

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina I



**CORRELACIÓN ENTRE LOS CUBTIPOS
MOLECULARES INTRÍNSECOS EN EL CÁNCER DE
MAMA POR PAM50 Y LA INMUNOHISTOQUÍMICA
TUMORAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Gonzalo Tapia Rico

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Martín Jiménez
Sara López-Tarruella Cobo

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**CORRELACIÓN ENTRE LOS SUBTIPOS
MOLECULARES INTRÍNSECOS EN EL
CÁNCER DE MAMA POR PAM50
Y LA INMUNOHISTOQUÍMICA
TUMORAL**

memoria para optar al grado de doctor presentada por

GONZALO TAPIA RICO

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Martín Jiménez
Sara López-Tarruella Cobo

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS DE MEDICINA
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**CORRELACIÓN ENTRE LOS SUBTIPOS
MOLECULARES INTRÍNSECOS EN EL
CÁNCER DE MAMA POR PAM50
Y LA INMUNOHISTOQUÍMICA
TUMORAL**

memoria para optar al grado de doctor presentada por

GONZALO TAPIA RICO

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Martín Jiménez
Sara López-Tarruella Cobo

Madrid

2013

ÍNDICE	3
AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN	15
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1. Hipótesis.....	27
2.2. Objetivos.....	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
3.1. Población a estudio.....	27
3.2. Obtención del material biológico y envío de las muestras.....	29
3.3. Evaluación anatómico-patológica.....	31
3.4. Panel IHQ para la determinación de los subtipos intrínsecos.....	34
3.5. Obtención del material genético (microarrays de ADN).....	34
3.5.1. Extracción de ARN.....	34
3.5.2. Medición de la concentración de ácidos nucleicos y comprobación de su pureza.....	35
3.5.3. Control de calidad de las muestras de ARN.....	36
3.5.4. Síntesis de ADNc por transcripción reversa del ARNm.....	36
3.6. Construcción de los microarrays de ADN.....	37
3.6.1. Esquema del proceso.....	37
3.6.2. Marcaje y amplificación.....	38
3.6.3. Hibridación del ARNc.....	39
3.6.4. Lavado de los microarrays.....	39
3.6.5. Escaneado de los microarrays.....	40
3.6.6. Análisis de los datos obtenidos.....	41
3.7. University of North Carolina (UNC) Microarray Database.....	42
3.7.1. Normalización.....	42
3.7.2. Preprocesamiento a los datos de expresión.....	43
3.7.3. Análisis de agrupamientos.....	44
3.7.4. Análisis supervisado de microarrays.....	45
3.8. Transcripción reversa y PCR (microarrays PCR).....	45
3.8.1. Prehibridación (blocking).....	46
3.8.2. Hibridación y lavado de los microarrays por PCR.....	46
3.8.3. Escaneado y análisis de los datos obtenidos.....	46
3.9. Análisis estadístico.....	46
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Correlación entre los subtipos intrínsecos moleculares determinados por PAM50 y por técnicas IHQ.....	51
4.2. Características clínicas de las pacientes incluidas en el estudio.....	56
4.3. Distribución de los subtipos intrínsecos determinados por el método genómico.....	64
4.4. Relación entre variables clínicas y los subtipos por expresión génica tumoral.....	66

