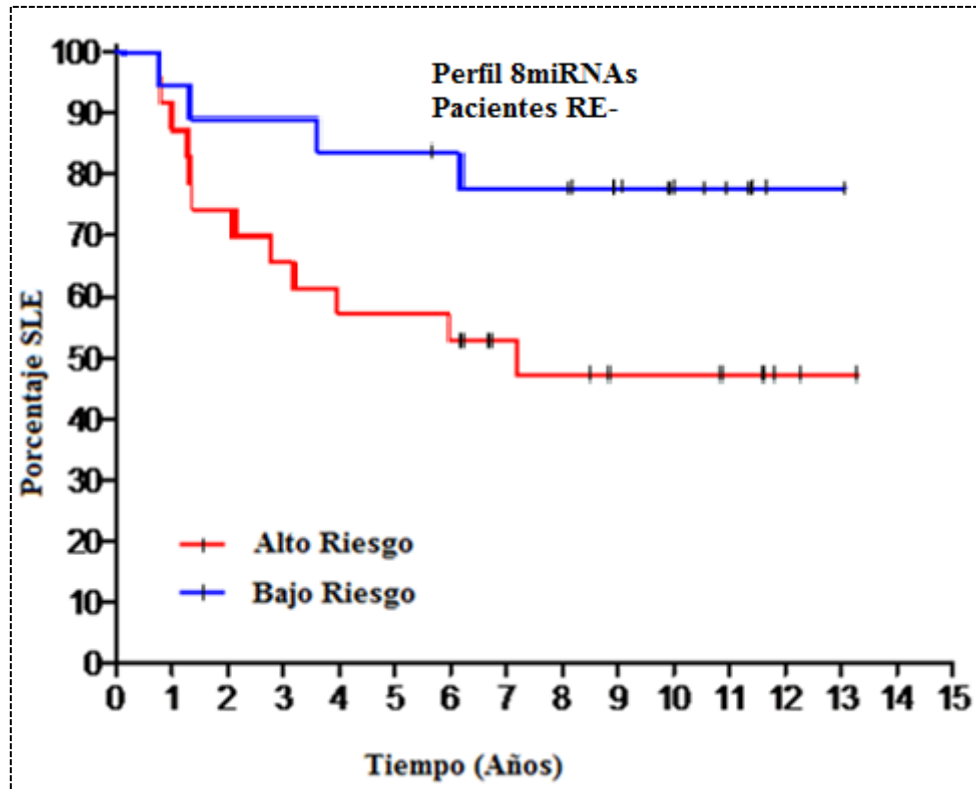


Figura 19. Análisis de la SLE en función del Perfil de 8 miARNs en pacientes sin expresión del receptor estrogénico (n=41)

/

Población HER2-. En esta población las diferencias son más evidentes durante los primeros años con supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 90% y 45% para el grupo de bajo y alto riesgo respectivamente (**Figura 20**). Posteriormente las diferencias se reducen pero siguen siendo significativas con supervivencia libre de enfermedad a los 10 años del 65% y 40% para el grupo de bajo y alto riesgo respectivamente. La mediana de SLE fue de 4.52 años para el grupo de alto riesgo (n=33) y no alcanzada para el grupo de bajo riesgo (n=85) (HR: 6,21 CI 95%: 2,82-13,67 p<0,0001).

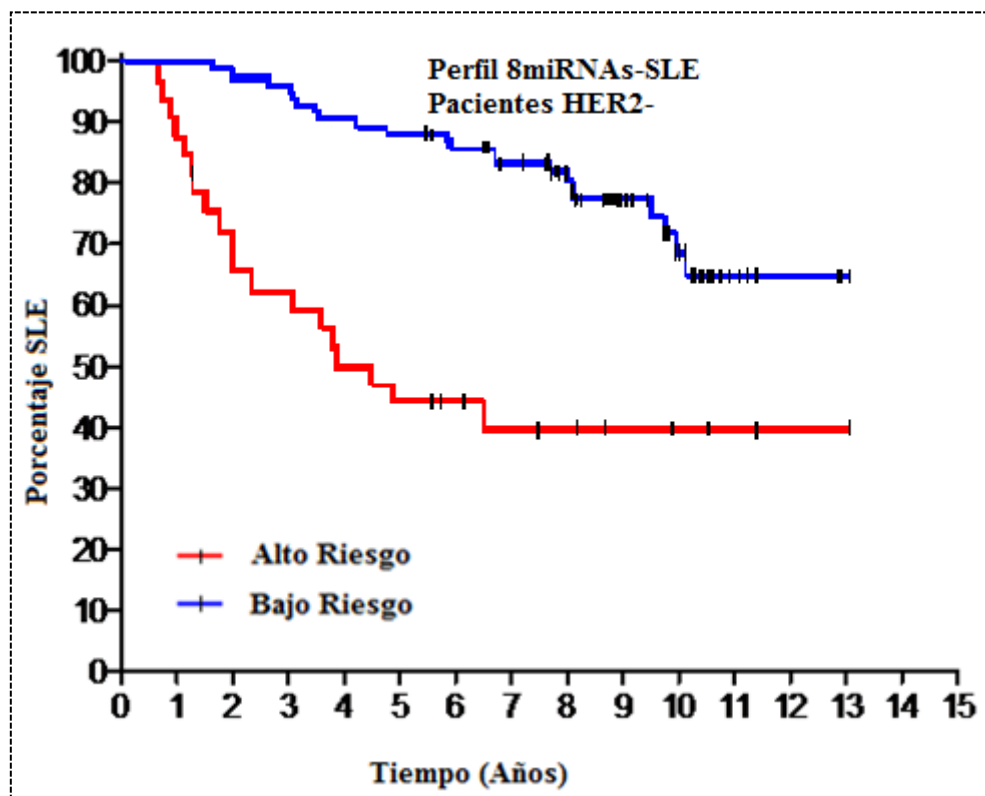


Figura 20. Representa la Supervivencia libre de enfermedad para la población HER2- (n=118)

Población triple negativo. La supervivencia en el grupo de bajo riesgo es del 90% a 4 años, frente al 45% en el grupo de alto riesgo (**Figura 21**). Los datos de supervivencia en esta población se mantienen a los 13 años de seguimiento. La mediana de SLE fue de 3.08 años para el grupo de alto riesgo (n=9) y no alcanzada para el grupo de bajo riesgo (n=9) (HR: 5,87 CI 95%: 1,13-30,27 p<0,028).

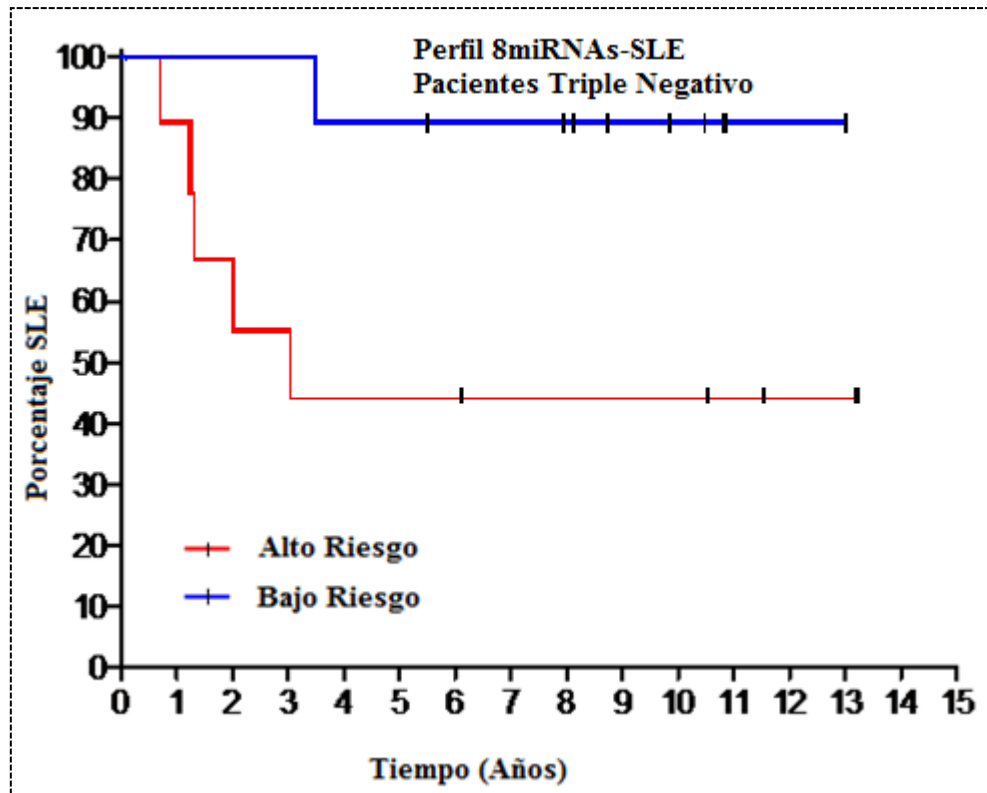


Figura 21. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con fenotipo triple negativo

Población HER2+. El perfil diferencia un subgrupo de bajo riesgo con un 70% de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años, frente a solo un 55% en el grupo de alto riesgo (n=54) (**Figura 22**). La mediana de SLE fue de 7,1 para el grupo de alto riesgo (n=36) y no alcanzada para el grupo de bajo riesgo (n=18) (HR: 2.17 CI 95%: 1,033-4.559 p<0,040).

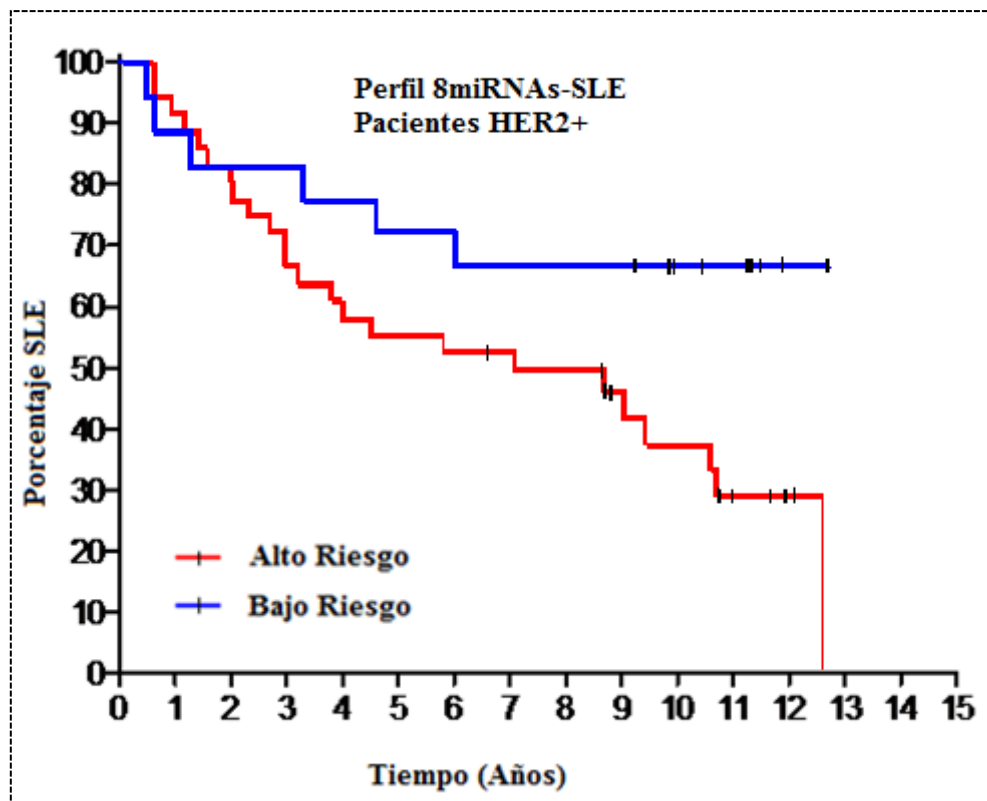


Figura 22. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes HER2+

Subpoblación RE+/HER2+. La SLE a los 5 años en este subgrupo es del 45% en el grupo de alto riesgo y un 70% en el grupo de bajo riesgo (**Figura 23**). A los 10 años, la SLE para el grupo de alto riesgo es de un 25% y el grupo de bajo riesgo se mantiene una SLE del 70%. La mediana de SLE fue de 4,28 años para el grupo de alto riesgo (n=10) y no alcanzada para el grupo de bajo riesgo (n=20) (HR: 2,98 CI 95%: 1,18-7,49 p<0,065).

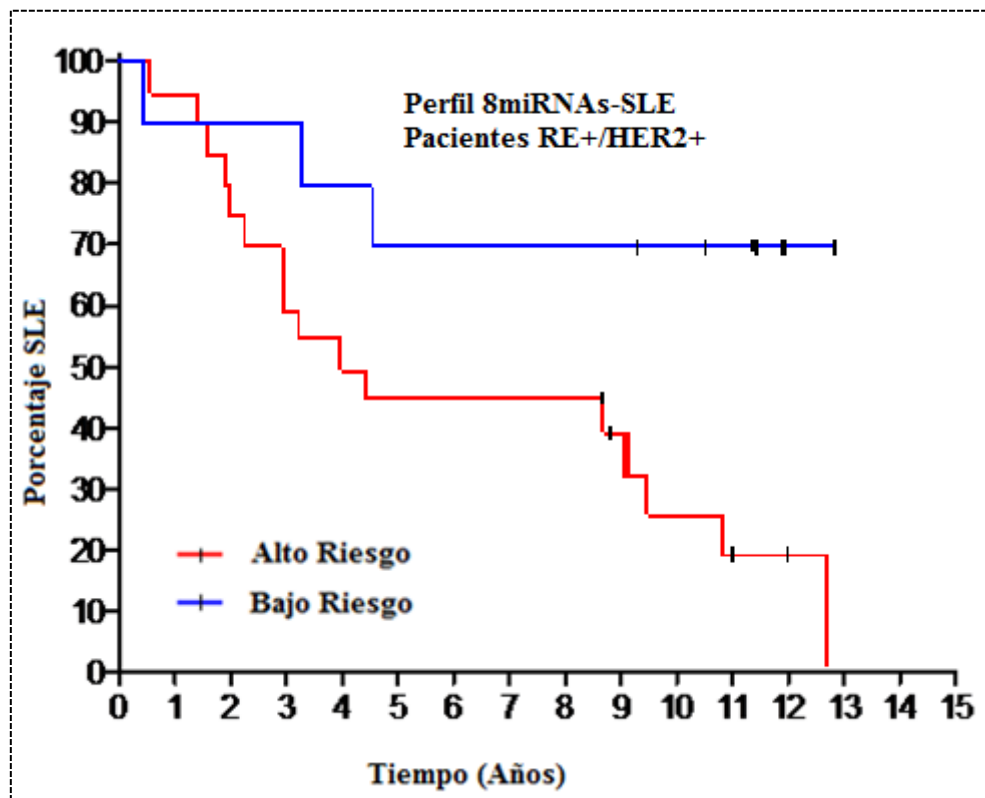


Figura 23. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con RE+ y HER2+ (n=30)

Población RE-/HER2+. En este subgrupo, la SLE a los 5 años es del 65% en el grupo de alto riesgo y un 75% en el grupo de bajo riesgo (HR: 1,29 CI 95%: 0,35-4,75 $p<0,1$). (Figura 24).

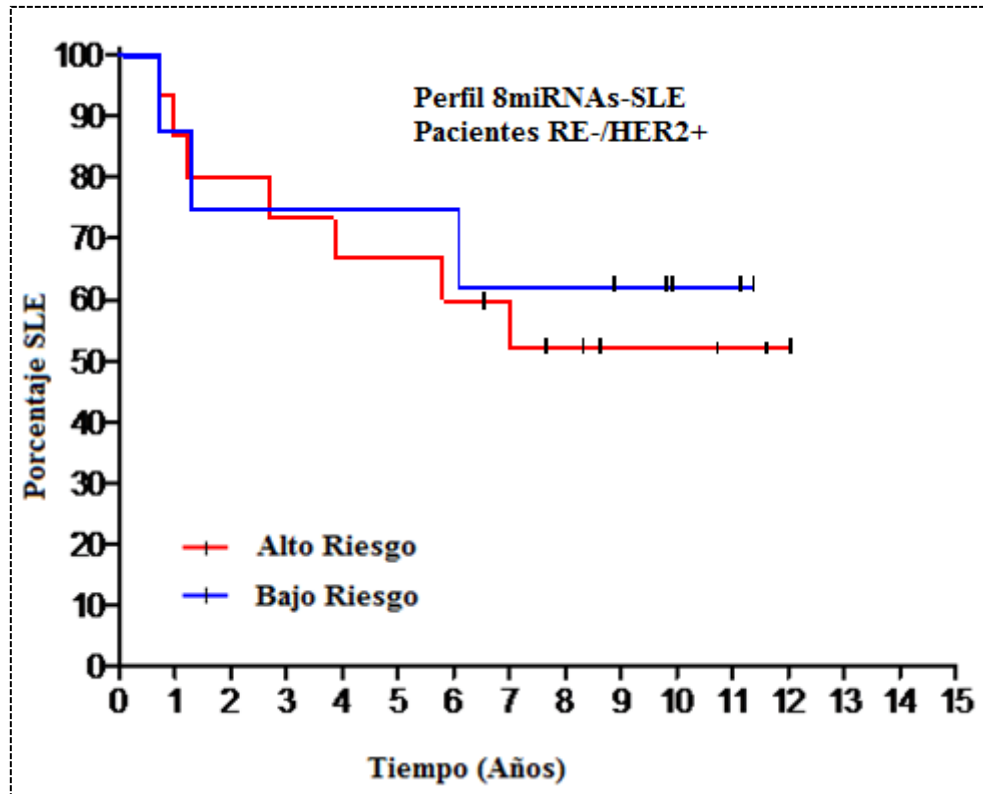


Figura 24. Representa el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con RE- y HER2+ (n=23)

En la muestra analizada, el *Perfil de 8 miARNs* y la afectación axilar se comportaban como variables independientes en el análisis univariante y multivariante (Tabla 9).

Tabla 9. Variables con valor pronóstico

Factor pronóstico	Chi square	Df	P value
Afectación axilar	16,357	2	<0,0001
Tamaño tumoral	4,22	2	0,12
Grado	3,13	2	0,20
@8miRScore	26,78	1	<0,0001

5.4 Meta-validación

Se realizó una validación del modelo en una base de datos pública para determinar con mayor independencia el valor pronóstico del *Perfil de 8 miARNs*. La población en la que se validaron los datos estaba formada por 152 casos de cáncer de mama primario localizado, con libre acceso en *GEO datase* (número de acceso GSE37405) (231). Esta población estaba formada sólo por tumores con RE+, en pacientes postmenopáusicas y tratadas con tamoxifeno adyuvante durante al menos 3 años (240). A pesar de ser una población idéntica de nuestra población estudio, el *Perfil de 8 miARNs* demostró comportarse como un factor pronóstico en esta base de datos independiente (HR: 5.5 CI 95%: 2,773-14,71 $p < 0,001$) (Figura 25).