5. DISCUSIÓN	77
5.1. Correlación entre los subtipos determinados por IHQ y por PAM50.	77
5.1.1. Correlación entre los subtipos determinados por IHQ y por PAM50. Literatura existente al respecto	77
5.1.2. Contextualización de nuestros valores K de concordancia	81
5.1.3. Panel IHQ como marcador subrogado de los subtipos intrínsecos moleculares	84
5.2. Crítica y limitaciones de la IHQ	86
5.2.1. Problemática de la determinación de los RH por IHQ	88
5.2.2. Problemática con la determinación de Her2/neu por IHQ	90
5.2.2.1. Concordancia entre ambos métodos: IHQ y FISH	90
5.2.3. Concordancia entre laboratorios	91
5.3. Incorporación de los perfiles moleculares a la práctica clínica rutinaria: ¿realidad o ficción?	92
5.4. Biología de los subtipos moleculares del CM y sus características clínicas.	103
5.5. Análisis descriptivo de las variables clínicas en ambas muestras.	110
5.5.1. Prevalencia de los subtipos intrínsecos de mama determinados por IHQ en nuestras series y en la literatura.	111
5.5.2. Distribución por subtipos intrínsecos moleculares determinados por PAM50	116
5.6. Relación entre variables clínicas y los subtipos de expresión génica tumoral.	118
5.6.1. Subtipos moleculares y su relación con la edad y el estado menstrual	118
5.6.2. Subtipos moleculares y subtipos histológicos	120
5.6.3. Otras variables clínico-patológicas y su relación con los subtipos intrínsecos moleculares	121
5.6.4. Subtipos intrínsecos y respuesta a la quimioterapia	125
6. CONCLUSIONES	131
7. SUMMARY	135
8. BIBLIOGRAFÍA	143
9. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	165
10. ÍNDICE ANALÍTICO	171

agradecimientos

TESIS DOCTORAL

aggra

eccin

ento

Me gustaría expresar mi agradecimiento más sincero a todas aquellas personas que de una manera u otra han hecho posible que esta tesis doctoral “llegue a buen puerto”.

En primer lugar, al **Prof. Miguel Martín**, director de esta tesis y “mi Jefe” durante mi formación como residente, porque sin sus conocimientos, respaldo y dedicación plena, hubiese sido literalmente imposible la realización de la misma. Gracias por ser tan buen mentor y por inculcarme la pasión por la investigación en Oncología.

A la **Dra. Sara López-Tarruella**, co-directora de esta tesis y amiga, por su apoyo constante, por sus sabios consejos y por la revisión minuciosa e incansable de todos y cada uno de los apartados de este trabajo.

A **D. José María Bellón**, estadístico de la Fundación para la Investigación Biomédica Gregorio Marañón, por su buena disposición e inestimable labor estadística.

A la **Dra. Yolanda Jerez**, compañera de batallas hospitalarias y gran amiga, por proporcionarme los artículos adecuados en el momento justo; pero, sobre todo, por darme ánimos en los momentos de flaqueza durante estos años en la Oncología.

A mis **compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Gregorio Marañón**, por su estímulo, por su cariño y por lo mucho que he aprendido de cada uno de ellos en estos años.

Al **grupo GEICAM** en general y a **Maribel Casas, Rosalía Caballero y Eva Carrasco** en particular, por su colaboración y su buena disposición con las dudas planteadas.

A **Mar González y Paula Sansans** por su formidable ayuda en el proceso de edición, maquetación y encuadernación de la tesis (o como decimos nosotros, “¡ponerla bonita!”).

Y especialmente, quiero dedicar esta tesis a **mi familia** (y a mis **padres** con mayor énfasis), a **Dani** y a mis **amigos**, por vuestro apoyo infatigable y por darme el cariño y la confianza para perseguir siempre mis metas.

A vosotros va dedicada esta tesis.

abreviaturas

TESIS DOCTORAL

abre viatu ras

Ac: anticuerpo	NA: no aplicable
ADN: ácido desoxirribonucleico	NCCN: National Comprehensive Cancer Network
ADNc: ADN complementario	NCCTG: North Central Cancer Treatment Group
AP: anatomía patológica	NCI: National Cancer Institute
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
ASCO: American Society of Clinical Oncology	PAAF: punción-aspiración con aguja fina
BAG: biopsia con aguja gruesa	PARP: poli(ADP-ribosa) polimerasa
CAP: College of American Pathologists	PGH: Proyecto Genoma Humano
CIC: Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca)	PMT: fotomultiplicadores
CK: citoqueratinas	RE: receptores de estrógenos
CM: cáncer de mama	RH: receptores hormonales
CMLA: cáncer de mama localmente avanzado	ROR: risk of recurrence
CI: consentimiento informado	RP: receptores de progesterona
CSC: stem-cell tumorales	RPC: respuesta patológica completa
EC: ensayos clínicos	RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
EGFR: epidermal growth factor receptor	SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
EMT: células epitelio-mesenquimales de transición	SG: supervivencia global
FAC: 5-fluorouracilo, doxorrubicina y ciclofosfamida	SLE: supervivencia libre de enfermedad
FDA: Food and Drug Administration	SLMD: supervivencia libre de metástasis a distancia
FEC: 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida	T: tamaño tumoral (dentro del sistema de estadificación TNM)
FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo	Tª: temperatura
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization	TAC: tomografía axial computerizada
G: grado nuclear o histológico	TAILORx: Trial Assigning Individualized Options for Treatment (Rx)
GEICAM: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama	TCGA: Proyecto Atlas del Genoma del Cáncer
HER2: Human epidermal growth factor receptor 2	THS: terapia hormonal sustitutiva
IA: inhibidor de aromatasa	TN: triple negativo
IC: intervalo de confianza	TOP2A: topoisomerasa II α
IHQ: inmunohistoquímica	UNC: University of North Carolina
IVO: Instituto Valenciano de Oncología	USA: United States of America
MINDACT: Microarray In Node-negative and 1 to 3 positive lymph node Disease may Avoid Chemotherapy	
N: afectación ganglionar (dentro del sistema de estadificación TNM)	

introducción

TESIS DOCTORAL

intr oduc ción

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada y la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Representa el 23% (1,38 millones) de todas las neoplasias y el 14% (458.400) del total de muertes por esta causa al año^[1]. En nuestro país el CM se cobra anualmente la vida de aproximadamente 6.000 mujeres^{[2][3]}. Sin embargo en los últimos 10 años, la mortalidad por CM ha disminuido significativamente con un descenso promedio de 1,8% anual. Los programas de diagnóstico precoz junto con los avances diagnósticos y terapéuticos han contribuido a este incremento en la supervivencia, que se sitúa por encima del 75% a los 5 años del diagnóstico^{[4][5][6]}.

Clásicamente el manejo terapéutico del CM se ha basado en un conjunto de características clínico-patológicas, incluyendo marcadores pronósticos derivados del análisis histopatológico de la pieza quirúrgica tales como el tamaño tumoral^{[7][8]}, el grado histológico^[9], el índice de proliferación celular^{[10][11][12]}, la invasión vascular o linfática^[13], la existencia de ganglios afectados^{[14][15][16]} o bordes de resección libres^[17]. A día de hoy, únicamente son 3 los marcadores de respuesta a diferentes terapias utilizados a la hora de definir el tratamiento óptimo de las pacientes afectas de CM: receptores hormonales (RH), tanto receptores de estrógenos (RE) como receptores de progesterona (RP) que predecirían la respuesta tumoral a la terapia endocrina^{[18][19][20]} y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2), diana terapéutica de trastuzumab o lapatinib, por citar alguno de los fármacos^{[20][21][22]}. Estos parámetros son de utilidad en la toma de decisión terapéutica integrados como guías de consenso (por ejemplo, el consenso de St Gallen o las guías clínicas del National Comprehensive Cancer Network [NCCN]) o como parte fundamental de algoritmos multivariados (como es el caso del Adjuvant!Online). Sin embargo esta aproximación aunque efectiva no es suficientemente precisa como para la individualización de tratamiento para cada paciente^{[23][24][25][26][27]}.

Gracias al avance en el conocimiento de la biología molecular de los últimos años estamos entendiendo mejor las bases de la carcinogénesis y el comportamiento biológico de los tumores, lo que supone un cambio de mentalidad en la oncología en general y en el carcinoma mamario en particular. Hasta la década pasada, nuestra concepción del CM se basaba en una visión simplista, atendiendo a los conceptos anatómicos e histopatológicos de la célula mamaria tumoral. Es en 1990 cuando se comienza a trabajar en el Proyecto Genoma Humano (PGH), un ambicioso proyecto internacional de investigación científica cuyo objetivo fundamental era determinar la secuencia de pares de bases químicas que componen el ADN e identificar y cartografiar los

aproximadamente 20.000-25.000 genes del genoma humano desde un punto de vista físico y funcional^[28]. Hoy podemos afirmar con evidencia científica que el CM es una enfermedad heterogénea, considerándola actualmente más bien como un conjunto de enfermedades distintas con pronóstico y tratamientos diferentes para cada una de ellas. Aunque existen otras técnicas para estudiar las diferencias de expresión génica de los tumores, ninguna combina la facilidad y la naturaleza global del ADN complementario (ADNc) o del análisis con microarrays de oligonucleótidos^{[29][30][31]}.