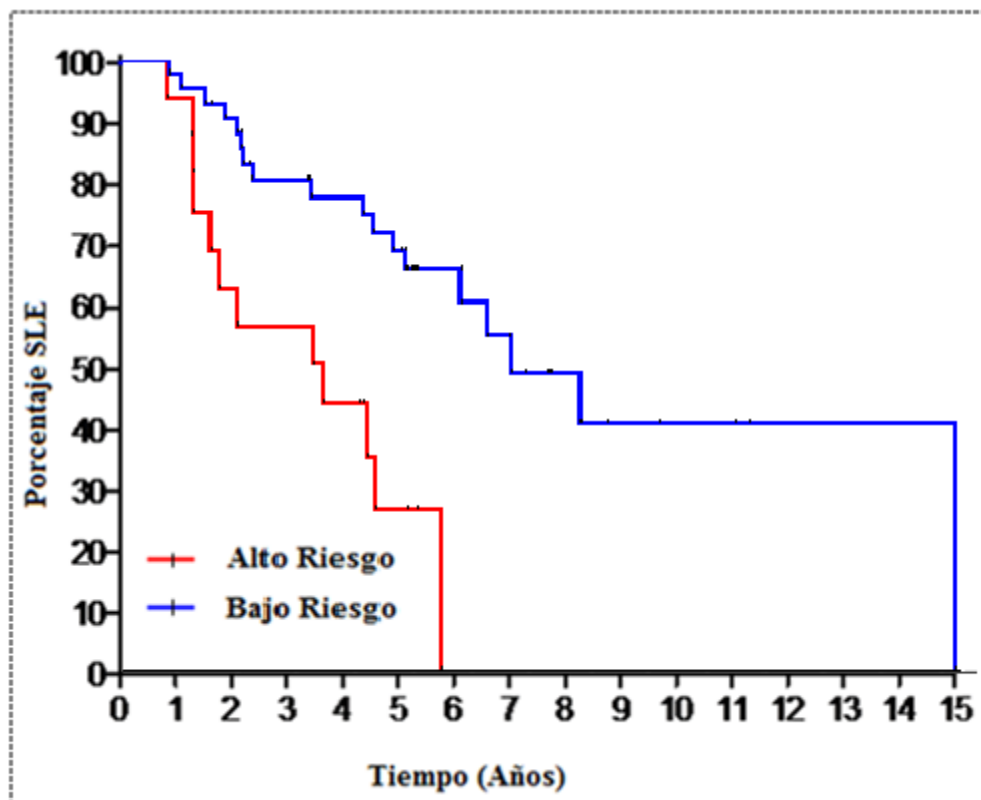


Figura 25. Representa el análisis de la supervivencia libre en la población de validación con RE+

6 Discusión

6.1 Introducción

El desarrollo de las nuevas tecnologías aplicadas a la medicina y en concreto su aplicación al cáncer, tiene un objetivo inequívoco: aumentar la supervivencia. El cáncer de mama por características socio-epidemiológicas es uno de los tumores donde más se ha avanzado en conocimiento molecular, siendo un ejemplo de la aplicación de la investigación genómica a la clínica. En las últimas décadas se ha presentado un avance importante en la individualización de los tratamientos (241). El concepto de oncología personalizada y el entusiasmo por un tratamiento “a medida” surge del mayor conocimiento de la biología molecular aunque en el futuro será necesario para poder afrontar un modelo económico sostenible (242). Las ciencias aplicadas y el sistema de desarrollo de nuevos fármacos van en paralelo a un incremento continuo del coste global de los pacientes con cáncer. Aunque se están consiguiendo grandes avances en el gasto sanitario en términos relativos, los costes sanitarios totales están aumentando de manera alarmante para poder mantener un equilibrio socioeconómico (243). Los nuevos estudios deben dirigirse no sólo a seguir aumentando la supervivencia de todos los pacientes con cáncer sino a buscar modelos sostenibles que permitan mejorar la supervivencia con estrategias más eficientes.

La caracterización del genoma ha permitido comprender mejor los mecanismos básicos del desarrollo tumoral, ayudando a definir los grupos pronósticos y avanzar en el desarrollo de tratamientos dirigidos (241). El progreso global en cáncer es impresionante, pero en términos de supervivencia es todavía muy limitado, las tasas de defunción en cáncer han variado mínimamente en los últimos 20 años en comparación con la reducción en las enfermedades cardiovasculares (244). En cáncer de mama, el progreso

se refleja en una supervivencia global cercana al 90%: empezando con una detección precoz, un acercamiento multidisciplinar y una terapia más dirigida. Aunque por otro lado sigue representando que, a pesar de todos los avances, aún existe un 10% de mujeres que se diagnostican con tumores de mama metastásicos y que son incurables, y por ende, mueren directamente por el cáncer de mama. Es un reto llegar a situaciones como la leucemia mieloide crónica donde se ha conseguido remisión completa en casi el 96% de los pacientes (245).

El marco ideal como solución global al cáncer es la prevención. Ser capaces de idear una estrategia primaria que pudiera evitar el desarrollo del tumor debería ser el epicentro de las investigaciones. El segundo escalón para aquellos pacientes en los que no se ha conseguido evitar el desarrollo tumoral sería conseguir una detección y manejo precoz de la enfermedad (prevención secundaria) (246). El objetivo último en la prevención secundaria sería asignar a las pacientes el tratamiento menos tóxico con el mayor beneficio para evitar la recaída tumoral. ¿Somos capaces de hacer una buena prevención primaria o secundaria? Esa puede ser la clave; desafortunadamente cuando las pacientes tienen tumores de mama avanzados sólo somos capaces de contrarlar la enfermedad durante meses o algunos años y excepcionalmente capaces de curarlo. A pesar de las pruebas irrefutables que respaldan los beneficios médicos y económicos de la prevención y la detección temprana, los esfuerzos actuales de control de la enfermedad carecen de fondos suficientes. Mientras que los costes sanitarios se disparan, la inversión en la prevención se estima en menos del 6% del total de los gastos anuales de salud en países de primer nivel como Estados Unidos (247).

Desde un punto de vista más pragmático, la práctica clínica sigue basándose en un modelo extremadamente simplista: las pacientes se notan un nódulo o las mamografías detectan una lesión, el patólogo la analiza y decide si es tumoral o es normal. Existe

un gran avance técnico: mamografía mejorada, escáner, resonancia, PET-scan con nuevos radiotrazadores o incluso células tumorales circulantes, pero siempre en la misma línea de detectar lo que deberíamos intentar fuera evitable: el desarrollo del cáncer de mama.

La clasificación patológica se ha perfeccionado con las determinaciones de RRHH, HER2 y Ki67, pero probablemente se culmine con el análisis molecular de alto rendimiento. La nueva clasificación genómica ha abierto una puerta a una mayor comprensión de la evolución del cáncer de mama. Sin embargo no hay aplicación al screening, no hay test moleculares precoces capaces de detectar lesiones pretumorales; todavía no hay información suficiente acerca de la secuenciación masiva, interpretación del transcriptoma o aplicación del proteoma para prevenir, detectar o tratar tumores precozmente. La complejidad del genoma y la segmentación molecular hacen extremadamente difícil asignar pronósticos individualistas y sin embargo, herramientas que permitan analizar y, sobretudo interpretar análisis del genoma, o *un perfil de miARNs* puede ayudar a segmentar el pronóstico de los tumores de mama, permitiendo decidir qué pacientes precisan más quimioterapia o qué pacientes precisan un seguimiento más exhaustivo por alto riesgo de recaída.

Asignar un pronóstico individual a cada paciente es uno de los retos más importantes de la medicina personalizada. Este objetivo precisa de modelos sólidos y validados en cada uno de los niveles. Es un hecho indiscutible la importancia de la biología molecular en el cáncer de mama, luego ¿cómo es posible que existiera hasta hace relativamente poco tiempo hasta un 20% de falsos negativos en la determinación del RE, un 15% de falsos positivos en la determinación del RP y un 15% en la determinación de HER2? (248). Las técnicas se van mejorando paulatinamente, pero todavía están lejos de perfección (249). Obviamente, hay muchos factores como la variabilidad, la técnica

o el propio factor humano pero se deben aunar recursos para encontrar estrategias que optimicen los resultados que determinan el tratamiento y evolución de las pacientes.

La siguiente pregunta en la comprensión del cáncer de mama sería ¿por qué es tan difícil tratar el cáncer de mama cuando es metastásico? Como norma, cuando un tumor es metastásico se considera un tumor incurable. El principal problema es que coexisten múltiples complejos factores como la senescencia tumoral o la resistencia intrínseca a quimioterapia. Los tumores metastásicos pueden ser tratados y se pueden controlar por un período razonable de tiempo, pero en general se dispone de un arsenal de fármacos limitado luchando contra un tumor donde predomina la heterogeneidad. Esa heterogeneidad hace necesario la incesable búsqueda de herramientas y técnicas que permitan entender mejor la evolución y la importancia de las diferencias en el propio tumor y con las metástasis. Encontrar elementos que ayuden a identificar por qué los tumores tienen diferentes respuestas a un mismo tratamiento aunque presenten el mismo fenotipo.

La oncología personalizada busca asignar un pronóstico a cada tumor, con sus características biológicas, con un tratamiento adaptado al riesgo exacto de esa paciente. El último fin de la medicina personalizada representa un tratamiento específico para cada tumor en cada paciente.

6.2 Limitaciones del Estudio.

6.2.1 Sesgo de selección de las pacientes

En primer lugar hay que recordar las limitaciones de todo estudio retrospectivo. Estas limitaciones incluyen los sesgos de selección del paciente y de tratamiento. Los datos de las pacientes seleccionadas a las que se les ofreció cada uno de los tratamientos no se pueden definir en retrospectiva aunque se siguieran aparentemente los patrones estándar del momento que se trataron. Existe además un mayor riesgo en la recogida de datos, al no ser un estudio prospectivo. Dentro de las variables que pueden confundir en

la selección de las pacientes es que en la propia selección de cada tratamiento influyeron características clínico-patológicas como la edad o las comorbilidades de las pacientes. Por otra parte todas las muestras provienen de un mismo centro y probablemente no representando toda la población. Algunos de los tratamientos y combinaciones de quimioterapia que recibieron las pacientes no son estándar en el momento actual lo que hace más difícil la interpretación de los resultados.

6.2.2 Sesgo del procedimiento de selección

Para la selección de pacientes, se recurrió al registro de tumores del “Hospital 12 de Octubre”. En los registros pueden existir pérdidas de pacientes derivadas de problemas como pacientes más complejos, pacientes no representadas, pacientes procedentes de otros centros o derivados por distintos motivos que en el momento de realizar el estudio no están disponibles. Este seguimiento que a menudo se desconoce puede incurrir en un sesgo administrativo pero que podría tener asociado una implicación socio-económico-cultural. Aquellas pacientes con menor soporte social o por el contrario proveniente de centros privados pueden no estar representadas. En la selección de pacientes con ganglios positivos, no podemos descartar la inclusión de alguna paciente falso positivo, es decir que no tuviera realmente afectación axilar, artefactando la muestras y excluye algunas de las pacientes de la cohorte que no fueron incluidas por ser un falso negativo en las pruebas exploratorias.

6.2.3 Sesgos de medición

Toda técnica tiene un error de medición, con las técnicas actuales puede existir un error en la medición de receptores hormonales y HER2 de hasta un 20%(248). Este sesgo complica la interpretación de cualquier estudio, siendo más importante cuanto

más pequeña es la muestra. Sin embargo la ventaja del perfil de miARNs del presente estudio es que permite una aplicación global independiente del fenotipo.

6.2.4 Sesgo del tiempo y evolución

El presente trabajo se basa en una cohorte con mujeres diagnosticadas entre los años 1995 y el año 2000. Debemos asumir que el cáncer es una enfermedad dinámica, y lo es de la misma forma que las pacientes. Factores como la obesidad, la dieta o la contaminación pueden afectar a una población y hacerla diferente a lo largo de los años. En el caso concreto de la obesidad en España y en especial la obesidad mórbida se ha incrementado en un 200% desde al año 1993 al 2006 (250). Sabemos que tanto el medio ambiente externo como el micro ambiente interno son determinantes en el desarrollo y la evolución de las enfermedades, y en el cáncer de mama es un factor de riesgo conocido. Por ello deberíamos asumir que hay un riesgo de que el modelo propuesto basado en esta cohorte no fuera completamente amoldable a una población actual o futura.

Por otro lado en el análisis de datos es fundamental entender las variables, los resultados y relacionar cómo se definieron y codificaron las variables. Por desgracia la mayoría de los datos que tenemos, aunque esto ocurre casi siempre en la actualidad, son datos discretos. Pensemos por ejemplo en la anatomía patológica de las muestras de las pacientes. No sabemos realmente si la heterogeneidad de la muestra podría ser diferente en los receptores hormonales o HER2. O incluso, somos incapaces de saber si el tumor tuvo modificaciones moleculares previas a la cirugía que pudieran ser determinantes. Sabemos que el cáncer es algo dinámico, que hay acumulación de mutaciones en genes, cambios en proteínas. Tenemos que intentar entender el cáncer como algo más dinámico en todas sus variantes, incluyendo los miARNs. Demasiadas incógnitas en la ecuación resultado, y por ende en cualquier modelo por robusto y sólido que pueda parecer.

6.3 Análisis y selección del Perfil de 8 miARN

La utilización de la técnica de Taqman qRT-PCR en el análisis de expresión de miARNs ha sido previamente probada y comparada con otras técnicas, como el análisis con microarrays de tejido fresco, con un grado de correlación muy elevado (correlación R^2 del 0.875), siendo superponibles los resultados obtenidos (251). Este método permite la amplificación del ARN de cantidades tan pequeñas como 250 pg de miARN, y por ello es realizable en cantidades muy pequeñas de tejido tumoral. En el estudio, inicialmente se realizó una comparación entre tejido fresco y FFPE. La validación del estudio supone una ventaja añadida ya que permite la utilización de tejido tumoral incluido en parafina (252). La posibilidad de reproducir la técnica en tejido parafinado supone la posibilidad de realizar el estudio en la práctica totalidad de pacientes, de modo que la información clínica a correlacionar es mucho más completa.

La qPCR se considera un estándar para la cuantificación de la expresión génica y ha sido ampliamente utilizado como un método de validación de los estudios de microarrays. Sin embargo, una de las limitaciones es que tiene un rendimiento relativamente bajo, precio relativamente elevado y la técnica precisa mucha elaboración, realizada típicamente en un formato de placas de 96 o de 384 pocillos (253). La tecnología de microfluidos recientemente desarrollada permite un rendimiento significativamente mayor, puede realizar el análisis para un grupo mucho mayor de muestras, reproduce los ensayos en tiempos menores y con un coste inferior (254). Esta técnica ha sido aplicada ya a estudios con miARNs de forma satisfactoria (253).

La normalización de cualquier RT-PCR es uno de los pasos más importantes en el análisis cuantitativo de genes y por ende de miARNs. El objetivo de la normalización es eliminar las variaciones que no son consecuencia del tumor per sé. Estas variaciones pueden ser debidas a la selección de la muestra, la heterogeneidad de la muestra, la es-

tabilización, la extracción del ARN, etc. Idealmente, el housekeeping perfecto sería un ácido nucleico con expresión invariable a través de todas las muestras, que se expresara en las células diana de interés y que se mantuviera estable durante el almacenamiento, la extracción y durante la cuantificación. Aparentemente ese housekeeping no existe (255). Otro punto importante en la identificación de los miARNs housekeeping es la dificultad añadida debido a que representa aproximadamente el 0.01% de la masa total de una muestra de ARN y esta fracción es muy variable (256).

El cálculo del número mínimo de genes en la generación de un modelo es también complicado. Uno de los modelos con los que se trabajó fue un modelo con 12 miARNs que aunque producía un modelo pronóstico robusto probablemente tenía información redundante o solapada y tenía menor impacto sobre la población (HR 2,86; IC95% 1,78-4,60; $p < 0.0001$). Finalmente el modelo de 8 genes era el que tenía un mejor comportamiento y aportaba mayor información sobre la muestra (HR 3,75, IC 95% 2,27- 6,19; $p < 0.0001$).

6.4 Perfil de 8 miARNs con valor pronóstico

Los perfiles moleculares genómicos tienen potencial para cambiar el pronóstico asignado y/o el tratamiento planificado de las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo los escasos test empleados en la práctica clínica, todavía tienen algunas controversias abiertas y los propios médicos no tienen definida completamente su implicación y aplicación de forma estandarizada. En el momento actual, y pese a su empleo no tienen más influencia que los estándares clínicos y patológicos desarrollados en el siglo pasado (257). Los diferentes perfiles genéticos se implantarán y mejorarán en los próximos años. Probablemente se necesite una integración global de todos los procesos celulares y que implique un perfil ampliado considerando la genética, epigenética, proteómica y metabolómica.

Una de las herramientas clave en el avance del conocimiento molecular han sido los microarrays de expresión que permiten realizar múltiples predicciones en un solo experimento. Son capaces de generar al mismo tiempo datos pronósticos y predictivos, reduciendo el coste y mejorando la relación coste-efectividad de estos test (258). Con los progresos tecnológicos deberíamos ser capaces de especificar el riesgo de recaída de un tumor y determinar el beneficio exacto de la terapia endocrina y la quimioterapia por separado.

Muchos de los test genéticos disponibles actualmente, están basados en estudios retrospectivos de cohortes de pacientes. Sólo los estudios prospectivos, dentro de grandes ensayos clínicos aleatorizados pueden aportar suficiente nivel de evidencia para producir un cambio sustancial en la práctica clínica diaria. Sin embargo estos estudios requieren muchos años para conseguir respuestas sólidas y, tanto los pacientes como los clínicos demandan esas respuestas en el presente.

Se propone un modelo pronóstico basado en los niveles de expresión de ocho miARNs (*Perfil de 8 microARNs*) para ser utilizado en mujeres con cáncer de mama con afectación axilar. El índice se ha desarrollado para ser determinado utilizando RT-qPCR a partir de muestras FFPE. Identifica pacientes de alto riesgo de recaída en nuestra serie de pacientes. Este perfil de expresión génica ha sido desarrollado en tumores de todos los subtipos histológicos y aunque algunos subgrupos, como el subgrupo de pacientes HER2, sean minoritarios, se comporta con un factor aparentemente independiente en todos ellos según el modelo generado.

La regulación sistémica genómica permite realizar modelos de redes interconectando los genes y los reguladores de genes como los miARNs. Dependiendo del grado de abstracción y de los datos empíricos hay diferentes sistemas de generación de modelos. Cualquier sistema en la generación de modelos y algoritmos tiene una contrariedad

inevitable; se engloban demasiadas variables, probablemente algunas innecesarias, pero que no se pueden controlar de forma absoluta. La tecnología avanza rápidamente, los modelos computacionales son más robustos, pero la generación de los modelos tiene todavía variables de las que probablemente no somos conscientes. Los algoritmos que aparentemente pueden predecir ecuaciones sencillas, en ocasiones producen confrontaciones de los datos que podrían pasar inadvertidos. Los resultados que se obtienen en estos modelos, son datos matemáticos, datos físicos aplicados a la investigación e implican un riesgo de representar un falso positivo o negativo. Además pueden existir patrones ocultos en datos de expresión génica. Por eso es tan importante la validación de los modelos en diferentes poblaciones para tener más seguridad de los resultados obtenidos.

Después de generar un modelo de miARNs como factor independiente pronóstico, surge la pregunta sobre cuál es la magnitud del beneficio del *Perfil de 8 miARNs* como factor pronóstico. Desde un punto de vista puramente analítico, supone un beneficio absoluto relativamente importante ya que clasifica a las pacientes dicotómicamente en un grupo que implica un pronóstico 4 veces peor (HR 4,02; $p < 0.0001$), pero además desde un punto de vista más conceptual, supone otro importante paso en la subclasificación añadiendo una nueva variable en la ecuación pronóstica de los tumores de mama.

En la población a estudio, el *Perfil de 8 miARNs* identifica dos grupos de pacientes cuya con tasas de SLE y SG claramente diferentes (**Figuras 15 y 16**). Además estas diferencias se mantienen en casi todos los subgrupos (**Figuras 17-23**). La aplicación del Perfil de 8 miARN a cada uno de los diferentes subgrupos puede ser importante porque añade información pronóstica, permitiendo dividir cada subpoblación en un grupo de alto y otro de bajo riesgo. El *Perfil de 8 miARNs* supone una subclasificación sobre la muestra; cada nueva subclasificación y aumento en la caracterización de los tumores

supone un pequeño avance en la futura individualización del tratamiento. Perfiles que producen un comportamiento dual: alto riesgo- bajo riesgo son más aplicables en la práctica real, como ocurre con el test de Mamaprint.

6.5 Meta-validación

La validación de los datos es el proceso por el cual se confirma que los resultados obtenidos se ajustan a las limitaciones y a las normas establecidas para su aplicación. La validación de los datos reduce los errores. Puede confirmar que los resultados son válidos mediante la aplicación del modelo en otro conjunto de datos. La meta validación permite utilizar otras bases de datos de diferente estudios para comprobar los resultados de otros estudios.

La generalización a través de diferentes estudios y la validación debe ser un paso antes de la aplicación generalizada de cualquier descubrimiento. Combinar información de múltiples estudios puede aumentar la rigurosidad, validez y potencia la generalización de los resultados. La producción puede resultar complicada debido a que la información recogida puede ser diferente, no completamente descrita, o sólo publicada información relevante de forma arbitraria. Uno de los inconvenientes es que se pueden añadir algunos sesgos relacionados con el procesamiento de los algoritmos en los estudios originales (259). En grandes estudios es importante analizar la calidad de los datos, en este caso los arrays, para evitar posibles diferencias sistemáticas como puede ser la medida de expresión de un miARN.

Las principales ventajas de la meta validación es la relativa rapidez y la posible comprobación del modelo. Al analizar, las bases de datos con información genómica con libre accesibilidad, hay que prestar especial atención al diseño del estudio que generó los datos; el primer paso ideal es descargar, si están disponibles, todos los datos y repetir la normalización y las comprobaciones de control de calidad para, una vez re-

producido el estudio, realizar su análisis. Es importante que los bioestadísticos sean conscientes de la reproducibilidad de los algoritmos. Con respecto a la interpretación de los resultados, hay que tener en cuenta el poder estadístico de un estudio particular y corregir las múltiples pruebas de hipótesis. Por último, la prueba más rigurosa para evaluar la importancia de estas conclusiones es la capacidad de reproducir los resultados en conjuntos de datos independientes (260).