El primer fruto de estos nuevos conocimientos es el establecimiento de una nueva taxonomía molecular del carcinoma mamario. En el año 2000, Perou y su equipo^[32] proponen que la diversidad fenotípica del CM vista en la práctica clínica diaria podría explicarse por diferentes perfiles de expresión génica. Basándose en esta hipótesis este grupo evalúa 65 piezas quirúrgicas de mama (tejido normal y tumoral) de 42 mujeres.

Mediante un análisis jerárquico de grupos no supervisado (sin conocimiento previo de su información clínica), identificaron un conjunto de 496 genes, que presentaron mayor variabilidad en cuanto a su expresión entre los distintos grupos de tumores pero mínimamente variables entre las muestras de una misma paciente, obteniendo una firma genética conocida como Firma Intrínseca. Los tumores, según este nivel de expresión génica, se agrupaban en dos subgrupos principales, dependiendo de la positividad o negatividad de los RE. Así, los tumores que expresaban RE, también expresaban genes dependientes de éstos y otros propios de las células luminales o superficiales del epitelio mamario. A este grupo se le denominó luminal. El segundo subgrupo de tumores que se distinguían por la expresión de genes habitualmente expresados en las células basales y mioepiteliales del epitelio mamario normal (tumores basales), que patológicamente se caracterizaban por ser RE negativos. A su vez, este segundo subgrupo de tumores se segregó en 3 subtipos con fenotipos moleculares claramente diferentes: basaloide, HER2 positivo y el similar a la mama normal^{[33][34]}. Algunos investigadores han especulado sobre el origen de la variabilidad génica tumoral en esta reciente clasificación taxonómica pudiendo justificarla como la transformación de las células pluripotenciales (o stem-cell) con detención en determinadas fases específicas del desarrollo celular o, alternativamente, como una mutación directa de los tipos celulares maduros o evolución clonal^{[35][36][37][38]}.