6.6 Perfil biológico de los componentes del *Perfil de 8 miARNs*

A continuación describo la evidencia científica de cada uno de los miARNs seleccionados en el perfil para mejorar su implicación pronóstica en el marco del cáncer de mama.

6.6.1 *MicroARN-30e* ** *miR-30e*

Localización: 1p34.2

Secuencia: Cromosoma 1; NC_000001.10 (41220027..41220118)

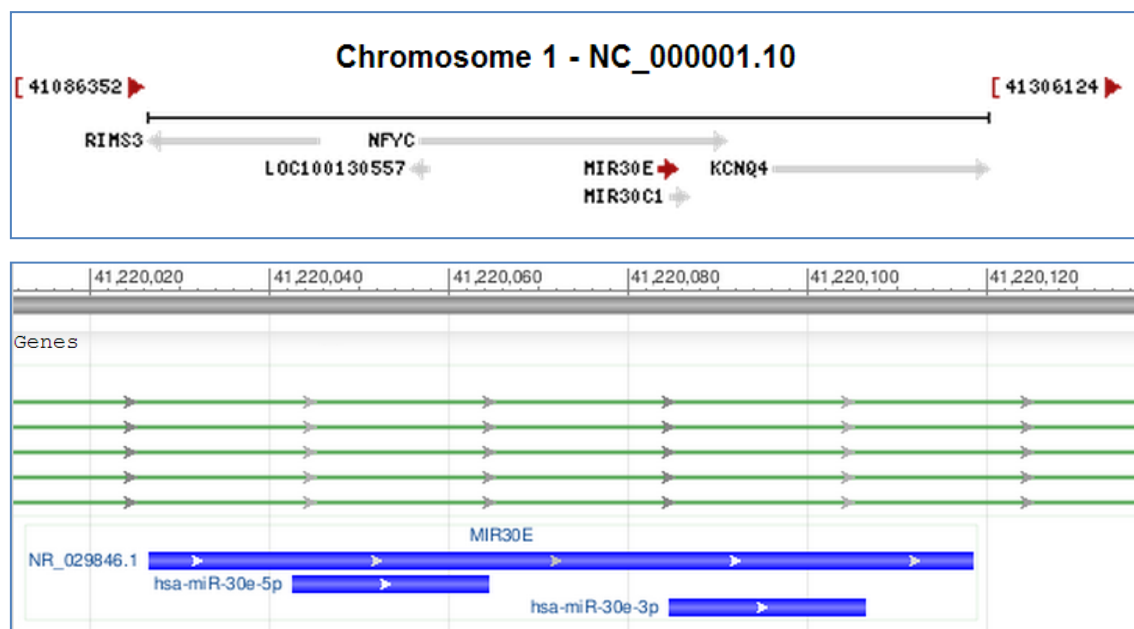


Figura 26. Esquema genómico del miR30e (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura sobre *miR30e*.

Se ha descrito que la expresión de *miR-30e* está relacionada con la expresión de interferon alfa (IFN- α). La expresión está correlacionada negativamente con granzima B y los niveles de proteína de perforina, respectivamente, durante la activación de IFN- α en células humanas (261). En cáncer de mama el *miR30e* se ha relacionado con la expresión de HER2 en cáncer de mama precoz (262).

6.6.2 *MicroARN-30a* ** *miR-30a*

Localización 6q13

Secuencia: Cromosoma 6; NC_000006.11 (72113254..72113324)

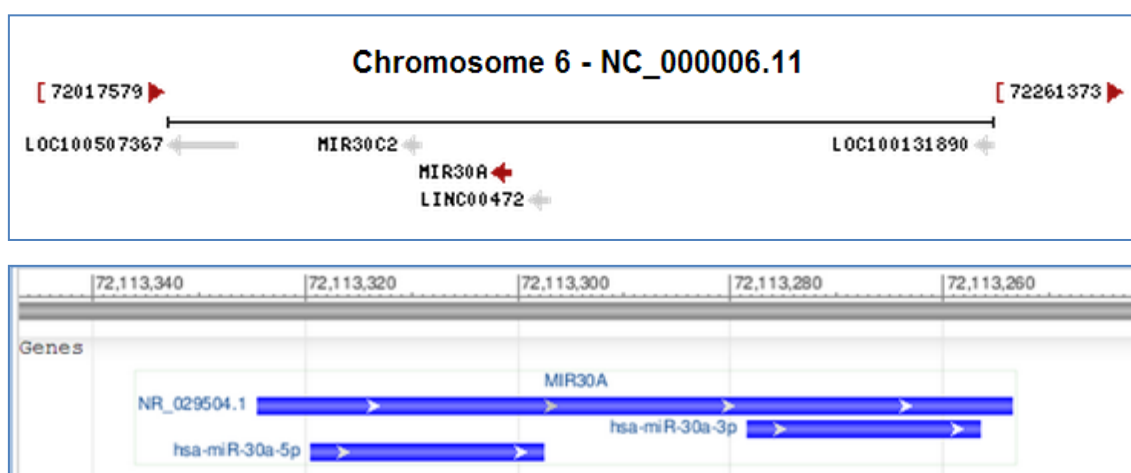


Figura 27. Esquema genómico del miR 30-a (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura del *miR-30a*

MiR-30a regula negativamente *DLL4*⁴⁶ e inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales. En el cáncer renal de células claras (ccRCC), *DLL4* está sobreexpresado en general y en particular en los pacientes con metástasis hematógenas (263). Se ha descrito que la expresión de *miR-30a* está reducida en los tejidos tumorales y específicamente en las metástasis hematógenas de ccRCC. Además, la expresión de *miR-*

⁴⁶ *DLL4* es un ligando endotelial de la vía de señalización Notch está implicada en el control de la angiogénesis tumoral y la progresión tumoral.

30a se correlacionó inversamente con la expresión de *DLL4*⁴⁶ (264) y densidad de los microvasos. El nivel bajo de *miR-30a* indicó también una mayor probabilidad de desarrollar metástasis. Más importante aún, la expresión de *miR-30a* se comportaba como un predictor independiente de metástasis hematógica en el ccRCC (263).

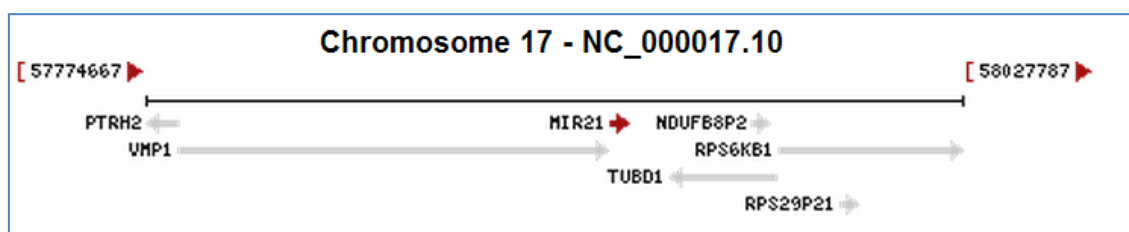
Se ha estudiado la interacción de *miR-30a* y uno de sus genes diana *Vim*, que codifica para vimentina, proteína fundamental en la transición epitelio-mesénquima. Se ha sugerido que su acción está directamente relacionada con la invasión y metástasis en las células tumorales (265).

En el cáncer de mama *miR-30a* se ha propuesto como un gen supresor en el desarrollo tumoral y en el desarrollo de metástasis. Estudios en líneas celulares demostraron que la expresión ectópica de *miR-30a* producía supresión del crecimiento tumoral y las metástasis in vitro. De forma paralela los modelos tumorales en ratón revelaron que *miR-30a* controlaba el crecimiento tumoral y las metástasis pulmonares. Se ha descrito que el nivel de expresión del *miR-30a* es significativamente menor en tejido tumoral de mama que en tejidos pareados de estructura mamaria normal. Además se ha encontrado una relación inversa en la expresión de *miR-30a* y las metástasis ganglionares y pulmonares (266).

6.6.3 *MicroARN-21* ** *miR-21*

Localización 17q23.1

Secuencia: Cromosoma 17;NC_000017.10 (57918627..57918698)



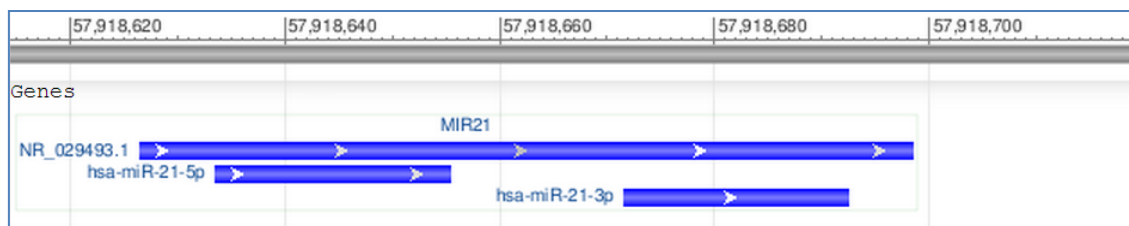


Figura 28. Esquema genómico del *miR-21* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura del *miR-21*

Existen muchos datos sobre la relación de *miARN-21* y el cáncer. La mayoría de los estudios en líneas celulares y modelos animales determinan el papel fundamental en la del *miR-21* en la regulación de la apoptosis.

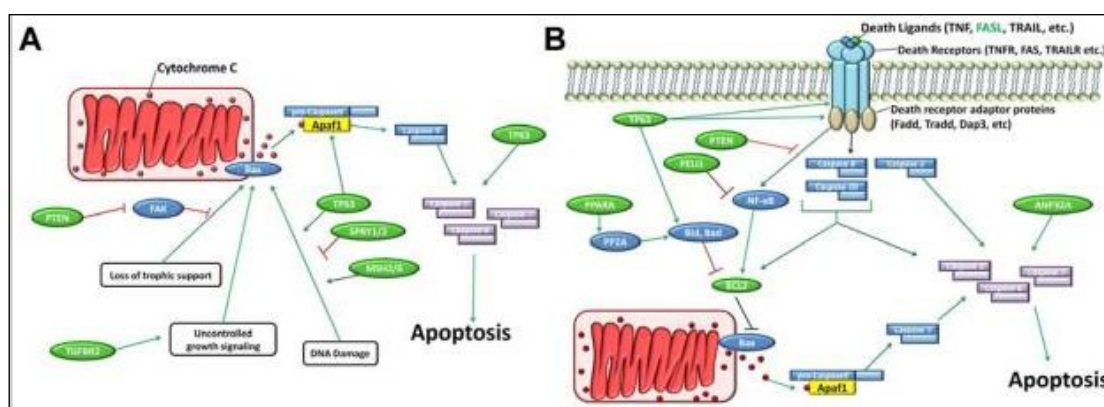


Figura 29. Esquema de la implicación del *miR-21* en la apoptosis (267).

En la mayoría de los artículos publicados el *miR-21* se presenta como un supresor tumoral. A través de la supresión funcional, *miR-21* está implicada en casi todos los procesos oncogénicos: la proliferación celular, invasión y metástasis, la inestabilidad del genoma y las mutaciones secundarias, la inflamación, la inmortalización de replicación, el metabolismo alterado, la angiogénesis y apoptosis, la destrucción inmune, y la supresión del crecimiento. En particular, el *miR-21* está fuertemente involucrado en la apoptosis (**Figura 29**) de lo que se extrae que el *miR-21* es un oncogén que desempeña un papel clave en la resistencia a la muerte celular programada en células cancerosas y

que la orientación de la apoptosis es una opción terapéutica viable contra cánceres que expresan el miR-21(267).

La sobreexpresión omnipresente del *miR-21* pone de relieve la importancia de dirigir la apoptosis como una herramienta terapéutica para el cáncer. Sin embargo aún no está aclarado si *miR-21* es simplemente un regulador positivo o es capaz de iniciar la tumorigénesis (268). Además, *miR-21* se ha propuesto como biomarcador tumoral (269).

Los genes diana del miARN-21 dentro de la cascada de la apoptosis incluyen genes en la vía intrínseca y en la extrínseca.

Genes diana del *miR-21*

PDCD4

El programador de muerte celular 4 (Pdc4) se une a IF4E para regular la traducción, actuando así como un supresor de tumoral. En las células de cáncer de mama, *miR-21* se encuentra aumentado a través de la estimulación de HER2 (270). Las células HER2+ exhiben una baja regulación de Pdc4 (271). Esta actividad oncogénica, también se ha demostrado la actividad oncogénica en glioblastomas y cáncer colorrectal.

Un estudio demostró que AP-1 es un factor de transcripción que induce la expresión de *miR-21* en respuesta a la señalización de *Ras* (272). A través de esta vía, *Ras* inhibe PTEN y Pdc4. Pdc4 también es un mediador de la apoptosis inducida por LPS (lipopolisacárido) (273). La Señalización de LPS a través de Toll-like receptor 4 (TLR4) provoca un aumento en la expresión de Pdc4. En respuesta a LPS, la inducción de IL-6 y la apoptosis inducida por NF-kB son dependientes de la expresión de Pdc4. Además de la inducción de apoptosis, NF-kB también induce la expresión de *miR-21*, formando un bucle de retroalimentación negativo por la orientación Pdc4. De esta manera, Pdc4 responde a señales extrínsecas para inducir la apoptosis. La señalización de

LPS difiere de la señalización de apoptosis en la tumorigénesis, sin embargo *Pdcd4* y *miR-21* proporcionan vínculos fundamentales entre la inflamación y la oncogénesis (274).

SPRY

Los miembros de la familia de Sprouty (SPRY) median la señalización del receptor tirosina quinasa en respuesta a factores de crecimiento. Además modulan la vía de las MAP quinasas (MAPK). SPRY1 evita la inhibición de las ciclinas dependientes de quinasas (CDK) por inhibidores como p21. Parece que puede actuar como una oncoproteína y su sobreexpresión se ha correlacionado con el cáncer de mama (275).

PTEN

PTEN inhibe la vía de Akt mediante la inversión de la fosforilación de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). La vía PI3K/PTEN/Akt controla los aspectos claves de la función celular: crecimiento, proliferación y supervivencia, motilidad y metabolismo. En las células de cáncer de mama, PTEN controla la apoptosis y la detención del ciclo celular de forma independiente (276). PTEN se encuentra mutado frecuentemente en tumores sólidos. La transfección de las células no tumorales con *miR-21* provocó un aumento de la migración de las células. Se demostró que *miR-21* actúa directamente sobre PTEN a través de sitios en su extremo 3' UTR (277). PTEN además está directamente relacionado con la apoptosis por vía extrínseca a través de la mediación de la señalización de TNF y por la vía intrínseca por la mediación de la expresión de factores de apoptosis mitocondrial.

CDK2AP1

MiR-21 disminuye la expresión CDK2AP1, un gen supresor de tumores, y estimula la proliferación celular y la invasión tisular (278).

PPAR

El receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR) es un receptor nuclear que actúa como un factor de transcripción para regular la expresión de genes implicados en la diferenciación celular, el desarrollo, el metabolismo y la tumorigénesis (279). El *miR-21* desempeña un papel significativo en la migración celular inducida por hipoxia. En hipoxia, las células muestran niveles muy bajos de PPAR debido a la supresión inducida por el *miR-21*. Esto conduce a la supresión de la proliferación inducida por la hipoxia y la migración (280).

6.6.4 *MicroARN-210* ** *miR-210*

Localización: 11p15.5

Secuencia: Cromosoma 11; NC_000011.9 (568089.568198)

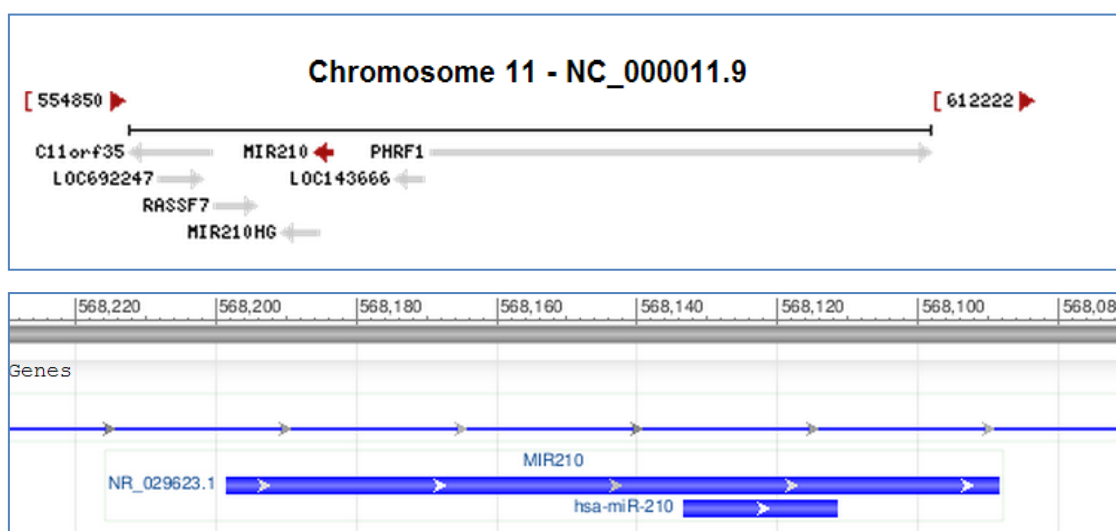


Figura 30. Esquema genómico del *miR-210* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura del *miR-210*

MiR-210 inhibe la proliferación celular mediante la interacción con proteínas que son cruciales para la progresión del ciclo celular. *MiR-210* en situación de hipoxia se dirige directamente a E2F3 en una amplia variedad de células. E2F3 pertenece a la familia de factor de transcripción E2F, participan en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la respuesta apoptótica (281). E2F3 promueve la prolifera-

ción celular por lo que permite la progresión del ciclo celular de G1 a la fase S y el inicio de la replicación del ADN. Su expresión es alta en una amplia variedad de células incluyendo las células epiteliales mamarias, células escamosas esofágicas y las células de cáncer cervical. El perfil de expresión de *miR-210* es diferente en las células tumorales y en las células sanas. Además, algunas de las proteínas diana de *miR-210* tienen diferentes funciones en diferentes tipos de células (282).

MIR-210 mantiene la supervivencia de las células pluripotenciales.

En *miR-210* sostiene la supervivencia celular en condiciones de hipoxia (283). Algunos estudios han demostrado que el *miR-210* promueve la supervivencia de células madre a través de las proteínas caspasa-8-asociada a la proteína 2 (CASP8AP2), o asociada al homólogo de proteína (FLASH), una proteína que facilita la apoptosis inducida por Fas (284).

MIR-210 reprime metabolismo mitocondrial

Existen datos que avalan que *miR-210* inhibe el metabolismo mitocondrial; se dirige a un gran número de proteínas que son cruciales para el correcto funcionamiento del ciclo de Krebs. *MiR-210* en condiciones de normoxia puede inhibir la producción de energía mitocondrial (285); alterar el potencial de membrana y la estructura mitocondrial (286) e inducir la acumulación de lactato (287). El homólogo del clúster hierro-azufre (ISCU) 1/2 es uno de los blancos directos de *miR-210*. La expresión de ISCU1/2 se correlaciona negativamente con el nivel de *miR-210* en diferentes tipos de células y específicamente en las células tumorales de mama (288). La expresión constitutiva de la forma de *miR-210*-resistente a ISCU1 / 2 (desprovisto de la región 3'UTR) revierte parcialmente la inhibición de *miR-210*-dependiente de la actividad de la respiración mitocondrial (287). Esto indica que el *miR-210* se dirige contra ISCU1 / 2 para suprimir las funciones mitocondriales durante la hipoxia. Además *miR-210* regula la

proteína de ensamblaje citocromo c oxidasa (COX10) y succinato deshidrogenasa subunidad D (SDHD) (286), controlando la represión de la respiración mitocondrial. La condición de hipoxia que depende de *miR-210* sirve como un potente inhibidor del metabolismo mitocondrial. Curiosamente, el *miR-210* inducible por hipoxia sigue siendo elevado incluso después de regreso al ambiente normóxico, lo que sugiere que el efecto de *miR-210* es de larga duración (289).

Implicación de *miR-210* en la reparación del ADN

El *miR-210* puede silenciar el sistema de reparación del ADN por medio de la enzima RAD52 (290). RAD52 es una proteína que fija y repara el ADN de doble cadena, repara los huecos en la cadena simple de ADN y facilita la acción de RAD51 durante la recombinación (291). *MiR-210* se une directamente a la región 3'UTR de RAD52 provocando la represión transduccional (290).