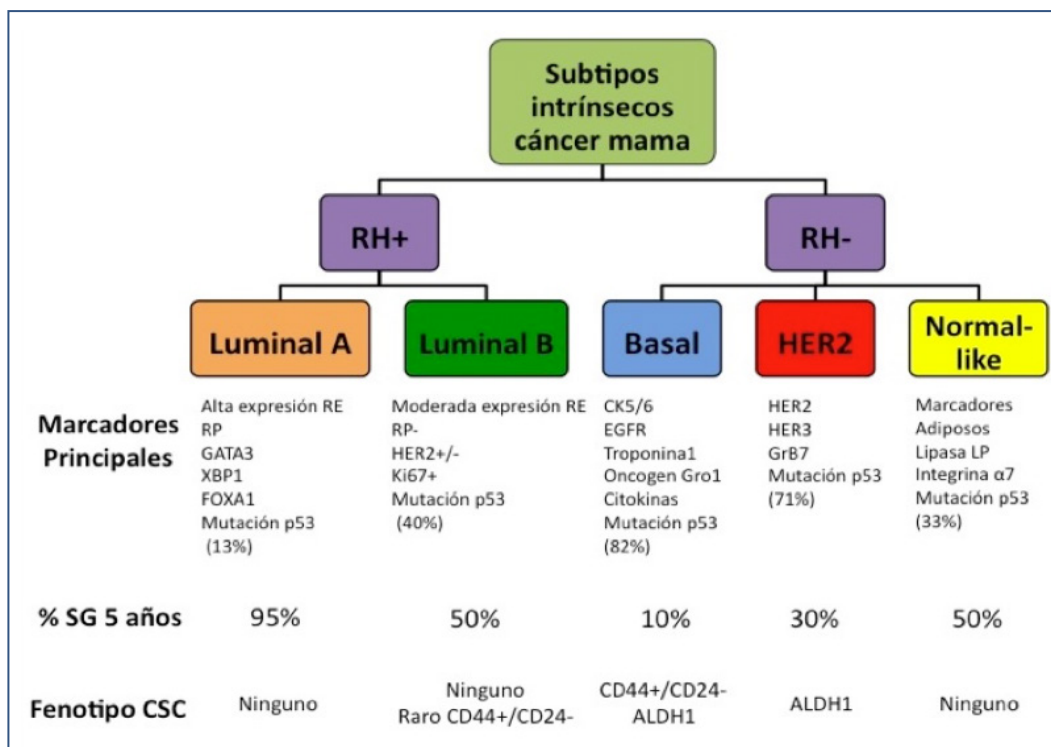


Figura 1. Relación entre los subtipos moleculares de CM y la relación con las células madre pluripotenciales tumorales (CSC). Se muestra la tasa de mutaciones del p53 dentro de cada grupo, la relevancia pronóstica según se describe en Sorlie, así como el fenotipo de las CSC relacionado con cada subgrupo.

Los perfiles moleculares es un concepto emergente en la toma de decisiones clínicas que paulatina e inexorablemente se posicionan como un antes y un después en el manejo de los pacientes oncológicos, y más concretamente en el caso que nos ocupa, con el CM^{[39][40]}. Recientemente hemos asistido a la publicación de la decodificación completa del genoma de los tumores mamarios, dentro de lo que se ha llamado el Proyecto Genoma del Cáncer (TCGA) Atlas. Un equipo de científicos de diversas instituciones han trabajado conjuntamente en la caracterización genética de 800 tumores mamarios, revelando multitud de mutaciones somáticas como causa de las formas más frecuentes de CM y proporcionando las claves para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas, abriendo nuevos horizontes a la investigación^[41].

Son muchas las plataformas génicas desarrolladas en los últimos 10 años con información pronóstica y predictiva. Entre todas las firmas génicas pronósticas en el área del CM, las 3 plataformas moleculares actualmente disponibles en el mercado para la toma de decisiones clínicas

son el 21-gene assay (Oncotype DX, Genomic Health, USA) el 70-gene-signature de van't Veer (MammaPrint, Agendia, Netherlands), y la versión clínica actualizada de los subtipos intrínsecos (PAM50, NanoString, USA) en fases de validación con resultados esperados para 2013.

El Oncotype Dx evalúa 21 genes (16 genes y 5 de referencia) y proporciona una puntuación de forma continua (Recurrence Score) que predice el riesgo de recurrencia. Este test tiene indicación en mujeres de cualquier edad con recién diagnóstico de CM, RE+ y estadios I o II, sin afectación ganglionar^{[42][43][44]}.

Mammamprint, originalmente basado en el análisis de 70 genes en tejido fresco, en la actualidad ha sido adaptado para evaluar menor número de genes en tejido parafinado. Predice la supervivencia libre de metástasis a distancia (SLMD) y la supervivencia global (SG) para pacientes con ganglios linfáticos negativos^{[44][45][46]}. La utilidad de ambas plataformas génicas está siendo evaluada en ensayos clínicos prospectivos (TAILORx y MINDACT, respectivamente)^{[47][48]}.

La herramienta base en la que se sustenta este trabajo de investigación es la denominada PAM50. Se basa en el análisis de 50 genes que determinan la clasificación intrínseca en los distintos subtipos moleculares así como la evolución clínica de las pacientes afectas.

Del panel génico inicial de 534 genes, gracias a técnicas de microarrays y RT-PCR, en 2009, Parker simplifica a 50 genes esta plataforma, con 10 genes seleccionados para cada uno de los centroides utilizados para definir los 4 subtipos moleculares (luminales A y B, basales, HER2), más una quinta categoría definida como normal, indicadora de que la muestra tenía insuficiente material para permitir esta clasificación tan precisa. Mide el riesgo de recidiva (ROR) y aporta la supervivencia libre de recaída para pacientes con tumores ganglios negativos y que no han recibido tratamiento sistémico adyuvante^[49].

La clasificación molecular del CM en subgrupos en base a los distintos patrones de expresión génica en el tejido tumoral es considerado por la comunidad científica como de referencia; sin embargo, el uso generalizado de estos perfiles génicos, ya sea en la clínica diaria o en el marco de la investigación, sigue siendo limitado. Esta falta de generalización y de cotidianidad viene marcada fundamentalmente por la dificultad de la técnica y el gasto económico, dado lo complejo y avanzado de esta tecnología. Los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) del CM revelan la expresión de determinadas proteínas en las células tumorales, por lo que se podrían considerar un reflejo de la biología molecular tumo-

ral así como una posible alternativa a los estudios genéticos. Es por esto el interés creciente de la comunidad científica en definir un panel de marcadores IHQ capaces de catalogar en subtipos intrínsecos de mama al igual que lo hacen las plataformas génicas de microarrays de ADN. A día de hoy todavía no existe acuerdo sobre qué marcadores deben utilizarse en la clasificación de CM, especialmente al definir los carcinomas de mama de fenotipo basal, ni tampoco sobre el porcentaje o intensidad de tinción celular requerido^{[50][51]}.

Basándonos en esta falta de consenso, nuestro trabajo pretende conocer si se puede aproximar la clasificación taxonómica con una serie de marcadores IHQ rutinarios y en qué medida se correlacionan ambas herramientas.

hipótesis y objetivos

TESIS DOCTORAL

hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Las características IHQ de las células tumorales de mama (RE, RP, HER2, índice de proliferación celular o Ki67, entre los más importantes) son biomarcadores que, combinados, pueden clasificar los tumores en los subtipos moleculares intrínsecos como se consigue con los tests de firmas genómicas. De este modo, se podría correlacionar la IHQ con dichos subtipos obtenidos por plataformas genómicas, con sus implicaciones pronósticas y terapéuticas inherentes a estos subtipos intrínsecos en CM.

2.2. Objetivos

- **Objetivo primario:**

- o Correlacionar la clasificación en subtipos intrínsecos mediante IHQ con la verdadera clasificación genómica en dos poblaciones de pacientes con cáncer de mama (una sometida a tratamiento adyuvante y otra sometida a tratamiento neoadyuvante).

- **Objetivos secundarios:**

- o Describir las características IHQ de las muestras a estudio así como los diferentes subtipos intrínsecos en las mismas.

- o Validar los resultados obtenidos con la literatura de referencia.

- o Analizar las diferencias en el valor pronóstico de los subtipos definidos por ambas clasificaciones.

material y métodos

TESIS DOCTORAL

mate
rial
y,
mé
todos

3.1. Población a estudio

El diseño de este estudio comprende dos grupos experimentales definidos por la secuencia en la que se administró el tratamiento quimioterápico (neoadyuvante o adyuvante) dentro de dos ensayos clínicos (EC) diferentes.

Las muestras biopsiadas del primer grupo de pacientes fueron extraídas pretratamiento mediante *tru-cut* a pacientes diagnosticadas de CMLA que participaron en un EC en el contexto de la neoadyuvancia (registrado en www.clinicaltrials.gov; identificador NCT00123929). Tras la obtención de material biológico las pacientes eran randomizadas a recibir 4 ciclos de doxorubicina (75 mg/m² cada 3 semanas) o docetaxel trisemanal x 4 ciclos (100 mg/m²). Tras estos 4 ciclos, las pacientes eran sometidas a cirugía. Posteriormente, se continuaba el tratamiento complementario con el fármaco opuesto, hormonoterapia, radioterapia +/- trastuzumab, si así estuviera indicado^[52].