MiR-210 induce la angiogénesis

Como mediador de la hipoxia, *miR-210* mantiene la angiogénesis en las células endoteliales (289). *MiR-210* actúa disminuyendo la acción de EFNA3, una proteína de la familia de las efrinas que se encargan del desarrollo vascular y además actúa directamente a través de una proteína tirosina-fosfatasa 1B (PTP1B) (289) que regula negativamente la señalización de VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio vascular) mediante la defosforilación de VEGFR2 (Receptor 2 del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) en las células endoteliales (292). La elevación de *miR-210* conduce a la represión de PTP1B, permitiendo la señalización a través de VEGF en condiciones de hipoxia.

6.6.5 *MicroARN- 93* ** *miR-93*

Localización 7q22.1

Secuencia: Cromosoma 7; NC_000007.13 (99691391.99691470)

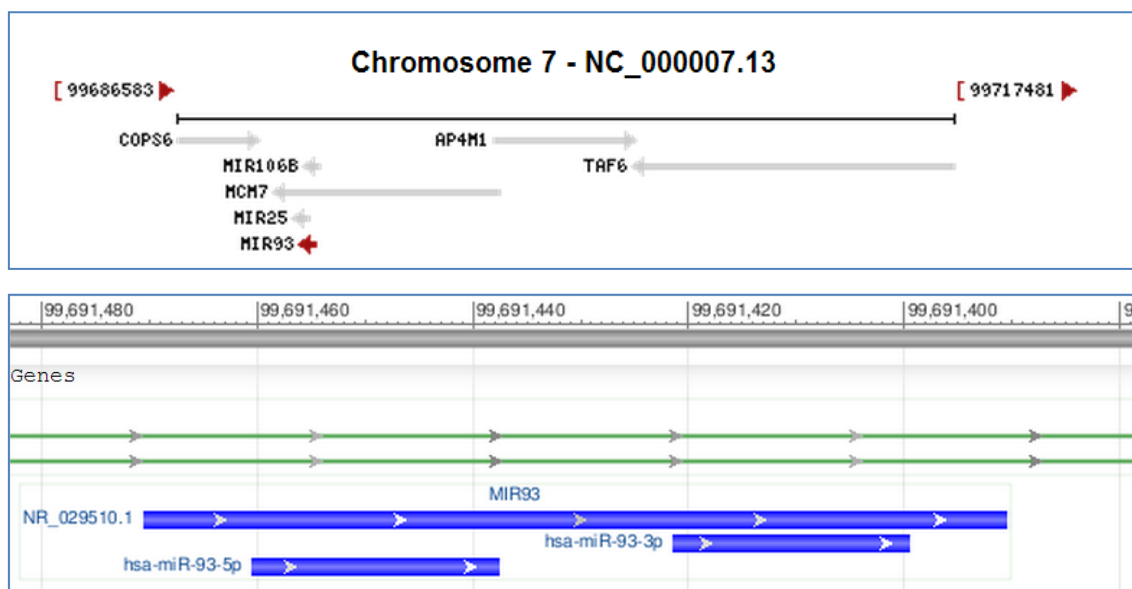


Figura 31. Esquema genómico del *miR-93* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura del *miR-93*

Se ha descrito como un factor pronóstico negativo en cáncer de colon (293). Promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis a través de las integrinas (294). *Mir-93*, es miembro del clúster *mir-106b-25*, que se encuentra en el intrón 13 del gen *MCM7*⁴⁷. Frecuentemente está sobreexpresado en tumores aunque también puede actuar como un gen supresor de tumores. En cultivo celular, la expresión de *miR-93* mejora la supervivencia celular y la invasión. Actúa sobre *LATS2*, un gen supresor de tumores. Niveles altos de *LATS2* se asocian con mayor muerte celular en la masa tumoral mientras que el silenciamiento de *LATS2* promueve la supervivencia celular (294). En uno de los estudios realizados sobre este miARN en líneas celulares de cáncer de mama y xenoinjertos de ratón, se observó que el *miR-93* modula y controla las células pluripo-

⁴⁷ La proteína codificada por este gen es la proteína 7 de mantenimiento para cromosomas mini (MCM) que son esenciales para la iniciación de la replicación del genoma en las células eucariotas.

tenciales mediante la regulación de la proliferación y diferenciación de los estadios tumorales. Además *miR-93* induce la transición epitelio-mesénquima (295).

6.6.6 *MicroARN-150* ** *miR-150*

Localización: 19q13.33

Secuencia: 19; NC_000019.9 (50004042..50004125).

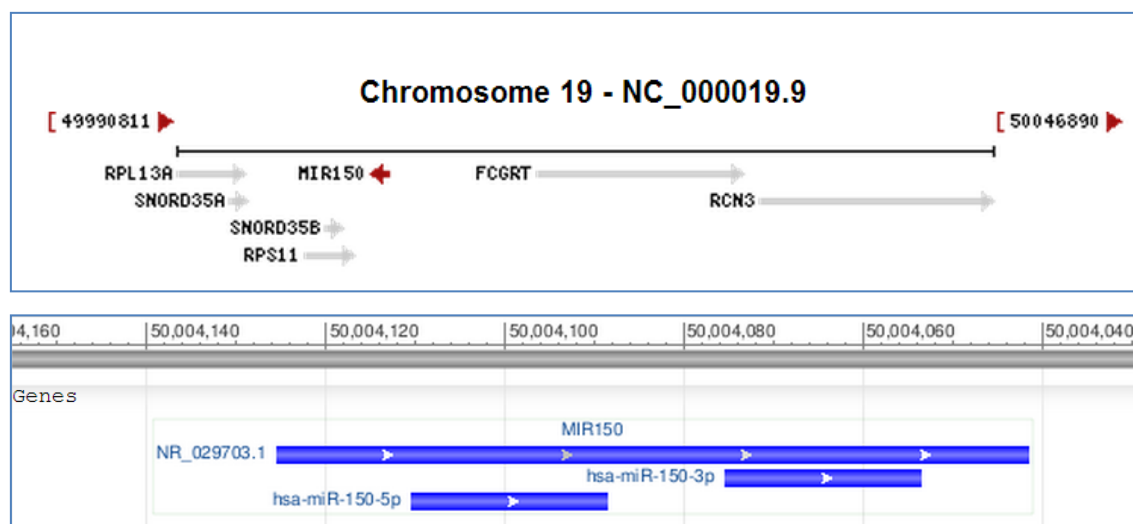


Figura 32. Esquema genómico del *miR-150* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura del *miR-150*

Un estudio ha demostrado que *miR-150* está aumentado de forma aberrante en tejido de cáncer de pulmón y se correlaciona negativamente con la expresión del gen propapótico p53 pero no EGFR2 (296). Los autores mostraron que *miR-150* actúa sobre 3'UTR de p53 y regula su expresión, retrasando la proliferación celular y promueve la apoptosis (aumenta la expresión de p53). También se ha estudiado que *miR-150* puede inducir la angiogénesis mediante la acción sobre células endoteliales.

6.6.7 *MicroARN-99b* ** *miR-99b*

Localización 19q13.41

Secuencia: Cromosoma 19; NC_000019.9 (52195865..52195934)

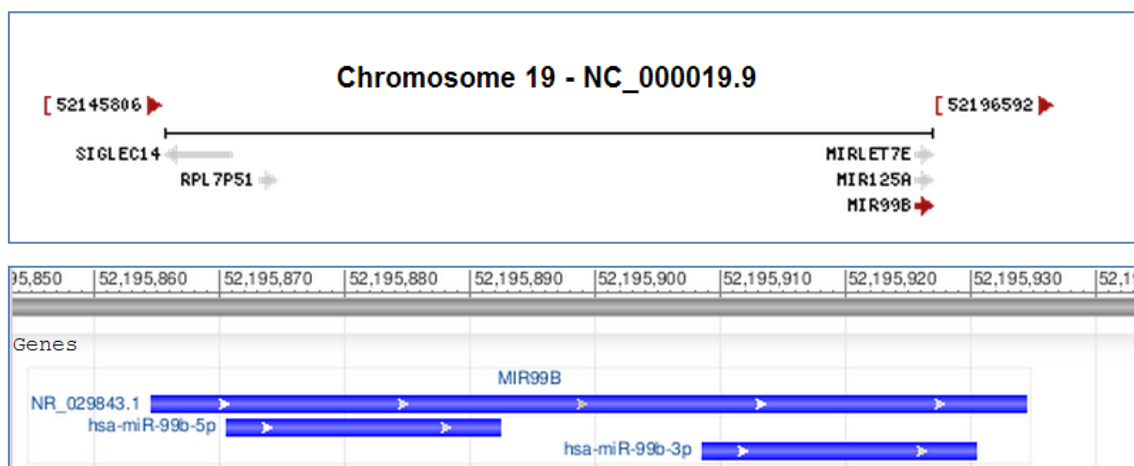


Figura 33. Esquema genómico del *miR-99b* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

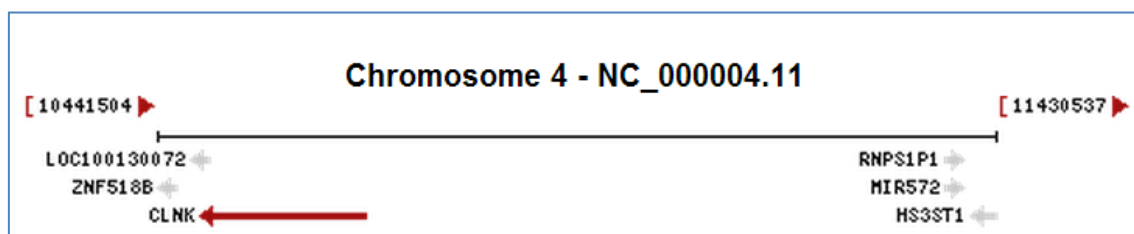
Datos en la literatura del *miR-99b*

El *miR-99b* pertenece a la familia miR-99 (miR-99a, 99b, 99c). Diferentes estudios han demostrado que la familia de *miR-99* actúa sobre IGFR (Receptor del Factor de Crecimiento de la Insulina) y mTOR como en tumores de cabeza y cuello (297) o tumores adrenocorticales (298). En líneas celulares de cáncer de próstata también se observó que la familia miR-99 actúa directamente contra mTOR (299).

6.6.8 *MicroARN-572* ** *miR-572*

Localización: 4p15.33

Secuencia: Cromosoma: 4; NC_000004.11 (11370451..11370545)



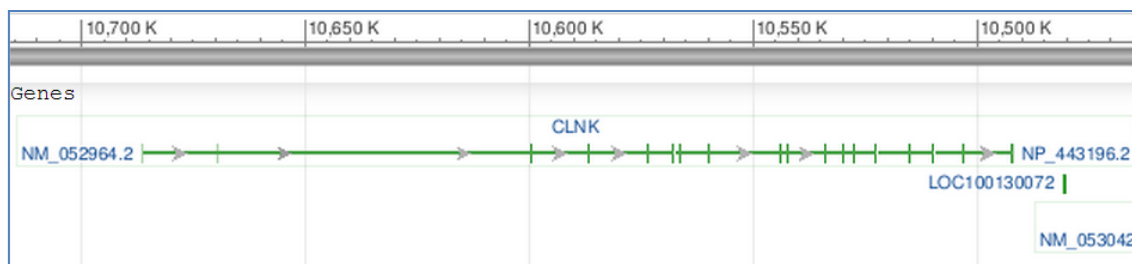


Figura 34. Esquema genómico del *miR-572* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Datos en la literatura del *miR-572*

En un estudio en linfoma T periférico, la sobreexpresión de *miR-572* implicaba peor pronóstico (300). Además, se ha relacionado como factor de supervivencia independiente del TNM en cáncer nasofaríngeo (301).

6.7 Razonamiento biológico del valor pronóstico del perfil de 8 miARNs

En el año 2000, Douglas Hanahan publicó “Hallmarks of Cancer” (302). En este artículo se recogen las capacidades biológicas y los pasos necesarios que requieren los tumores para su desarrollo. Estos “hallmarks” o características son un principio para entender las bases de la complejidad tumoral. Estas capacidades incluyen la resistencia a la muerte celular, el mantenimiento de la señalización proliferativa, la angiogénesis, evasión a los supresores del crecimiento, la inmortalidad replicativa y la activación de la invasión y las metástasis. En el año 2011 publicó una actualización en la que además se incluye la reprogramación del mecanismo energético y la evasión al sistema inmune (303). Los autores añaden un nivel de complejidad que refleja la preparación celular para el desarrollo del microambiente tumoral.

Al describir el *Perfil de 8 miARNs* y el conocimiento que se tiene de cada uno de los miARNs integrantes del perfil, es interesante destacar que los datos publicados en la

literatura reflejan que el conjunto de estos 8 *miARNs* están implicados en todos los “hallmarks” del cáncer (Tabla 10).

Tabla 10. Relación entre la selección de Hallmarks y el perfil de miARNs

“Hallmark”	miR del Perfil de 8 <i>miARNs</i>
Resistencia a la muerte celular	<i>miR-30e</i> (261)
	<i>miR-210</i> (281)
	<i>miR-93</i> (294)
Replicación indefinida	<i>miR-21</i> (270)
Mantenimiento del la señal de proliferación	<i>miR-210</i> (281)
Angiogénesis	<i>miR-210</i> (289)
	<i>miR-93</i> (294)
Evasión a los supresores de crecimiento	<i>miR-30a</i> (263)
Activación de invasión y metástasis	<i>miR-30a</i> (265)
Reprogramación energética	<i>miR-210</i> (270)
Evasión del sistema inmune	<i>miR-30e</i> (261)

Todos los *miARNs* descritos en nuestro perfil han sido identificados en la patogénesis tumoral. Existen algunos fundamentos como los descritos para disertar si el Perfil de 8 *miARNs* tiene una aplicación directa sobre nuestra muestra y sobre el cáncer de mama. Se puede asegurar que esta selección de *miARNs* tiene una base molecular plausible en el desarrollo tumoral y por ende sería lógico pensar que por estos mecanismos u otros similares, sus cambios y/o alteraciones justificasen su valor como factor pronóstico.

En realidad, esta tabla sólo describe que los conocimientos actuales sobre estos *miARNs* podrían justificar su aplicación sobre la muestra y qué además existe cierta

evidencia sobre las implicaciones de cada uno de los miARNs en el desarrollo tumoral. Hay que ser reflexivos y prudentes en las conclusiones sobre nuevos factores pronósticos. Se debe validar cada uno de los pasos para cerciorar los resultados y ser capaces de cuantificar el valor absoluto de un nuevo factor pronóstico. Obviamente el *Perfil de 8 miARNs* añade una nueva variable cuantitativa y cualitativa que puede ayudar en la comprensión de la biología molecular del cáncer de mama. No obstante, añade un nivel de complejidad en la interpretación y el conocimiento, en este caso específico del cáncer de mama con afectación axilar. El perfil ha demostrado en nuestra muestra tener un gran poder como factor pronóstico en pacientes con cáncer de mama y afectación axilar.

En la búsqueda de biomarcadores que ayuden al manejo del cáncer de mama, el ideal es un marcador que tenga potencial pronóstico y predictivo, de tal forma que indique cual es el riesgo de una recaída y cuanto se disminuiría con la quimioterapia.

En la actualidad los nuevos test genéticos ya están incorporados a la clínica, fundamentalmente MammaPrint y Oncotype. Sin embargo estos test están todavía pendientes de validación en estudios prospectivos y existen preguntas sin responder. Una de las fundamentales cuestiones críticas que se aplica a los genes de estos test se aplicaría también a un perfil de miARNs y es definir cuanta información real estamos añadiendo a los estándares de estratificación del riesgo. La siguiente cuestión es establecer cómo de homogéneas son las poblaciones estudiadas y que validez tendrá en diferentes muestras con diferentes perfiles genéticos globales.

Un perfil de miARNs puede ayudar a comprender mejor la biología del tumor, comparte las ventajas de poder realizar el estudio en muestras parafinadas y probablemente en un futuro pueda combinarse con otros índices. Además, las secuencias pequeñas de ARN se conservan mejor lo que supone una ventaja en los perfiles de miARNs.

Los factores clásicos pronósticos difieren mucho de los perfiles pronósticos. Uno de los aspectos destacados es que se desconoce en gran medida el mecanismo por el que la expresión de un determinado gen está directamente relacionada con un resultado (304). El estudio de Mammaprint por ejemplo ha establecido la prueba de concepto en el que la expresión de un gen determinado en el tumor tiene valor pronóstico, pero los estudios de validación se han realizado sobre poblaciones mixtas, sin suficientes tamaños como para estratificar y guiar con certeza en la toma de decisiones. Todavía hay mucho que aprender acerca de la generalización de los predictores genéticos, aunque en principio la validación debe realizarse como sobre cualquier otro factor de predicción clínica en un análisis multivariante. La validación de los test genéticos se debe hacer frente a la población sobre las cuales las implicaciones en la toma de decisión de los distintos grupos de riesgo son claras. Otro punto importante es que se desconoce si los perfiles de expresión son más o menos estables en comparación con los biomarcadores tradicionales para ser generalizados más allá de las poblaciones en las que fueron desarrollados. La expresión génica puede reflejar características biológicas fundamentales, y por lo tanto relativamente estables dentro de los diferentes grupos étnicos. Sin embargo, los patrones de expresión de genes también se han asociado con mutaciones genéticas específicas como por ejemplo BRCA1, lo que indica que mutaciones específicas de ADN o polimorfismos pueden afectar el resultado de una firma pronóstica. Esto refleja la dificultad de una adecuada validación en poblaciones con diferentes antecedentes genéticos.

Fan et al. (89), demostraron que se pueden conseguir herramientas que clasifican el riesgo de diferentes perfiles que tienen pocas o ninguna superposición de genes. No existe un estándar para los valores de expresión génica; otro de los problemas en común con cualquier test genético es que sabemos poco acerca de la estabilidad del valor pre-

dictivo de estos marcadores sobre poblaciones con diferentes perfiles genéticos. Desde un punto de vista teórico los resultados de expresión genética a partir de diferentes laboratorios indican que la replicación de datos es altamente reproducible (218). Nuestro grupo tiene en marcha un proyecto en mujeres con tumores de mama localizado sin afectación axilar que completará la validación del perfil de 8 miARNs.

Otro de los potenciales problemas de los perfiles pronósticos en el futuro puede ser consecuencia de un exponencial aumento de la demanda. Esta ampliación puede representar un desafío para la reproducibilidad y la fiabilidad de las pruebas, además de un potencial uso inadecuado para grupos de pacientes no claramente catalogados.

MammaPrint fue el primer test genético basado en microarrays de expresión que fue aprobado para su aplicación clínica. El correcto almacenamiento de los datos en, la publicación de las bases para la recogida de datos de microarrays de una forma adecuada y su disponibilidad para futuros ensayos es imprescindible en el desarrollo de estas nuevas herramientas pronósticas.

El número de publicaciones relacionadas con test genéticos o herramientas predictoras y pronósticas está aumentando de forma exponencial. Podemos esperar nuevas herramientas así como la validación de las previas. Más genes o miARNs podrán ser añadidos. El futuro podría albergar modificaciones sobre las firmas actuales: subconjuntos de las firmas actuales podrían ser propuestas como alternativas a los factores clínicos, o ser propuestas para diferentes grupos de pacientes y poblaciones (304)

La incorporación de nuevos datos como el *Perfil de 8 miARNs* induce a pensar si en realidad estamos aportando datos complementarios a los datos genómicos conocidos o si lo que estamos analizando es información redundante. Uno de los puntos clave en la práctica de cada uno de los perfiles moleculares que existen o puedan existir es estable-

cer el valor real de estos nuevos modelos sobre los predictores clínicos estándar. Es tentador pensar que el *Perfil de 8 miARNs* es un factor completamente independiente de los factores clásicos. Sin embargo lo más probable es que exista un cierto grado de solapamiento; estudios futuros ayudarán a definir el grado de complementariedad. Sin embargo, per se, este estudio es una muestra de que las pruebas de expresión molecular maduran y proliferan, luego una de las necesidades inmediatas será una comparación con otros modelos, y estudiar su valor combinado.

7 Conclusiones finales

1. Se describe un *Perfil de 8 miARNs* con valor pronóstico que proporciona una estimación de la supervivencia libre de enfermedad y es capaz de clasificar a las pacientes con cáncer de mama y afectación axilar en dos grupos de diferente valor pronóstico.
2. El *Perfil de 8 miARNs* añade información pronóstica sobre los factores pronósticos clásicos.
3. El *Perfil de 8 miARNs* es aplicable a los diferentes fenotipos del cáncer de mama.
4. El *Perfil de 8 miARNs* está formado por miARNs previamente relacionados en la génesis tumoral.