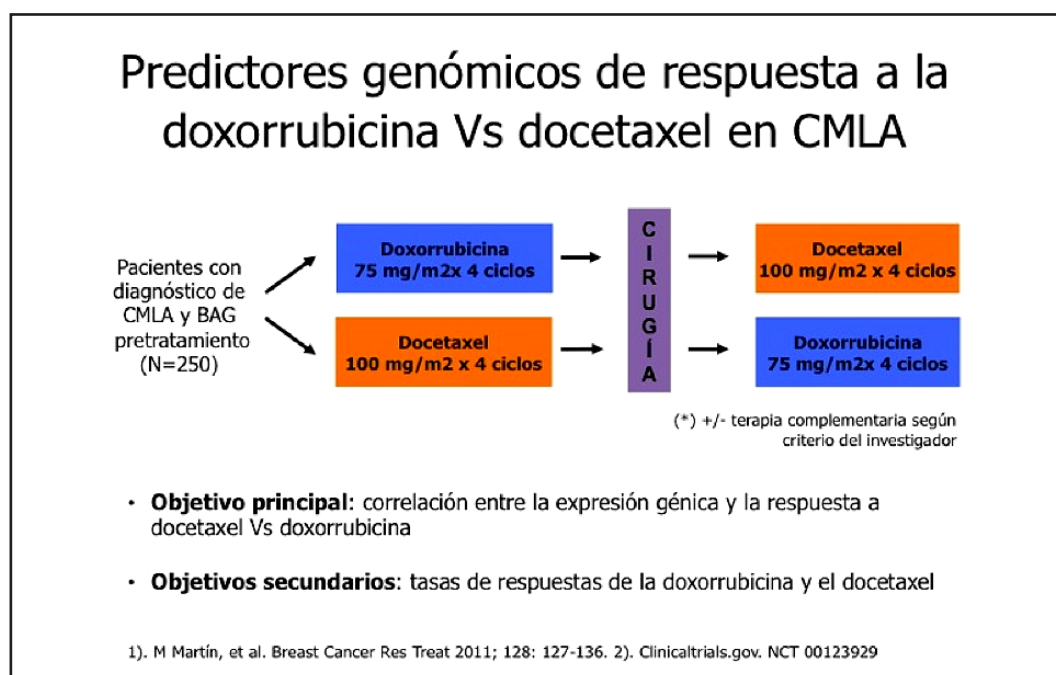


Figura 2. Protocolo del estudio de la muestra en neoadyuvancia. Abreviaturas: CMLA: *cáncer de mama localmente avanzado*; BAG: *biopsia con aguja gruesa*; N: *tamaño muestral*.

El ensayo clínico fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos, Madrid (España) con número de registro (CEIC 05/117). Los criterios de inclusión en el estudio fueron: mujeres de edad comprendida entre 18 y 75 años, estadios IIB, IIIA o IIIB de CM, con tumor palpable que no fuera subsidiario a realización de cirugía conservadora. Como criterios de exclusión: cardiopatía con fracción de eyección del ventrículo derecho (FEVI%)<50% o hiperbilirrubinemia. Previamente a la inclusión en el estudio, se recogía un Consentimiento Informado (CI) para cada una de las pacientes participantes. Un total de 276 fueron registradas para participar en el EC de las que 250 finalmente se incluyeron.

La segunda población a estudio, dentro de otro EC, comprende mujeres afectas de CM operable (T1-T3), entre 18 y 70 años de edad, que habían sido sometidas a cirugía curativa del tumor primario (mastectomía, tumorectomía, o lumpectomía) y de la axila (con al menos 6 ganglios resecaados). Después de firmar el CI, todas las pacientes fueron randomizadas a un grupo de tratamiento dentro de las 8 semanas posteriores a la intervención. El estudio fue diseñado para comparar 6 ciclos de esquema FEC (5-fluorouracilo 600 mg/m², epirrubicina a 90 mg/m², y ciclofosfamida 600 mg/m²) Vs el brazo de tratamiento experimental (FEC-P) consistente en 4 ciclos de FEC cada 21 días y, tras 3 semanas de descanso, 8 ciclos semanales de paclitaxel 100 mg/m², vía intravenosa en infusión de 60 minutos]^[53].