8 Bibliografía

1. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2012. www.ine.es;
2. Gonzalo López-Abente Ortega. **LA SITUACIÓN DEL CÁNCER EN ESPAÑA. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.**
3. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Reportaje. www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/documentacion/buletinseom/2010/66/09-reportaje-bol66.pdf
4. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
5. <http://www.iarc.fr/>. In.
6. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, et al. **Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data.** *Lancet Oncol.* 2007 Sep;8(9):784–96.
7. Lacey JV, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang S-C, Leitzmann MF, et al. **Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort.** *BMC Cancer.* 2009;9(1):84.
8. Speirs V, Shaaban AM. **The rising incidence of male breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2009 May;115(2):429–30.
9. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. **Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study.** *Int J Cancer J Int Cancer.* 1990 Nov 15;46(5):796–800.
10. Layde PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW. **The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer.** *Cancer and Steroid Hormone Study Group. J Clin Epidemiol.* 1989;42(10):963–73.
11. Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF. **Menstrual factors and risk of breast cancer.** *Cancer Invest.* 1988;6(3):245–54.
12. Epstein FH, Clemons M, Goss P. **Estrogen and the Risk of Breast Cancer.** *N Engl J Med.* 2001 Jan 25;344(4):276–85.
13. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. **Oral contraceptives and the risk of breast cancer.** *N Engl J Med.* 2002 Jun 27;346(26):2025–32.
14. **Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies.** *Lancet.* 1996 Jun 22;347(9017):1713–27.
15. **Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease.** *Lancet.* 2001 Oct 27;358(9291):1389–99.
16. Collins FS. **BRCA1 — Lots of Mutations, Lots of Dilemmas.** *N Engl J Med.* 1996 Jan 18;334(3):186–8.
17. Shiovitz S, Korde LA. **Genetics of breast cancer: a topic in evolution.** *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2015 Jan 20;
18. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. **Prognostic factors in early breast car-**

- cinoma.** *Cancer*. 1994 Jul 1;74(1 Suppl):381–400.
19. Cable PL, Wilson CA, Calzone FJ, Rauscher FJ, Scully R, Livingston DM, et al. **Novel consensus DNA-binding sequence for BRCA1 protein complexes.** *Mol Carcinog*. 2003 Oct;38(2):85–96.
 20. Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, et al. **Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):863–71.
 21. Rennert G, Bisland-Naggan S, Barnett-Griness O, Bar-Joseph N, Zhang S, Rennert HS, et al. **Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations.** *N Engl J Med*. 2007 Jul 12;357(2):115–23.
 22. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.** *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625–38.
 23. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. **Overweight, obesity, and cancer risk.** *Lancet Oncol*. 2002 Sep;3(9):565–74.
 24. Rosenberg L, Slone D, Shapiro S, Kaufman DW, Helmrich SP, Miettinen OS, et al. **Breast cancer and alcoholic-beverage consumption.** *Lancet*. 1982 Jan 30;1(8266):267–70.
 25. Key J, Hodgson S, Omar RZ, Jensen TK, Thompson SG, Boobis AR, et al. **Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues.** *Cancer Causes Control CCC*. 2006 Aug;17(6):759–70.
 26. Bellocco R, Pasquali E, Rota M, Bagnardi V, Tramacere I, Scotti L, et al. **Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: results of a meta-analysis.** *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2012 Sep;23(9):2235–44.
 27. Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. **Cigarette smoking and the incidence of breast cancer.** *Arch Intern Med*. 2011 Jan 24;171(2):125–33.
 28. Heikkilä K, Nyberg ST, Theorell T, Fransson EI, Alfredsson L, Bjorner JB, et al. **Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116,000 European men and women.** *BMJ*. 2013;346:f165.
 29. Swerdlow AJ, Cooke R, Bates A, Cunningham D, Falk SJ, Gilson D, et al. **Breast cancer risk after supradiaphragmatic radiotherapy for Hodgkin's lymphoma in England and Wales: a National Cohort Study.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Aug 1;30(22):2745–52.
 30. Bertrand KA, Tamimi RM, Scott CG, Jensen MR, Pankratz V, Visscher D, et al. **Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics.** *Breast Cancer Res BCR*. 2013;15(6):R104.
 31. Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, van 't Veer L, Garber JE, et al. **Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Mar 15;22(6):1055–62.
 32. Zendejas B, Moriarty JP, O'Byrne J, Degnim AC, Farley DR, Boughey JC. **Cost-effectiveness of contralateral prophylactic mastectomy versus routine surveillance in patients with unilateral breast cancer.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):2993–3000.
 33. Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, et al. **American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography.** *CA Cancer J Clin*. 2007 Apr;57(2):75–89.
 34. Freedman AN, Yu B, Gail MH, Costantino JP, Graubard BI, Vogel VG, et al. **Benefit/risk assessment for breast cancer chemoprevention with raloxifene**

- or tamoxifen for women age 50 years or older. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jun 10;29(17):2327–33.
35. Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, et al. **Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk.** *J Natl Cancer Inst*. 2009 Mar 18;101(6):384–98.
 36. Goss PE, Ingle JN, Alés-Martínez JE, Cheung AM, Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, et al. **Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women.** *N Engl J Med*. 2011 Jun 23;364(25):2381–91.
 37. Veronesi U, Goldhirsch A, Costa A, Zurrada S. **New technologies for diagnosis and treatment of breast cancer: meeting highlights from the Fourth Milan Breast Cancer Conference (Milan, June 5-7, 2002).** *Breast Edinb Scotl*. 2003 Jun;12(3):223–35.
 38. Fisher B, Bryant J, Dignam JJ, Wickerham DL, Mamounas EP, Fisher ER, et al. **Tamoxifen, radiation therapy, or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Oct 15;20(20):4141–9.
 39. Nickson C, Mason KE, English DR, Kavanagh AM. **Mammographic screening and breast cancer mortality: a case-control study and meta-analysis.** *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2012 Sep;21(9):1479–88.
 40. Yen TWF, Laud PW, Sparapani RA, Nattinger AB. **Surgeon specialization and use of sentinel lymph node biopsy for breast cancer.** *JAMA Surg*. 2014 Feb;149(2):185–92.
 41. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J, et al. **Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007.** *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2007 Jul;18(7):1133–44.
 42. Berry DA, Inoue L, Shen Y, Venier J, Cohen D, Bondy M, et al. **Modeling the impact of treatment and screening on U.S. breast cancer mortality: a Bayesian approach.** *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2006;(36):30–6.
 43. Bock K, Borisch B, Cawson J, Damtjernhaug B, de Wolf C, Dean P, et al. **Effect of population-based screening on breast cancer mortality.** *Lancet*. 2011 Nov 19;378(9805):1775–6.
 44. Kerlikowske K, Salzman P, Phillips KA, Cauley JA, Cummings SR. **Continuing screening mammography in women aged 70 to 79 years: impact on life expectancy and cost-effectiveness.** *JAMA*. 1999 Dec 8;282(22):2156–63.
 45. Leach MO, Boggis CRM, Dixon AK, Easton DF, Eeles RA, Evans DGR, et al. **Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: a prospective multicentre cohort study (MARIBS).** *Lancet*. 2005 May 21;365(9473):1769–78.
 46. de Glas NA, Engels CC, Bastiaannet E, van de Water W, Siesling S, de Craen AJM, et al. **Contralateral breast cancer risk in relation to tumor morphology and age-in which patients is preoperative MRI justified?** *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Feb;150(1):191–8.
 47. Carter CL, Allen C, Henson DE. **Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases.** *Cancer*. 1989 Jan 1;63(1):181–7.
 48. Michaelson JS, Silverstein M, Sgroi D, Cheongsiatmoy JA, Taghian A, Powell S, et al. **The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality.** *Cancer*. 2003 Nov 15;98(10):2133–43.

49. Michaelson JS, Satija S, Kopans D, Moore R, Silverstein M, Comegno A, et al. **Gauging the impact of breast carcinoma screening in terms of tumor size and death rate.** *Cancer.* 2003 Nov 15;98(10):2114–24.
50. Singletary SE, Connolly JL. **Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual.** *CA Cancer J Clin.* 2006 Feb;56(1):37–47; quiz 50–1.
51. Fisher B, Ravdin RG, Ausman RK, Slack NH, Moore GE, Noer RJ. **Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation.** *Ann Surg.* 1968 Sep;168(3):337–56.
52. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnattelli L, Brambilla C, et al. **Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer.** *N Engl J Med.* 1976 Feb 19;294(8):405–10.
53. Bonadonna G, Rossi A. **Chemotherapy after mastectomy.** *Lancet.* 1976 Mar 27;1(7961):697.
54. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, Weathers E, Fracchia AA, Kinne DW. **Axillary micro- and macrometastases in breast cancer: prognostic significance of tumor size.** *Ann Surg.* 1981 Nov;194(5):585–91.
55. Boova RS, Bonanni R, Rosato FE. **Patterns of axillary nodal involvement in breast cancer. Predictability of level one dissection.** *Ann Surg.* 1982 Dec;196(6):642–4.
56. Yen TWF, Laud PW, Sparapani RA, Nattinger AB. **Surgeon specialization and use of sentinel lymph node biopsy for breast cancer.** *JAMA Surg.* 2014 Feb;149(2):185–92.
57. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. **Ductal carcinoma in situ of the breast.** *N Engl J Med.* 2004 Apr 1;350(14):1430–41.
58. S Lakhani, I Ellis, S Schnitt. L 4th. Lyon: IARC Press; 2012. **WHO Classification of Tumours of the Breast.**
59. Jorns J, Sabel MS, Pang JC. **Lobular neoplasia: morphology and management.** *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Oct;138(10):1344–9.
60. Frank GA, Danilova NV, Andreeva II, Nefedova NA. **[WHO classification of tumors of the breast, 2012].** *Arkh Patol.* 2013 Apr;75(2):53–63.
61. Elston CW, Ellis IO. **Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.** *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403–10.
62. Nealon TF, Nkongho A, Grossi C, Gillooley J. **Pathologic identification of poor prognosis stage I (T1N0M0) cancer of the breast.** *Ann Surg.* 1979 Aug;190(2):129–32.
63. McGuire WL, Clark GM. **Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer.** *N Engl J Med.* 1992 Jun 25;326(26):1756–61.
64. Niu Y, Fu X, Lv A, Fan Y, Wang Y. **Potential markers predicting distant metastasis in axillary node-negative breast carcinoma.** *Int J Cancer J Int Cancer.* 2002 Apr 10;98(5):754–60.
65. Legha SS, Davis HL, Muggia FM. **Hormonal therapy of breast cancer: new approaches and concepts.** *Ann Intern Med.* 1978 Jan;88(1):69–77.
66. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU. **Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1996 Aug;14(8):2197–205.
67. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of**

- chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.** *Lancet*. 2005 May 14;365(9472):1687–717.
68. Buzdar AU. **Anastrozole for breast cancer: recent advances and ongoing challenges.** *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006 Jun;6(6):839–48.
69. Buzdar A, Chlebowski R, Cuzick J, Duffy S, Forbes J, Jonat W, et al. **Defining the role of aromatase inhibitors in the adjuvant endocrine treatment of early breast cancer.** *Curr Med Res Opin*. 2006 Aug;22(8):1575–85.
70. von Minckwitz G, Loibl S, Maisch A, Untch M. **Lessons from the neoadjuvant setting on how best to choose adjuvant therapies.** *Breast Edinb Scotl*. 2011 Oct;20 Suppl 3:S142–5.
71. Ma CX, Sanchez CG, Ellis MJ. **Predicting endocrine therapy responsiveness in breast cancer.** *Oncol Williston Park N*. 2009 Feb;23(2):133–42.
72. Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG. **Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer.** *Cancer Res*. 1983 Jun;43(6):2985–90.
73. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** *Science*. 1989 May 12;244(4905):707–12.
74. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, et al. **Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer.** *Cancer Res*. 1989 Apr 15;49(8):2087–90.
75. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol Baltim Md 1950*. 1984 Oct;133(4):1710–5.
76. Gerdes J. **Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies.** *Semin Cancer Biol*. 1990 Jun;1(3):199–206.
77. Spina D, Leoncini L, Megha T, Gallorini M, Tosi P, Pileri S, et al. **Growth patterns of diffuse non-Hodgkin's lymphomas estimated from mitotic and apoptotic indices.** *Int J Cancer J Int Cancer*. 1997 Oct 9;73(2):178–83.
78. Luporsi E, André F, Spyrtatos F, Martin P-M, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. **Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review.** *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):895–915.
79. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. **Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients.** *Breast Edinb Scotl*. 2008 Aug;17(4):323–34.
80. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. **Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients.** *Br J Cancer*. 2007 May 21;96(10):1504–13.
81. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. **Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013.** *Ann Oncol*. 2013 Sep 1;24(9):2206–23.
82. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. **Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** *J Natl*

- Cancer Inst. 2009 May 20;101(10):736–50.
83. Cheyne WW. **TWO CASES of OOPHORECTOMY for INOPERABLE BREAST CANCER.** Br Med J. 1898 May 7;1(1949):1194–5.
 84. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
 85. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8418–23.
 86. Drmanac R, Drmanac S, Strezoska Z, Paunesku T, Labat I, Zeremski M, et al. **DNA sequence determination by hybridization: a strategy for efficient large-scale sequencing.** Science. 1993 Jun 11;260(5114):1649–52.
 87. Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SAW. **The promise of microarrays in the management and treatment of breast cancer.** Breast Cancer Res BCR. 2005;7(3):100–4.
 88. 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.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
 89. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. **Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer.** N Engl J Med. 2006 Aug 10;355(6):560–9.
 90. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. **The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms.** BMC Genomics. 2006;7:96.
 91. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. **Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.** J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.
 92. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, et al. **The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor.** Science. 1985 Sep 6;229(4717):976–8.
 93. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. **c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer.** N Engl J Med. 1994 May 5;330(18):1260–6.
 94. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** N Engl J Med. 2001 Mar 15;344(11):783–92.
 95. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. **Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med. 2005 Oct 20;353(16):1659–72.
 96. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. **Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med. 2005 Oct 20;353(16):1673–84.
 97. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, et al. **2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial.** Lancet. 2013 Sep 21;382(9897):1021–8.
 98. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Gralow JR, Kaufman PA, Visscher DW, et

- al. **Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Dec 1;29(34):4491–7.
99. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. **Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer.** *N Engl J Med.* 2011 Oct 6;365(14):1273–83.
100. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. **Basal-like breast cancer: a critical review.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 May 20;26(15):2568–81.
101. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. **Triple-negative breast cancer.** *N Engl J Med.* 2010 Nov 11;363(20):1938–48.
102. Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. **Epidemiology of basal-like breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(1):123–39.
103. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. **Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and End Results database.** *Cancer.* 2007 Aug 15;110(4):876–84.
104. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. **The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329–34.
105. Oakman C, Viale G, Di Leo A. **Management of triple negative breast cancer.** *Breast Edinb Scotl.* 2010 Oct;19(5):312–21.
106. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. **Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas.** *Breast Cancer Res BCR.* 2007;9(5):R65.
107. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
108. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M, Viens P, et al. **Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization.** *Mol Cancer.* 2014;13:228.
109. 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 BCR.* 2010;12(5):R68.
110. van de Vijver MJ, He YD, van’t Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.
111. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. **Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy.** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5678–85.
112. Sotiriou C, Pusztai L. **Gene-expression signatures in breast cancer.** *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):790–800.
113. Orlov YL, Zhou J, Lipovich L, Shahab A, Kuznetsov VA. **Quality assessment of the Affymetrix U133A&B probesets by target sequence mapping and expression data analysis.** *In Silico Biol.* 2007;7(3):241–60.
114. Irizarry RA, Cope LM, Wu Z. **Feature-level exploration of a published**

- Affymetrix GeneChip control dataset.** *Genome Biol.* 2006;7(8):404.
115. Bachtary B, Boutros PC, Pintilie M, Shi W, Bastianutto C, Li J-H, et al. **Gene expression profiling in cervical cancer: an exploration of intratumor heterogeneity.** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5632–40.
 116. Trudeau M, Charbonneau F, Gelmon K, Laing K, Latreille J, Mackey J, et al. **Selection of adjuvant chemotherapy for treatment of node-positive breast cancer.** *Lancet Oncol.* 2005 Nov;6(11):886–98.
 117. Cufier T. **Which tools can I use in daily clinical practice to improve tailoring of treatment for breast cancer? The 2007 St Gallen guidelines and/or Adjuvant! Online.** *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2008 Sep;19 Suppl 7:vii41–5.
 118. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Tham Y-L, et al. **Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Feb 20;23(6):1169–77.
 119. Kimmick GG, Cirrincione C, Duggan DB, Bhalla K, Robert N, Berry D, et al. **Fifteen-year median follow-up results after neoadjuvant doxorubicin, followed by mastectomy, followed by adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF) followed by radiation for stage III breast cancer: a phase II trial (CALGB 8944).** *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Feb;113(3):479–90.
 120. Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B, et al. **Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series.** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Jun 1;13(11):3207–14.
 121. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, Greil R, Stöger H, Jakesz R, et al. **The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer.** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014 Mar 1;20(5):1298–305.
 122. Jerevall P-L, Ma X-J, Li H, Salunga R, Kesty NC, Erlander MG, et al. **Prognostic utility of HOXB13:IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial.** *Br J Cancer.* 2011 May 24;104(11):1762–9.
 123. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. **Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Apr 1;25(10):1239–46.
 124. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, et al. **Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation.** *N Engl J Med.* 1985 Mar 14;312(11):674–81.
 125. Fisher B, Bauer M, Margolese R, Poisson R, Pilch Y, Redmond C, et al. **Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer.** *N Engl J Med.* 1985 Mar 14;312(11):665–73.
 126. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. **Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical**

- trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer.** *N Engl J Med.* 1995 Nov 30;333(22):1456–61.
127. Hughes KS, Schnaper LA, Berry D, Cirrincione C, McCormick B, Shank B, et al. **Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women 70 years of age or older with early breast cancer.** *N Engl J Med.* 2004 Sep 2;351(10):971–7.
128. Whelan TJ, Kim D-H, Sussman J. **Clinical experience using hypofractionated radiation schedules in breast cancer.** *Semin Radiat Oncol.* 2008 Oct;18(4):257–64.
129. Vaidya JS, Joseph DJ, Tobias JS, Bulsara M, Wenz F, Saunders C, et al. **Targeted intraoperative radiotherapy versus whole breast radiotherapy for breast cancer (TARGIT-A trial): an international, prospective, randomised, non-inferiority phase 3 trial.** *Lancet.* 2010 Jul 10;376(9735):91–102.
130. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Láng I, Ciruelos E, Bellet M, et al. **Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer.** *N Engl J Med.* 2015 Jan 29;372(5):436–46.
131. Pagni O, Regan MM, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Láng I, et al. **Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer.** *N Engl J Med.* 2014 Jul 10;371(2):107–18.
132. **Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials.** *The Lancet [Internet].* 2015 Jul [cited 2015 Sep 9]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615610741>
133. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JGM, et al. **Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial.** *Lancet.* 2002 Jun 22;359(9324):2131–9.
134. Del Mastro L, Venturini M. **ATAC trial update.** *Lancet.* 2005 Apr 2;365(9466):1225; author reply 1225–6.
135. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Ejlertsen B, Mauriac L, et al. **Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8·1 years median follow-up.** *Lancet Oncol.* 2011 Nov;12(12):1101–8.
136. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. **Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17.** *J Natl Cancer Inst.* 2005 Sep 7;97(17):1262–71.
137. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, et al. **Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials.** *Lancet.* 2012 Feb 4;379(9814):432–44.
138. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S. **Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *The Oncologist.* 2008 Jun;13(6):620–30.
139. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. **Two decades after BRCA: setting para-**

- digms in personalized cancer care and prevention.** *Science*. 2014 Mar 28;343(6178):1466–70.
140. Wagle N, Berger MF, Davis MJ, Blumenstiel B, Defelice M, Pochanard P, et al. **High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing.** *Cancer Discov*. 2012 Jan;2(1):82–93.
 141. Dienstmann R, Rodon J, Barretina J, Tabernero J. **Genomic medicine frontier in human solid tumors: prospects and challenges.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 May 20;31(15):1874–84.
 142. Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM, Hodis E, Jacobus S, Supko JG, et al. **Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase I trial of everolimus and pazopanib.** *Cancer Discov*. 2014 May;4(5):546–53.
 143. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. **mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.** *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1500–8.
 144. Bartel DP. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
 145. Lee RC, Ambros V. **An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*.** *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):862–4.
 146. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.** *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.
 147. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. **Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*.** *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855–62.
 148. Moss EG, Lee RC, Ambros V. **The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA.** *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):637–46.
 149. Navarro Ponz A, Monzó i Planella M, Urbano Ispizua Á, Universitat de Barcelona, Departament d'Anatomia i Embriologia Humana. **Análisis comparativo de la expresión de miRNAs en el desarrollo embrionario del colon, el cáncer colorectal y el linfoma de Hodgkin** [Internet]. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2005. Available from: <http://www.tdx.cat/TDX-0604108-103726/>
 150. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. **The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901–6.
 151. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. **The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*.** *Genes Dev*. 2003 Apr 15;17(8):991–1008.
 152. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. **Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA.** *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86–9.
 153. Lai EC. **Predicting and validating microRNA targets.** *Genome Biol*. 2004;5(9):115.
 154. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. **Progress in microRNA delivery.** *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2013 Dec 28;172(3):962–74.
 155. Kosik KS. **Molecular biology: Circles reshape the RNA world.** *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):322–4.
 156. Hudson WH, Ortlund EA. **The structure, function and evolution of proteins**

- that bind DNA and RNA.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Nov;15(11):749–60.
157. Ebert MS, Sharp PA. **Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes.** *Cell.* 2012 Apr 27;149(3):515–24.
158. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJC. **The long and short of microRNA.** *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):516–9.
159. Zeng Y, Cullen BR. **Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5.** *Nucleic Acids Res.* 2004;32(16):4776–85.
160. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature.* 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
161. Gagnol A, Buckler C, Jeang KT. **Relatedness of an RNA-binding motif in human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA-binding protein TRBP to human P1/dsI kinase and Drosophila staufen.** *Mol Cell Biol.* 1993 Apr;13(4):2193–202.
162. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. **Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis.** *Mol Cell.* 2015 Feb 5;57(3):397–407.
163. Filipowicz W. **RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine.** *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):17–20.
164. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, Patel DJ. **Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex.** *Nature.* 2008 Dec 18;456(7224):921–6.
165. Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, et al. **RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 16;110(16):6536–41.
166. Dlakić M. **DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold.** *Bioinforma Oxf Engl.* 2006 Nov 15;22(22):2711–4.
167. Yang J-S, Maurin T, Lai EC. **Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis.** *RNA N Y N.* 2012 May;18(5):945–57.
168. Gavrillov K, Saltzman WM. **Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies.** *Yale J Biol Med.* 2012 Jun;85(2):187–200.
169. Saunders MA, Liang H, Li W-H. **Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3300–5
170. Mishra PJ, Bertino JR. **MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine.** *Pharmacogenomics.* 2009 Mar;10(3):399–416.
171. Lian S, Fritzler MJ, Katz J, Hamazaki T, Terada N, Satoh M, et al. **Small interfering RNA-mediated silencing induces target-dependent assembly of GW/P bodies.** *Mol Biol Cell.* 2007 Sep;18(9):3375–87.
172. Chu C, Rana TM. **Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54.** *PLoS Biol.* 2006;4(7):e210.
173. Baer C, Claus R, Plass C. **Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer.** *Cancer Res.* 2013 Jan 15;73(2):473–7.
174. Guo L-H, Li H, Wang F, Yu J, He J-S. **The Tumor Suppressor Roles of miR-433 and miR-127 in Gastric Cancer.** *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):14171–84.
175. Westholm JO, Lai EC. **Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing.** *Biochimie.* 2011 Nov;93(11):1897–904.
176. Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, et al. **miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estro-**

- gen receptor-alpha in human breast cancer cells.** *Cell Death Differ.* 2010 Feb;17(2):246–54.
177. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, et al. **Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 α , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells.** *J Pathol.* 2011 Jun;224(2):280–8.
178. Hansen MF, Cavenee WK. **Tumor suppressors: recessive mutations that lead to cancer.** *Cell.* 1988 Apr 22;53(2):173–4.
179. Dalmay T, Edwards DR. **MicroRNAs and the hallmarks of cancer.** *Oncogene.* 2006 Oct 9;25(46):6170–5.
180. Ventura A, Jacks T. **MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way.** *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):586–91.
181. Díaz Pardo SM, Antón Aparicio LM. **El Papel de los microARNs en el cáncer: desarrollo y potencialidad terapéutica.** Madrid: Médica Panamericana; 2010.
182. Pekarsky Y, Croce CM. **Role of miR-15/16 in CLL.** *Cell Death Differ.* 2015 Jan;22(1):6–11.
183. Cicchini C, de Nonno V, Battistelli C, Cozzolino AM, De Santis Puzzonnia M, Ciafrè SA, et al. **Epigenetic control of EMT/MET dynamics: HNF4 α impacts DNMT3s through miRs-29.** *Biochim Biophys Acta.* 2015 Aug;1849(8):919–29.
184. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. **Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181.** *Cancer Res.* 2006 Dec 15;66(24):11590–3.
185. Hemmat M, Rumpel MJ, Mahon LW, Strom CM, Anguiano A, Talai M, et al. **Short stature, digit anomalies and dysmorphic facial features are associated with the duplication of miR-17 ~ 92 cluster.** *Mol Cytogenet.* 2014;7:27.
186. Pezzolesi MG, Platzer P, Waite KA, Eng C. **Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome.** *Am J Hum Genet.* 2008 May;82(5):1141–9.
187. Wang X, Hulshizer RL, Erickson-Johnson MR, Flynn HC, Jenkins RB, Lloyd RV, et al. **Identification of novel HMGA2 fusion sequences in lipoma: Evidence that deletion of let-7 miRNA consensus binding site 1 in the HMGA2 3' UTR is not critical for HMGA2 transcriptional upregulation.** *Genes Chromosomes Cancer.* 2009 Aug;48(8):673–8.
188. Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. **MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field.** *Immunity.* 2007 Feb;26(2):133–7.
189. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. **miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 24;104(17):7080–5.
190. O'Day E, Lal A. **MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer.** *Breast Cancer Res BCR.* 2010;12(2):201.
191. Voorhoeve PM, Agami R. **Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly.** *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jun;1775(2):274–82.
192. Saito Y, Jones PA. **Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells.** *Cell Cycle Georget Tex.* 2006 Oct;5(19):2220–2.
193. Cheng CJ, Slack FJ. **The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer.** *Cancer J Sudbury Mass.* 2012 Jun;18(3):232–7.
194. Mendell JT. **miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease.** *Cell.* 2008 Apr 18;133(2):217–22.
195. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. **Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32**

- amplification in malignant lymphoma.** *Cancer Res.* 2004 May 1;64(9):3087–95.
196. Slack FJ, Weidhaas JB. **MicroRNA in cancer prognosis.** *N Engl J Med.* 2008 Dec 18;359(25):2720–2.
 197. Roush S, Slack FJ. **The let-7 family of microRNAs.** *Trends Cell Biol.* 2008 Oct;18(10):505–16.
 198. Georges SA, Biery MC, Kim S-Y, Schelter JM, Guo J, Chang AN, et al. **Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215.** *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10105–12.
 199. Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, et al. **Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 11;105(10):3903–8.
 200. Okada N, Lin C-P, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, et al. **A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression.** *Genes Dev.* 2014 Mar 1;28(5):438–50.
 201. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. **RAS is regulated by the let-7 microRNA family.** *Cell.* 2005 Mar 11;120(5):635–47.
 202. Bar-Sagi D. **ras proteins: biological effects and biochemical targets (review).** *Anticancer Res.* 1989 Oct;9(5):1427–37.
 203. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Sjoblom T, et al. **The colorectal microRNAome.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3687–92.
 204. Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, et al. **Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K.** *Cell.* 2009 Dec 11;139(6):1096–108.
 205. Altomare DA, Testa JR. **Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer.** *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7455–64.
 206. Lewis BP, Shih I-hun., Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. **Prediction of mammalian microRNA targets.** *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):787–98.
 207. Wang Y, Godin-Heymann N, Dan Wang X, Bergamaschi D, Llanos S, Lu X. **ASPP1 and ASPP2 bind active RAS, potentiate RAS signalling and enhance p53 activity in cancer cells.** *Cell Death Differ.* 2013 Apr;20(4):525–34.
 208. Ragusa M, Statello L, Maugeri M, Majorana A, Barbagallo D, Salito L, et al. **Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in colorectal cancer after treatment with MAPK/ERK inhibitors.** *J Mol Med Berl Ger.* 2012 Dec;90(12):1421–38.
 209. Ma L, Weinberg RA. **MicroRNAs in malignant progression.** *Cell Cycle Georget Tex.* 2008 Mar 1;7(5):570–2.
 210. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. **The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis.** *Nat Cell Biol.* 2008 Feb;10(2):202–10.
 211. Park S-M, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. **The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.** *Genes Dev.* 2008 Apr 1;22(7):894–907.
 212. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. **Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis.** *Nature.* 2008 Jan 10;451(7175):147–52.
 213. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834–8.

214. Wu Q, Yang Z, Shi Y, Fan D. **MiRNAs in human cancers: the diagnostic and therapeutic implications.** *Curr Pharm Des.* 2014;20(33):5336–47.
215. Lakshmi MS, Sherbet GV. **Epigenetic grading and metastatic potential of carcinomas of the breast.** *Anticancer Res.* 1983 Jun;3(3):181–4.
216. **Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community: CPMP Working Party on Efficacy of Medicinal Products.** *Pharmacol Toxicol.* 1990 Oct;67(4):361–73.
217. Edge SB, Compton CC. **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** *Ann Surg Oncol.* 2010 Jun;17(6):1471–4.
218. Fisher B, Jeong J-H, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. **Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation.** *N Engl J Med.* 2002 Aug 22;347(8):567–75.
219. Haffty BG. **Molecular and genetic markers in the local-regional management of breast cancer.** *Semin Radiat Oncol.* 2002 Oct;12(4):329–40.
220. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, et al. **Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials.** *Lancet.* 2011 Aug 27;378(9793):771–84.
221. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. **Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial.** *Lancet.* 2013 Mar 9;381(9869):805–16.
222. Bonadonna G, Rossi A, Valagussa P. **Adjuvant CMF chemotherapy in operable breast cancer: ten years later.** *Lancet.* 1985 Apr 27;1(8435):976–7.
223. Zambetti null, Giacobone null, Terenziani null, Zucchinelli null, Demicheli null, Biasi null, et al. **Sequential Adriamycin and CMF in Metastatic Breast Cancer.** *The Oncologist.* 1997;2(4):223–7.
224. Kaufmann M, Jonat W, Abel U, Hilfrich J, Caffier H, Kreienberg R, et al. **Adjuvant randomized trials of doxorubicin/cyclophosphamide versus doxorubicin/cyclophosphamide/tamoxifen and CMF chemotherapy versus tamoxifen in women with node-positive breast cancer.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1993 Mar;11(3):454–60.
225. Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, Alba E, Calvo L, Ruiz-Borrego M, et al. **Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer.** *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jun 4;100(11):805–14.
226. Jones SE, Savin MA, Holmes FA, O'Shaughnessy JA, Blum JL, Vukelja S, et al. **Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Dec 1;24(34):5381–7.
227. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. **Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group.** *Am J Clin Oncol.* 1982 Dec;5(6):649–55.
228. Kaplan PA, Frazier SR, Loy TS, Diaz-Arias AA, Bradley K, Bickel JT. **1D5 and 6F11: An immunohistochemical comparison of two monoclonal antibodies for the evaluation of estrogen receptor status in primary breast carcinoma.** *Am J Clin Pathol.* 2005 Feb;123(2):276–80.

229. Walker NJ. Tech.Sight. **A technique whose time has come.** Science. 2002 Apr 19;296(5567):557–9.
230. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, González-Barón M, Pinto-Marín A, Hardison D, López R, et al. **Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues.** BioTechniques. 2010 May;48(5):389–97.
231. Stigler GJ. **Tools of persuasion: the consequences of economic rhetoric.** Science. 1989 May 19;244(4906):839–40.
232. D.R. Cox. **Regression Models and Life-Tables.** J R Stat Soc Ser B Methodol.
233. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. **Genes that mediate breast cancer metastasis to lung.** Nature. 2005 Jul 28;436(7050):518–24.
234. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. **A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer.** N Engl J Med. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
235. Simon R, Lam A, Li M-C, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. **Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools.** Cancer Inform. 2007;3:11–7.
236. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. **REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK).** Br J Cancer. 2005 Aug 22;93(4):387–91.
237. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. **REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK).** Nat Clin Pract Oncol. 2005 Aug;2(8):416–22.
238. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. **Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK).** J Natl Cancer Inst. 2005 Aug 17;97(16):1180–4.
239. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ezp-prod1.hul.harvard.edu/geo/query/acc.cgi?acc=GSE37405>.
240. Lyng MB, Lænkholm A-V, Søkilde R, Gravgaard KH, Litman T, Ditzel HJ. **Global microRNA expression profiling of high-risk ER+ breast cancers from patients receiving adjuvant tamoxifen mono-therapy: a DBCG study.** PloS One. 2012;7(5):e36170.
241. Schork NJ. Personalized medicine: **Time for one-person trials.** Nature. 2015 Apr 30;520(7549):609–11.
242. Bombard Y, Bach PB, Offit K. **Translating genomics in cancer care.** J Natl Compr Cancer Netw JNCCN. 2013 Nov;11(11):1343–53.
243. Roehrborn CG, Black LK. **The economic burden of prostate cancer.** BJU Int. 2011 Sep;108(6):806–13.
244. Roger VL, O'Donnell CJ. **Population health, outcomes research, and prevention: example of the American Heart Association 2020 goals.** Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2012 Jan;5(1):6–8.
245. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. **Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses.** Blood. 2003 Jan 1;101(1):97–100.
246. Chlebowski RT, Col N. **Bisphosphonates and breast cancer incidence and recurrence.** Breast Dis. 2011;33(2):93–101.
247. Miller G, Roehrig C, Hughes-Cromwick P, Lake C. **Quantifying national**

- spending on wellness and prevention. *Adv Health Econ Health Serv Res.* 2008;19:1–24.
248. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. **Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1999 Jul;17(7):1983–7.
249. Apple SK, Lowe AC, Rao PN, Shintaku IP, Moatamed NA. **Comparison of fluorescent in situ hybridization HER-2/neu results on core needle biopsy and excisional biopsy in primary breast cancer.** *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2009 Sep;22(9):1151–9.
250. Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Bes-Rastrollo M, Toledo E, García-López M, Martínez-González MA. **[Increasing trend in the prevalence of morbid obesity in Spain: from 1.8 to 6.1 per thousand in 14 years].** *Rev Esp Cardiol.* 2011 May;64(5):424–6.
251. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, et al. **Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies.** *Mol Cancer.* 2006;5:24.
252. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. **Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells.** *BMC Biotechnol.* 2007;7:36.
253. Jang JS, Simon VA, Feddersen RM, Rakhshan F, Schultz DA, Zschunke MA, et al. **Quantitative miRNA expression analysis using fluidigm microfluidics dynamic arrays.** *BMC Genomics.* 2011;12:144.
254. Melin J, Quake SR. **Microfluidic large-scale integration: the evolution of design rules for biological automation.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007;36:213–31.
255. Peltier HJ, Latham GJ. **Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues.** *RNA N Y N.* 2008 May;14(5):844–52.
256. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. **Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues.** *BMC Genomics.* 2007;8:166.
257. Sotiriou C, Piccart MJ. **Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care?** *Nat Rev Cancer.* 2007 Jul;7(7):545–53.
258. Pusztai L. **Lost in translation--prognostic signatures for breast cancer.** *Nat Clin Pract Oncol.* 2008 Jul;5(7):363.
259. Daetwyler HD, Calus MPL, Pong-Wong R, de Los Campos G, Hickey JM. **Genomic prediction in animals and plants: simulation of data, validation, reporting, and benchmarking.** *Genetics.* 2013 Feb;193(2):347–65.
260. Olsen C, Fleming K, Prendergast N, Rubio R, Emmert-Streib F, Bontempi G, et al. **Inference and validation of predictive gene networks from biomedical literature and gene expression data.** *Genomics.* 2014 May;103(5-6):329–36.
261. Wang J, Guan X, Guo F, Zhou J, Chang A, Sun B, et al. **miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6.** *Cell Death Dis.* 2013;4:e845.
262. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al.

- MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer.** *Breast Cancer Res BCR.* 2009;11(3):R27.
263. Baraniskin A, Birkenkamp-Demtroder K, Maghnouj A, Zöllner H, Munding J, Klein-Scory S, et al. **MiR-30a -5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL.** *Carcinogenesis.* 2012 Apr;33(4):732–9.
264. Yan M. **Therapeutic promise and challenges of targeting DLL4/NOTCH1.** *Vasc Cell.* 2011;3:17.
265. Cheng C-W, Wang H-W, Chang C-W, Chu H-W, Chen C-Y, Yu J-C, et al. **MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Aug;134(3):1081–93.
266. Zhang N, Wang X, Huo Q, Sun M, Cai C, Liu Z, et al. **MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin.** *Oncogene.* 2014 Jun 12;33(24):3119–28.
267. Buscaglia LEB, Li Y. **Apoptosis and the target genes of microRNA-21.** *Chin J Cancer.* 2011 Jun;30(6):371–80.
268. Jung E-J, Calin GA. **The Meaning of 21 in the MicroRNA world: perfection rather than destruction?** *Cancer Cell.* 2010 Sep 14;18(3):203–5.
269. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, et al. **Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis.** *Mol Carcinog.* 2011 Feb;50(2):136–42.
270. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. **Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.** *J Biol Chem.* 2008 Jan 11;283(2):1026–33.
271. Huang T-H, Wu F, Loeb GB, Hsu R, Heidersbach A, Brincat A, et al. **Up-regulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion.** *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18515–24.
272. Talotta F, Cimmino A, Matarazzo MR, Casalino L, De Vita G, D’Esposito M, et al. **An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation.** *Oncogene.* 2009 Jan 8;28(1):73–84.
273. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O’Leary JJ, Ruan Q, et al. **Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21.** *Nat Immunol.* 2010 Feb;11(2):141–7.
274. Young MR, Santhanam AN, Yoshikawa N, Colburn NH. **Have tumor suppressor PDCD4 and its counteragent oncogenic miR-21 gone rogue?** *Mol Interv.* 2010 Apr;10(2):76–9.
275. McAndrew CW, Gastwirt RF, Meyer AN, Porter LA, Donoghue DJ. **Spy1 enhances phosphorylation and degradation of the cell cycle inhibitor p27.** *Cell Cycle Georget Tex.* 2007 Aug 1;6(15):1937–45.
276. Weng L, Brown J, Eng C. **PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways.** *Hum Mol Genet.* 2001 Feb 1;10(3):237–42.
277. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. **MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.** *Gastroenterology.* 2007 Aug;133(2):647–58.
278. Hu MG, Hu G-F, Kim Y, Tsuji T, McBride J, Hinds P, et al. **Role of p12(CDK2-API) in transforming growth factor-beta1-mediated growth**

- suppression.** *Cancer Res.* 2004 Jan 15;64(2):490–9.
279. Maggiora M, Oraldi M, Muzio G, Canuto RA. **Involvement of PPAR α and PPAR γ in apoptosis and proliferation of human hepatocarcinoma HepG2 cells.** *Cell Biochem Funct.* 2010 Oct;28(7):571–7.
280. Sarkar J, Gou D, Turaka P, Viktorova E, Ramchandran R, Raj JU. **MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010 Dec;299(6):L861–71.
281. He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD. **Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region.** *Oncogene.* 2000 Jul 13;19(30):3422–33.
282. Zhang Z, Sun H, Dai H, Walsh RM, Imakura M, Schelter J, et al. **MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT.** *Cell Cycle Georget Tex.* 2009 Sep 1;8(17):2756–68.
283. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. **Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2.** *J Biol Chem.* 2009 Nov 27;284(48):33161–8.
284. Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. **The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis.** *Nature.* 1999 Apr 29;398(6730):777–85.
285. Chan SY, Zhang Y-Y, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J. **MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2.** *Cell Metab.* 2009 Oct;10(4):273–84.
286. Puisségur M-P, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, et al. **miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity.** *Cell Death Differ.* 2011 Mar;18(3):465–78.
287. Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. **Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression.** *Oncogene.* 2010 Jul 29;29(30):4362–8.
288. Favaro E, Ramchandran A, McCormick R, Gee H, Blancher C, Crosby M, et al. **MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU.** *PloS One.* 2010;5(4):e10345.
289. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. **MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3.** *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):15878–83.
290. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. **MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress.** *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):1221–9.
291. Mortensen UH, Lisby M, Rothstein R. **Rad52.** *Curr Biol CB.* 2009 Aug 25;19(16):R676–7.
292. Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N, Kim HW, et al. **Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells.** *Circ Res.* 2008 May 23;102(10):1182–91.
293. Xiao Z-G, Deng Z-S, Zhang Y-D, Zhang Y, Huang Z-C. **Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer.** *Eur J Gastroenterol*

- Hepatol. 2013 Mar;25(3):296–301.
294. Fang L, Du WW, Yang W, Rutnam ZJ, Peng C, Li H, et al. **MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2.** Cell Cycle Georget Tex. 2012 Dec 1;11(23):4352–65.
295. Liu S, Patel SH, Ginestier C, Ibarra I, Martin-Trevino R, Bai S, et al. **MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells.** PLoS Genet. 2012;8(6):e1002751.
296. Zhang N, Wei X, Xu L. **miR-150 promotes the proliferation of lung cancer cells by targeting P53.** FEBS Lett. 2013 Aug 2;587(15):2346–51.
297. Chen Z, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, et al. **Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma.** Oral Oncol. 2012 Aug;48(8):686–91.
298. Doghman M, Wakil A El, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, et al. **Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors.** Cancer Res. 2010 Jun 1;70(11):4666–75.
299. Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C, et al. **miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation.** Cancer Res. 2011 Feb 15;71(4):1313–24.
300. Li M, Lü N, Liu H, Chen D, Zhang J. [Expression profiling of microRNA and their target genes in peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2013 Aug;42(8):519–24.
301. Liu N, Cui R-X, Sun Y, Guo R, Mao Y-P, Tang L-L, et al. **A four-miRNA signature identified from genome-wide serum miRNA profiling predicts survival in patients with nasopharyngeal carcinoma.** Int J Cancer J Int Cancer. 2014 Mar 15;134(6):1359–68.
302. Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** Cell. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
303. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
304. Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC, Marinopoulos S, Parmigiani G, Bass EB, et al. **Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer.** Ann Intern Med. 2008 Mar 4;148(5):358–69.

9 Resumen – Summary

MicroRNA expression as a prognostic factor in early node- positive breast cancer

Introduction

Breast cancer represents a heterogeneous group of tumors. These various types of breast cancer are defined on the basis of their different histology, clinical evolution and different genomic profile. Molecular profiles have shown significant differences in terms of risk factors, prognosis, and response to treatments. Despite early diagnosis, better classification, and improved management, up to 40% of node positive-early breast cancers treated with adjuvant chemotherapy will relapse and eventually die due to metastatic disease. Over the years, adjuvant treatment (defined as chemotherapy, hormonotherapy, and targeted therapy) has become commonly used. However, the duration of treatment, target population, and regimen have not yet been well established. With this in mind, a large subset of patients is at risk for overtreatment. More accurate strategies are needed to better identify molecular-based therapeutic targets, discover new drugs, and design clinical trials that will facilitate positive results to suitable targeted therapies. Although immunohistochemistry (IHC) remains the gold standard in the histological assessment of breast cancer, the cost and technology needed for gene expression profiling, hopefully, will become feasible as a routine in the practice.

Clinically, breast cancer is classified into three basic therapeutic groups. The estrogen receptor (ER) positive is the largest and most heterogeneous subgroup. Different molecular tests have already been developed to predict outcome and response to endocrine therapy in this subgroup. The HER2 subgroup (HER2-amplified) has a wide and effective set of drugs targeting of

Analysis of MicroRNAs Profile as a Prognostic Factor in Node-Positive Breast Cancer

- Resumen - Summary -

HER2, which has led to an exceptional success increasing overall survival. Triple-negative breast cancers (lack expression of ER, progesterone receptor and HER2), are characterized for being diagnosed more frequently in younger and premenopausal women. This subgroup is in nature more aggressive, the only available treatment is chemotherapy and although they may respond better than other types of breast cancer, prognosis remains rather poor. One of the main objectives of the personalized medicine is to accurately predict the prognosis at the time of diagnosis in order to optimize management of each subtype of tumor and ideally for each patient. The development of molecular profiling technologies to assess genomic alterations has provided an excellent opportunity to tailor patient management. Indeed, validated molecular tests such as Mamaprint® or Oncotype® are already driven management choice making.

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding molecules of ~20–25 nucleotides. They play a major role in regulatory pathways and biological processes by affecting the translation of multiple mRNA types. miRNAs are emerging as tissue-specific biomarkers with the potential for clinical application—they can be used to assess prognosis and response to treatments in several types of cancers.

We previously determined the expression of miRNA by focusing on differences between formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and fresh frozen (FF) tissue. In our study, we have correlated the expression profiles of miRNA expression and generated an 8-miRNA prognostic signature that stratifies a cohort of patients with early breast cancer node positive in two subgroups (high risk and low risk of relapse). We have also correlated the 8-miRNA signature with prognosis and survival independent of the adjuvant treatment and the molecular subgroup.

Methods

Patients

Patients diagnosed at “University Hospital 12 de Octubre” from January 1995 to December 2000, and demonstrating breast carcinoma with lymph node metastases were eligible for this study. Patients without available tissue for histological and genetic study were excluded. A total of 2 cohorts were analyzed: a discovery cohort (n=19) with available FF and FFPE and a validation cohort (n=172, included the discovery cohort) with available FFPE. A total of 172 patients with complete tumor resection, regardless the adjuvant treatment and with enough tissue preserved were included in this study. Pathologists at our institution reviewed the tumor resection specimens. This study was approved by the Institutional Review Board before data collection was initiated.

miRNA Extraction and Expression

Total RNA for miRNA profiling was extracted from FFPE tissue with at least 70% of tumor cells. The method for extraction Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). Reverse transcription was carried out by using input amounts 100 µg of total RNA from FFPE samples using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits. The preamplified complementary DNAs were loaded onto 384-well format miRNA assays plates (TaqMan Array Human MicoRNA a Card, V2.0; ABI), and then qRT-PCR was performed on a Real-Time PCR System (ABI PRISM 7900HT). Average cycling threshold (Ct) values, were obtained using SDS 2.2 software (Applied Biosystems). The maximum Ct value was set at 40. Ct values were normalized using four reference housekeeping genes. The relative expression level of each target gene was calculated. A supervised analysis was done in order to identify miR that could predict relapse.

miRNA profiling data analysis

Analysis of MicroRNAs Profile as a Prognostic Factor in Node-Positive Breast Cancer

- Resumen - Summary -

The raw data were uploaded into BRB-ArrayTools version 3.6.1 for analysis. Briefly, we performed global median normalization for the entire data set from FFPE cases prior to any further analysis based on Normean previously developed by the group.

To select miRNAs for analysis, we used 3 approaches: (a) miRNAs with expression in the discovery cohort for at least 7 of 19 cases were selected (b) miRNAs with poor correlation in miRNA expression levels between FF and FFPE samples were discarded (c) miRNAs demonstrating minimal variation across the arrays from analysis were excluded, including only miRNAs whose expression differed by at least a 7% in a coefficient of variation.

Methodology used to find a reduced profile

We computed a statistical significance level for each miRNA based on a univariate proportional hazards model with the aim of identifying significant miRNAs. The selected genes were used to develop a miRNA expression-based prediction model of recurrence risk using the supervised principal component. We assessed cutoff points, and left 60% of patients in the low risk group. To test the statistical significance of the cutoff point, the p-value of the log-rank test statistic for the risk groups was evaluated using 1000 random permutations. Analyses were performed in BRB-ArrayTools v3.6.1

Survival analysis

Disease-free survival (event was defined as relapsed after the date of surgery) and overall survival (event was defined as death from any cause) were estimated by using the Kaplan-Meier method, and differences were assessed by using the log-rank test.

Results

Patients

Analysis of MicroRNAs Profile as a Prognostic Factor in Node-Positive Breast Cancer

- Resumen - Summary -

A total of 172 patients were included. Table 1 displays the clinical features of and therapies received. The median age was 53 years and the median follow-up was 105 months. Seventy one patients (47%) had a distant relapse. Moreover, from those 71 patients, 41 died and 1 had incomplete follow-up after the relapse. Among 81 patients who did not have a distant relapse, 1 had a local/regional recurrence that was successfully treated with surgery and adjuvant hormonotherapy. Only 19 out 116 relapses were histologically confirmed.

miRNA profiling data analysis

To make our analysis more robust, we selected 245 miRNAs that were expressed in at least 7 out 19 of the samples among the 663 human miRNAs analyzed in the training set. One-hundred sixty one out of 245 miRNAs exhibited highly correlated expression levels in FF and FFPE samples. Ninety-one miRNAs had a variation coefficient higher than 7 and were selected to be applied in the 172 samples. Patients were divided into two groups based on median expression levels of each miRNA. An 8-miRNAs model was selected as it demonstrated the best performance.

The 8 miRNA signature was associated with longer disease-free survival. BRB ArrayTools was used to define a cutoff point for risk stratification. We assessed cut-off 60% of patients in the low risk group. The *P*-value of the log-rank test, used to calculate recurrence risk between risk groups based on 1000 permutations, was 0.018. Relapse free survival (RFS) at five years was 69.6 for patients in the high-risk group and not reached for patients in the low-risk group (HR: 3,75 CI 95%: 2,27-6,19; $p < 0,0001$). Overall survival at five years was 98% for the low-risk group and 72% for the high-risk group (HR:4,51 CI 95%: 2,6-8,61 $p < 0,0001$). Univariate analysis evaluating the effects of pathological factors on RFS and OS were per-

Analysis of MicroRNAs Profile as a Prognostic Factor in Node-Positive Breast Cancer

- Resumen - Summary -

formed. A sub-analysis was performed to evaluate the functionality of *the 8-miRNA signature* based on the molecular subgroups. The 8 miRNA signature was able to stratify luminal A, luminal B and triple negative subgroups based on histological phenotype.

The multivariate Cox proportional hazards analysis included the 8-miRNA score, tumor size, nodal status, and tumor grade. The 8-gene Score was able to predict RFS, indicating that this gene expression profile added important prognostic information added to clinical factors. Lymph node status remained the only clinical factor with significant independent predictive value.

To validate the prognostic role of the 8-miRNA signature in a different cohort, we applied the same profile in a testing cohort from an open free online database, *GEO database (access number GSE37405)*. The 8-miRNA signature identified significant differences in RFS in a cohort of 152 postmenopausal breast cancer patients, ER+treated with tamoxifen. Even with the limitations of the external database validation, the performance of the 8-miRNA signature was successful.

Discussion

In this report, we determined that the expression levels of miRNAs analyzed in paraffin-embedded tissue can improve the prognostic classification of patients with early breast cancer and nodal involvement. Our data suggests that miRNAs may help to assess the prognosis and in our cohort specifically these 8 miRNAs had the better performance.

Certainly, the nature and biological significance of these 8 miRNAs have already been associated with every single “hallmark of cancer”. The oncomiRs miR-21, miR-93, miR-99b, miR-572, miR-210 have been associated with cell growth, replication, angiogenesis, migration, and invasion in different tumor types. On the other hand, the role of miR-30e, miR-30a and miR

Analysis of MicroRNAs Profile as a Prognostic Factor in Node-Positive Breast Cancer

- Resumen - Summary -

150 has been associated with immune response, cell growth and survival. In short, clinical data about the 8 miRNAs and the performance of the model both confirm the possibility of prognostic classification.

Conclusion

This data suggests that miRNA signatures from primary tumors may have a prognostic role in early breast cancer with lymph positive-nodes. An 8-miRNA signature model has been discovered as prognostic factor, measuring the risk of recurrence and death of disease.

Análisis de un perfil de MicroRNAs como Factor Pronóstico en Cáncer de Mama con Afectación Axilar

Introducción

El cáncer de mama representa un grupo heterogéneo de tumores. Estos diversos tipos de cáncer de mama se definen en base a su histología, evolución clínica y diferente perfil genómico. Los perfiles moleculares han demostrado diferencias significativas en términos de factores de riesgo, pronóstico y respuesta a los tratamientos. A pesar de un diagnóstico precoz, una mejor clasificación, y la mejora del manejo, hasta los 40% de los tumores de mama con afectación axilar tratadas con el mejor tratamiento adyuvante recaen, y posteriormente mueren debido a la enfermedad metastásica. Con los años, el tratamiento adyuvante (incluyendo quimioterapia, hormonoterapia y terapia dirigida) se usa muy frecuentemente. Sin embargo, la duración del tratamiento, población diana, y el régimen individual aún no han sido bien establecidos. Por lo tanto, existe un gran grupo de pacientes en riesgo de sobretratamiento. Se necesitan estrategias más precisas para determinar mejores dianas terapéuticas, descubrir nuevos fármacos y diseñar ensayos clínicos que faciliten el éxito de las nuevas terapias dirigidas. Aunque las inmunohistoquímica (IHC) sigue siendo el estándar en la evaluación histológica de cáncer de mama, el menor coste y la disponibilidad de la tecnología necesaria para realizar perfiles de expresión génica, probablemente conviertan a las firmas genéticas en un modelo viable en la práctica clínica en un futuro cercano.

Clínicamente, el cáncer de mama se clasifica en tres grupos terapéuticos básicos. El subgrupo con el receptor de estrógeno positivo (RE), es el mayor y más heterogéneo. En este subgrupo se han desarrollado diferentes test moleculares para predecir el resultado y la respuesta a la terapia endocrina. El subgrupo HER2 (HER2-amplificado) tiene varios fármacos que se dirigen contra HER2, y como consecuencia se

ha producido un excepcional aumento de la supervivencia global. Los cánceres de mama triple negativo (falta de expresión del RE, receptor de progesterona y HER2), se caracterizan por diagnosticarse con mayor frecuencia en las mujeres jóvenes y premenopáusicas. Este subgrupo es el de naturaleza más agresiva; el único tratamiento disponible es la quimioterapia y a pesar de que pueden responder mejor que otros subgrupos, el pronóstico sigue siendo bastante adverso. Uno de los principales objetivos de la medicina personalizada es predecir con precisión el pronóstico en el momento del diagnóstico de con el fin de optimizar el manejo de cada subtipo de tumor e, idealmente, para cada paciente. El desarrollo de la tecnología para evaluar alteraciones genómicas y mejorar la clasificación molecular ha proporcionado una excelente oportunidad para adaptar el manejo del paciente. De hecho, diversos test moleculares validados como Mamaprint® y Oncotype® ya están siendo utilizados en la práctica clínica.

Los microARNs (miRNAs) son moléculas no codificantes del ~20-25 nucleótidos. Desempeñan un papel importante en las vías de regulación y los procesos biológicos que afectan a la traducción de múltiples tipos de ARN mensajero. Los miRNAs están surgiendo como biomarcadores específicos de tejido con potencial para ser aplicados en la clínica y que pueden ser utilizados para evaluar el pronóstico y la respuesta a los tratamientos en varios tipos de cánceres.

En nuestro estudio, hemos correlacionado los perfiles de expresión de los miARN con supervivencia generando una firma pronóstica. La firma incluye 8 miRNA que estratifican en dos subgrupos (de alto riesgo y de bajo riesgo) una cohorte de pacientes con cáncer de mama con afectación axilar. El perfil de 8 miRNA también se ha correlacionado con el pronóstico y la supervivencia independientemente del tratamiento adyuvante recibido y el subgrupo molecular.

Métodos

Pacientes

Se revisaron los casos de carcinoma de mama infiltrante con afectación ganglionar axilar al diagnóstico, en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre el 1 de Enero de 1995 y el 31 de Diciembre de 2000. Se excluyeron los pacientes sin tejido disponible para el estudio histológico y molecular. Se analizaron 2 cohortes: una cohorte de exploración (n = 19) con FF y FFPE disponible, y una cohorte de validación (n = 172, incluida la cohorte exploración) con FFPE disponible. Un total de 172 pacientes con resección completa del tumor, sin tener en cuenta el tratamiento adyuvante y con suficiente tejido preservado se incluyeron en este estudio. Patólogos especializados en nuestro centro revisaron los especímenes tumorales. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de nuestro centro antes de iniciar la recogida de datos.

Extracción y Expresión de miARN

El ARN total para los perfiles de miARNs se extrajeron a partir de zonas de FFPE con al menos un 70% de células tumorales. El ARN total se aisló de las muestras tumorales empleando el RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). Se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción de ARN total aislada de las muestras empleando el “TaqMan® MicroARN Reverse Transcription Kits” Applied Biosystems. El ADNc se introdujo en placas con 384 pocillos (Array TaqMan MicoRNA humano), y luego se realizó la RT-qPCR a tiempo real con el modelo ABI PRISM 7900HT. Los valores medios del umbral de ciclo (Cq), se obtuvieron utilizando el programa SDS 2,4 (Applied Biosystems). El valor máximo de Cq se fijó en 40. Los valores de Cq se normalizaron usando cuatro genes de referencia. El nivel de expresión relativa de cada gen fue calculado a partir de los genes de referencia. Se realizó un análisis supervisado con el fin de identificar qué miARNs podían predecir la recaída.

Generación de un perfil de miARN

Se calcularon los factores de normalización mediante la inclusión por pasos de genes de referencia y calculando la media geométrica de sus niveles de expresión.

Para la selección miRNAs incluidos en el análisis se realizaron 3 pasos: (a) Se seleccionaron los miARNs con expresión medible en al menos 7 de las 19 muestras en la cohorte de exploración; (b) los miRNAs con baja correlación en los niveles de expresión entre muestras FF y FFPE fueron descartados; c) se seleccionaron los miRNAs con al menos una variación de 7% en la cohorte de exploración.

Metodología utilizada para encontrar un perfil reducido

Con la selección final de miARNs se generó un nivel de significación estadística para cada miARN basándose en un modelo de riesgo proporcional univariante. Los genes seleccionados se utilizaron para desarrollar un modelo de predicción basada en la expresión de miRNA y el riesgo de recurrencia utilizando un análisis supervisado. Para probar la significación estadística en el punto de corte, el valor p de log-rank para los grupos de riesgo se evaluó con 1000 permutaciones aleatorias. Los análisis se realizaron en BRB-ArrayTools v3.6.2

El análisis de supervivencia

Supervivencia libre de enfermedad (se definió como recaída después de la fecha de la cirugía) y la supervivencia global (se definió como muerte por cualquier causa) se estimaron utilizando el método de Kaplan-Meier, y las diferencias se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

Resultados

Pacientes

Se incluyeron un total de 172 pacientes. La mediana de edad fue de 53 años y la mediana de seguimiento fue de 105 meses. Setenta y un pacientes (47%) tuvieron una recaída a distancia. De esos 71 pacientes, 41 murieron y se perdió el seguimiento de uno

de los pacientes después de la recaída. Entre 81 pacientes que no tuvieron una recaída distante, una paciente tuvo una recaída loco-regional que fue tratada con cirugía y hormonoterapia adyuvante. Sólo 19, de un total 116 recaídas fueron confirmadas histológicamente.

Generación de un perfil de miARN

Para hacer el análisis más robusto, de los los 663 miRNAs humanos analizados, se seleccionaron 245 miRNAs que se expresaban en al menos 7 de las 19 muestras de la cohorte de exploración. 171 de 245 miRNAs mostraron niveles de expresión altamente correlacionados en muestras de FF y FFPE. Finalmente, 91 miRNAs tenían un coeficiente de variación superior a 7% y fueron seleccionados para ser aplicado en las 172 muestras. Los pacientes se dividieron en dos grupos basados en la mediana de los niveles de expresión de cada miRNA. Un modelo de 8 miRNAs fue seleccionado porque demostró el mejor rendimiento.

El perfil de 8 miRNA se asoció con la supervivencia libre de enfermedad. BRB ArrayTools se utilizó para definir un punto de corte para la estratificación del riesgo. Se evaluó el corte 60% de los pacientes en el grupo de bajo riesgo. El valor P de la prueba de log-rank, utilizado para calcular el riesgo de recurrencia entre los grupos de riesgo sobre la base de 1000 permutaciones, fue de 0.018. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) a cinco años fue 69,6 para los pacientes en el grupo de alto riesgo y no se alcanzó para los pacientes en el grupo de bajo riesgo (HR: 3,75 IC del 95%: 2,27-6,19; $p < 0,0001$). La supervivencia global (SG) a los cinco años fue del 98% para el grupo de bajo riesgo y 72% para el grupo de alto riesgo (HR: 4,51 IC del 95%: 2,6-8,61 $p < 0,0001$). Se realizó un análisis univariante para la evaluación de los efectos de los factores patológicos en SLE y SG. Se realizó un subanálisis para evaluar la funcionalidad del perfil de 8 miARN basado en los subgrupos moleculares. El perfil de 8 miARN fue

capaz de estratificar luminal A, luminal B y subgrupos triple negativo basados en fenotipo histológico.

El modelo de los riesgos proporcionales (regresión de Cox) incluyó el perfil de 8 miARNs, el tamaño, estado ganglionar, y el grado tumoral. El perfil de 8 miARNs fue capaz de predecir SLE, indicando que este perfil de expresión génica añade información pronóstica a los factores clínicos. La afectación axilar siguió siendo el único factor clínico con significativo valor predictivo independiente.

Para validar el papel pronóstico de la firma de 8 miARNs en una cohorte diferente, se aplicó el mismo perfil en una cohorte obtenida de una base de datos pública: GEO (número de acceso GSE37405). El perfil de 8 miARNs identificó diferencias significativas en SLE en una cohorte de 152 pacientes de cáncer de mama posmenopáusicas, RE + tratadas con tamoxifeno. Incluso con las limitaciones de una meta-validación, el resultado del perfil de 8 miARN fue positivo.

Discusión

En este estudio, determinamos que los niveles de expresión de miRNAs medidos en FFPE puede mejorar la clasificación pronóstica de los pacientes con cáncer de mama y afectación axilar. Nuestros datos sugieren que los miRNAs pueden ayudar a evaluar el pronóstico, y específicamente en nuestra cohorte estos 8 miRNAs proporcionaban información pronóstica adicional.

En realidad, estos 8 miRNAs han sido ya relacionados con cada uno de los “hallmarks” del cáncer. Los oncomiRs miR-21, miR-93, miR-99b, miR-572, miR-210 se han asociado con el crecimiento celular, la replicación, la angiogénesis, la migración y la invasión en diferentes tipos de tumores. Por otro lado, el papel de miR-30e, miR-150 y miR 30a ha sido asociado con la respuesta inmunitaria, el crecimiento celular y la

supervivencia. En resumen, tanto los datos clínicos sobre los 8 miRNAs como el rendimiento del modelo apoyan la validez del factor pronóstico.

Conclusión

Estos datos sugieren que los perfiles de miARNs a partir de tumores primarios pueden tener un papel pronóstico en el cáncer de mama con afectación axilar. Se describe un perfil de 8 miRNAs como factor pronóstico aplicado al riesgo de recurrencia y de muerte específica.

***Lista de Abreviaturas**

ACS	American Cancer Society
AGO2	Proteína argonauta 2
AGO2	Argonauta 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMM	Asociación Médica Mundial
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATAC	Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination
ATLAS	Adjuvant Tamoxifen, Longer Against Shorter
BASC	BRCA1-Associated genomeSurveillance Complex
BCIRG	Breast Cancer InteARNtional Research Group
BIG	Breast InteARNtional Group
BPC	Buena Práctica Clínica
BRCA	BReast CAncer
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CASP8AP2	Proteínas Caspasa-8-Asociada a la Proteína 2
ccRCC	Carcinoma de Células Renales de Células Claras
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
CDK	Ciclinas Dependientes de Kinasas
cADN	ADN citosólico
CK	Citoquereatina
CLI	Carcinoma Lobulillar In Situ
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluorouracilo
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region protein 8
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dsARN	ARN de Doble Cadena
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Epidermic Growth Factor Receptor
EMT	Transición Epitelio-Mesénquima
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FDA	Food and Drug Administration
FEC	Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida
FF	Fresh Frozen
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization

GDT	Guanosina Difosfato
GEICAM	Grupo Español de Investigación en el Cáncer de Mama
GTP	Guanosina Trifosfato
Gy	Gray
H&E	Hematosilina-Eosina
HERA	HERceptin Adjuvant
HIF1A	Hipoxia Inducible Factor
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
IGFR	Receptor del Factor de Crecimiento de la Insulina
IgG1	Inmunoglobulina G1
IHQ	Inmunohistoquímica
ITC	Isolated Tumours Cells
LCS	<i>Let-7</i> Ccomplementary Sites
LPS	Lipopolisacárido
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MINDACT	Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy
miRISC	Complejo RISC formado por miARNs
ARNm	ARN mensajero
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCCTG	North Central Cancer Treatment Group
NCI	National Cancer Institute
NEJM	New England Journal of Medicine
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
Nt	Nucleótidos
ORL	Otorrinolaringología
PACT	Protein ACTivaTor of PKR
pCR	Respuesta Patológica Completa
PDCD4	Programador de Muerte Celular CD4
PI3K	Phosphatidylinositide 3-Kinases
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Kinasa
PTP1B	Proteína Tirosina-Fosfatasa 1B
PVB	Papiloma Virus Humanos
RAN	
RE	Receptor de Estrógenos
REMARK	REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies
RISC	ARN-induced silencing complex
RM	Resonancia Magnética
ARN	Ácido ribonucleico
ARNsa	RiboNucleasa

RRHH	Receptores Hormonales
RS	Recurrent Score
RT	Radioterapia
RT-PCR	Real Time- Polymerase Chain Reaction
SDHD	Succinato DesHidrogenasa Subunidad D
SG	Supervivencia Global
siARN	ARN de interferencia
siARN	ARN silenciador
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SNC	Sistema Nervioso Central
SOFT	Suppression of Ovarian Function Trial
Tis	Tumor in situ
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNM	Tamaño, Nódulos linfáticos, Metástasis
TP53	Proteína Tumoral 53
TRBP	Transactivation Response ARN Binding Protein
TRH	Terapia de Reemplazo Hormonal
TWIST1	Twist-related protein 1
UTR	UnsTraslated Region
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VEGFR2	Receptor 2 del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
WHO	World Health Organization
ZEB	Zinc finger E-box-Binding homeobox 19

ANEXOS

Anexo 1. Estadificación del cáncer de mama.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). TNM Staging System For Breast Cancer.

(Versión 3.2012)(217).

Tumor primario (T)

TX	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No existe prueba de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
Tis(DIS))	CDIS.
Tis (CLIS)	CLIS.
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón que NO está relacionada con el carcinoma invasor o carcinoma in situ (CDIS o CLIS) en el parénquima mamario subyacente. Los carcinomas del parénquima mamario relacionados con la enfermedad de Paget se clasifican sobre la base del tamaño y las características de la enfermedad parenquimal, aunque la presencia de la enfermedad de Paget aún se debería señalar.
T1	El tumor mide ≤ 20 mm en su mayor dimensión.
T1mi	El tumor mide ≤ 1 mm en su mayor dimensión.
T1a	El tumor mide >1 mm pero ≤ 5 mm en su mayor dimensión.
T1b	El tumor mide >5 mm pero ≤ 10 mm en su mayor dimensión.
T1c	El tumor mide >10 mm pero ≤ 20 mm en su mayor dimensión.

T2	El tumor mide >20 mm pero \leq 50 mm en su mayor dimensión.
T3	El tumor mide >50 mm en su mayor dimensión.
T4	El tumor mide cualquier tamaño con extensión directa a la pared pectoral o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos). La invasión de la dermis no equivale a T4.
T4a	Extensión a la pared torácica que no solo incluye adherencia o invasión a los músculos pectorales.
T4b	Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema (incluyendo la piel de naranja) la cual no satisface el criterio de carcinoma inflamatorio.
T4c	Ambos, T4a y T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio.

Estadificación ganglionar (pN) Patológico

pNX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (p.ej., extirpación previa o no se extirpó para un estudio patológico).
pN0	No se identificó metástasis en ganglios linfáticos regionales por medios histológicos.
<p>Nota: los ITC se definen como pequeños grumos de células ≤ 0.2 mm, o células de un solo tumor o una aglomeración de < 200 células en una sección histológica cruzada única. Las ITC podrían localizarse mediante una histología rutinaria o mediante métodos IHC. Los nódulos que solo contienen ITC se excluyen del recuento total de nódulos positivos para el proceso de clasificación N, pero se deben incluir en el número total de nódulos evaluados.</p>	
pN0(i-)	Histológicamente, no hay metástasis regional a ganglio linfático regional, IHC negativo.
pN0(i+)	Células malignas en ganglio(s) linfático(s) regionale(s) ≤ 0.2 mm (detectado mediante H&E o IHC, incluyendo la ITC).
pN0(mol-)	Histológicamente no hay metástasis a ganglio linfático regional, hallazgos moleculares negativo (RT-PCR).
pN0(mol+)	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se localizó metástasis a ganglio linfático regional alguno mediante histología o IHC.
pN1	Micrometástasis.
	O
	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares.
	O
	Metástasis en ganglios mamarios internos con detección de metástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático

	centinela pero sin detección clínica.
pN1mi	Micrometástasis (>0,2 mm o >200 células pero ninguna >2,0 mm).
pN1a	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis >2,0 mm.
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN1c	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis localizado mediante biopsia de ganglio linfático pero sin detección clínica.
pN2	Metástasis in 4–9 ganglios linfáticos axilares.
	O
	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectadas clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.
pN2a	Metástasis en 4–9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral >2 mm).
pN2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.
pN3	Metástasis en ≥ 10 ganglios linfáticos axilares.
	O
	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares (grado III axilar).
	O
	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos ipsilate-

	rales detectados clínicamente en presencia de ≥ 1 ganglios linfáticos axilares positivos de grado I o II.
	O
	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamarios con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
	O
	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.
pN3a	Metástasis en ≥ 10 ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral $>2,0$ mm).
	O
	Metástasis a los ganglios infraclaviculares (ganglio axilar de grado III).
pN3b	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamarios internos detectados clínicamente en presencia de metástasis a ganglio linfático axilar de ≥ 1 ganglio linfático axilar positivo;
	O
	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamarios con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN3c	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.
Postratamiento ypN	

–Postratamiento yp "N" se deberían evaluar como métodos clínicos (pretratamiento) "N" arriba. El modificador "sn" solo se usa si una evaluación de un ganglio linfático fue llevada a cabo luego del tratamiento. Se asume que la evaluación del ganglio axilar fue mediante DGA.

–Se usará la clasificación X (ypNX) si no se llevó a cabo el pos-tratamiento yp SN o DGA.

–N las categorías son las mismas que se usan para la pN.

Estadio anatómico/grupos pronósticos

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Anexo 2. Aprobación por el Comité Ético.

CODIGO INTERNO: 09/262

Dña. MARIA UGALDE DIEZ, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doce de Octubre.

CERTIFICA:

Que este Comité, en la reunión celebrada el día **24/11/2009**, ha analizado el Proyecto de Investigación **PS09/01394** titulado:

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN PANEL DE MICRO-RNAS (MIRNAS) EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA

Cuyo Investigador Principal es la Dra. **Eva CIRUELOS GIL**,
Del Servicio de **ONCOLOGIA MEDICA**

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, y que es viable en todos sus términos, por lo que lo ha considerado adecuado y ha decidido su **APROBACIÓN**.

Lo que firmo en Madrid, a 27 de noviembre de 2009,

COMITÉ ÉTICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA
Hospital Universitario
"12 de Octubre"
Firmado: *Dra. Maria Ugalde Diez*

Anexo 3. ECOG Performance Status

ECOG PERFORMANCE STATUS	
Grado	ECOG
0	Completamente activo, capaz de realizar toda actividad previa a la enfermedad sin restricciones.
1	Restringido en la actividad física enérgica, pero está en régimen ambulatorio y es capaz de realizar el trabajo de naturaleza ligera o sedentaria (como trabajo de la casa ligero, o trabajo de oficina)
2	En régimen ambulatorio y capaz de cuidar de sí mismo, pero incapaz de realizar ninguna actividad de trabajo. Tiene que quedarse encamado durante < 50% de las horas de vigilia.
3	Capacidad limitada de cuidar de sí mismo, confinado a la cama o una silla durante más del 50% de las horas de vigilia.
4	Totalmente incapaz. No puede cuidar de sí mismo. Totalmente confinado a la cama o una silla.
5	Muerto.

Anexo 4. Kit de aislamiento RecoverAll™

El kit de aislamiento de ácidos nucleicos RecoverAll™ para FFPE está preparado para la extracción de todo el ácido nucleico de tejidos embebidos en parafina (FFPE) y fijados en formol. Tiene las siguientes características:

- Está optimizado para el aislamiento de ácidos nucleicos, incluyendo los micro-ARNs, a partir de tejido FFPE.
- No precisa digestión con proteinasa K durante la noche, se desparafina por la mañana y se realiza la qRT-PCR por la tarde.
- Los rendimientos típicos son > 50% para el tejido no fijado.
- Los ácidos nucleicos recuperados son adecuados para tiempo real RT-PCR, PCR, detección de mutaciones, y los análisis de microarrays.

Extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras difíciles

Las muestras almacenadas de tejidos contienen valiosa información acerca del cáncer, pero tradicionalmente ha sido difícil aislar ácidos nucleicos a partir de ellos con la calidad suficiente para un buen análisis molecular. Las técnicas de conservación estándar utilizan formalina que mantiene la estructura del tejido y evita putrefacción, pero también atrapa ácidos nucleicos y los modifica a través de interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico. El ARN (y en cierta medida ADN) se encuentra frecuentemente tan fragmentado y modificado químicamente que es incompatible con muchas técnicas de análisis molecular. La fragmentación del ARN en los tejidos FFPE no se puede revertir, sin embargo, las condiciones de digestión de la proteasa del kit RecoverAll™ están diseñadas para liberar una cantidad máxima de fragmentos de ARN atrapados de todos los tamaños, incluyendo micro ARN, en un período relativamente corto de tiempo.

La solución del Kit de aislamiento RecoverAll™ total

El procedimiento del Kit de aislamiento RecoverAll™ total requiere unos 45 minutos de trabajo en el laboratorio y generalmente se puede completar en general menos de 1 día para el ARN. Las muestras FFPE se desparafinan utilizando una serie de lavados xileno y etanol. A continuación, se les somete a una extensa digestión con proteasa y precisan de un tiempo de incubación adaptado dependiendo si es para la recuperación de ARN o ADN. Después, los ácidos nucleicos se purifican utilizando un método de vidrio-filtro rápido, y se diluyen en agua o tampón bajo en sal.

Anexo 5. Características del Set TaqMan® Human MicroARN Assay

Características

- Sensibilidad: TaqMan® MicroARN Assays puede detectar desde 10 copias del transcrito en una muestra.
- Especificidad: Cuantifica sólo el miARN de interés; se dirige específicamente sólo a las formas biológicas significativamente más maduras. Se ha mapeado contra la versión más reciente de Sanger.

Anexo 6. Fundamentos del ensayo con 5' Nucleasa. Sondas de degradación (principio TaqMan).

La reacción de PCR utiliza la actividad 5'nucleásica fluorogénica de la ADN AmpliTaq Gold® polimerasa para escindir una sonda TaqMan® durante la PCR. La sonda de degradación o TaqMan® es un oligonucleótido de 20-30 bases que contiene un colorante delator fluorescente en extremo 5' de la sonda y un colorante inhibidor en el extremo 3' de la sonda. Durante la reacción de la polimerasa, la escisión de la sonda por acción de la 5'nucleasa, separa el colorante delator y el colorante inhibidor, lo que produce un aumento de la fluorescencia del colorante delator a medida que aumenta la amplificación. La degradación sólo ocurre si existe hibridación con la diana. La acumulación de los productos de la PCR es detectada directamente al monitorizar el incremento de fluorescencia del colorante indicador.

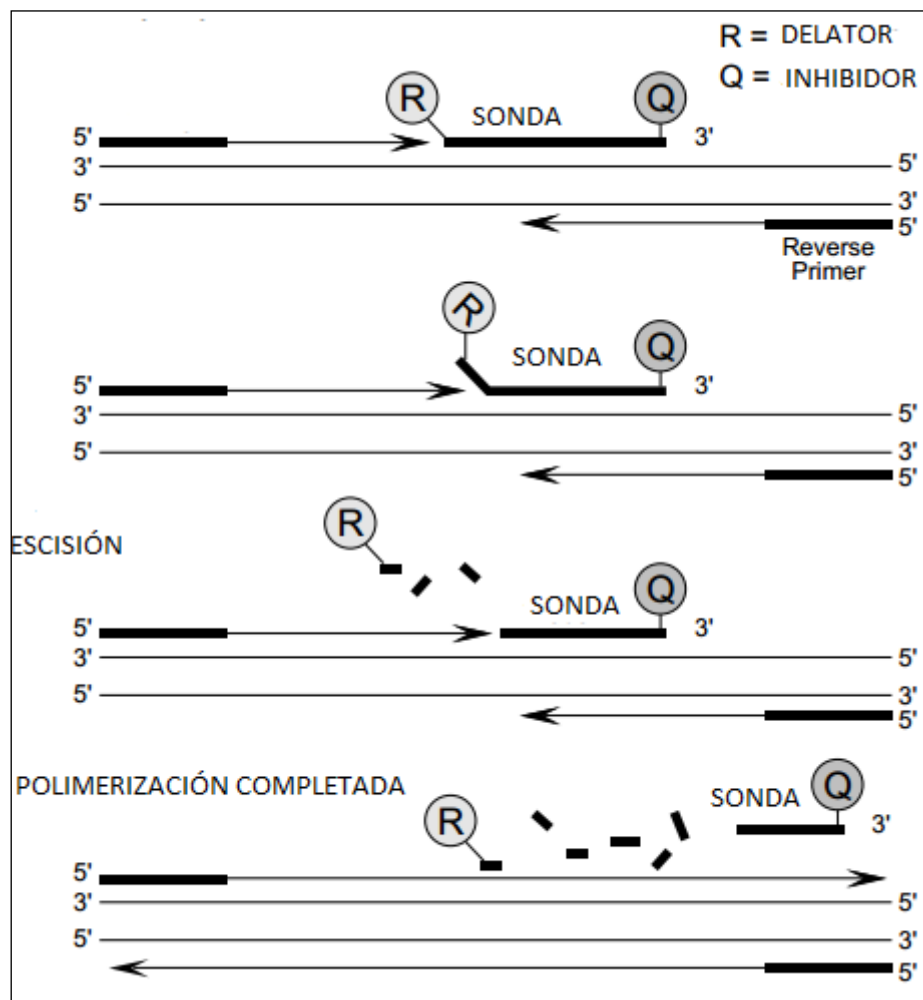


Figura 35. Esquema de sondas de degradación

Resumen del proceso en el termociclador. Las muestras se cargan en la una placa de reacción óptica. El termociclador ABI PRISM® contiene una mezcla maestra y las sondas TaqMan® diana de ácidos nucleicos específicos. Durante el ciclado térmico, el instrumento registra la emisión resultante de la escisión de sondas TaqMan® en la presencia de la secuencia diana. Después existe un programa informático que recoge y procesa los datos de fluorescencia emitidos para producir un ciclo umbral (CT) para cada muestra. Es entonces cuando el programa calcula una curva estándar a partir de los valores del CT de los estándares diluidos y extrapola las cantidades absolutas para las muestras desconocidas en base a su CT.

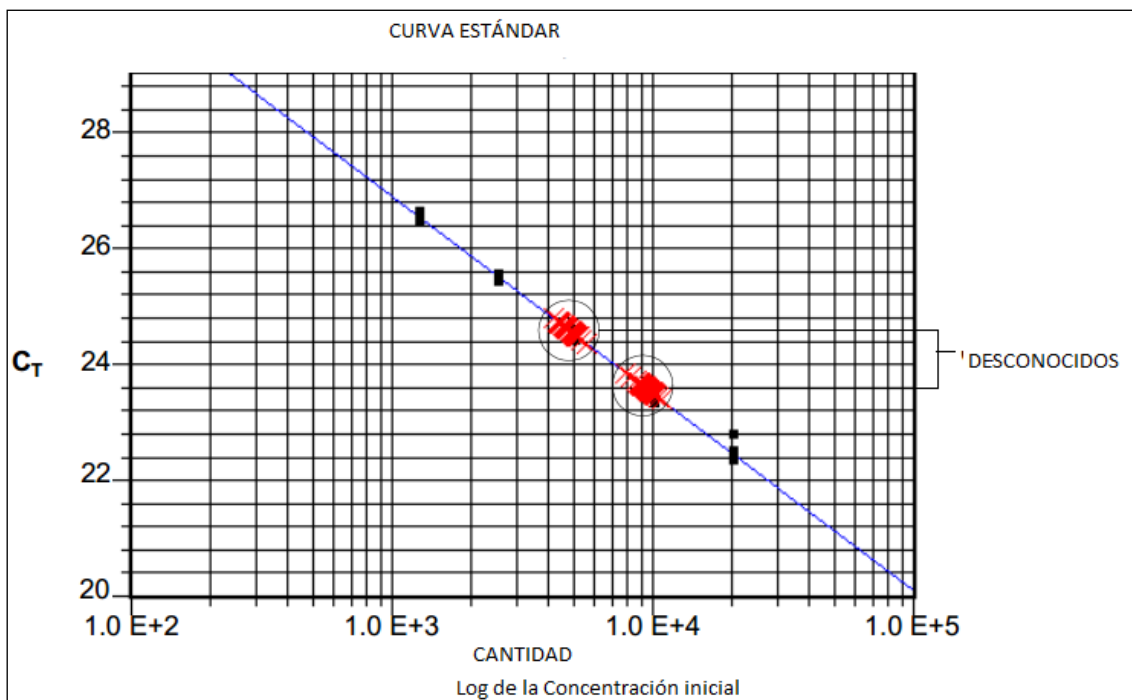


Figura SEQ Figure * ARABIC 36