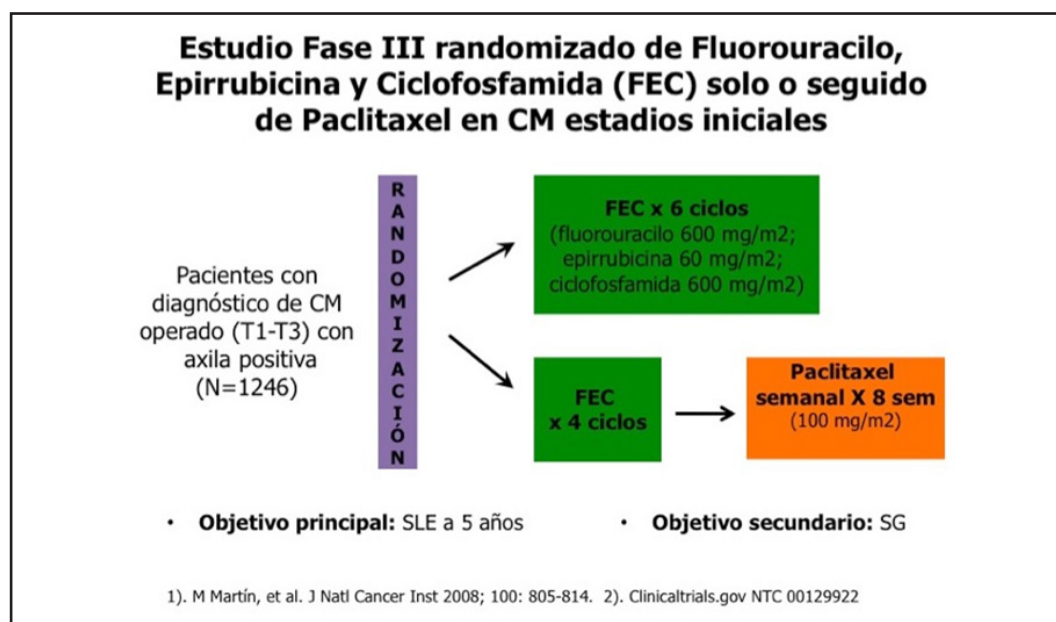


Figura 3. Protocolo del estudio de la muestra en adyuvancia. Abreviaturas: CM: *cáncer de mama*; BAG: *T: tamaño tumoral*; SLE: *supervivencia libre de enfermedad*; SG: *supervivencia global*; N: *tamaño muestral*

Todas las pacientes tenían al menos una adenopatía positiva en el examen histológico. Los márgenes de resección estuvieron libres de afectación por carcinoma invasivo o carcinoma *in situ*. Previa inclusión en el estudio, y dentro de las 16 semanas anteriores, se realizó una completa estadificación para cada una de las pacientes consistente en: mamografía bilateral, radiografía simple de tórax, ecografía abdominal o tomografía axial computerizada (TAC), gammagrafía ósea y determinación de la FEVI% por ecocardiografía u otros procedimientos de imagen. Todas las pacientes debían tener un Performance Status ≤ 2 y una adecuada función cardiológica, renal y de la médula ósea para participar en el EC. Entre los criterios de exclusión se encontraban: enfermedad avanzada (T4, N2 o N3, o M1), historia oncológica previa, neuropatía sensitiva o motora grado ≥ 2 (conforme a la National Cancer Institute Common Toxicity Criteria), embarazo, lactancia o cualquier enfermedad o condición médica importante aparte del CM.

El estudio fue aprobado por las instituciones revisoras y Comités éticos de cada centro participante así como las Autoridades sanitarias del Gobierno español y registrado en www.clinicaltrials.gov (código identificador NCT00129922). El análisis de todas las muestras se centralizó en el Laboratorio de Diagnóstico de Molecular del Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca (España).

3.2. Obtención del material biológico y envío de las muestras

Las biopsias diagnósticas y piezas quirúrgicas, en ambos estudios, fueron procesadas para su inclusión en bloques de parafina, según el protocolo estándar aplicado en los Servicio de Anatomía Patológica. Las muestras de las pacientes fueron identificadas por un código único, garantizándose la confidencialidad de los datos de las enfermas de acuerdo con los requerimientos de la ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal^[54].

Las muestras del tumor primario en la primera población de pacientes se extrajeron mediante biopsia *Tru-cut* de mama, en el servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos. En algunas enfermas, con tumor muy superficial, se obtuvo la biopsia mediante incisión con bisturí y un punch de 6 mm. Se conservó una parte de la muestra a -70°C en solución estabilizadora RNAlater, mientras que otra parte se introdujo en solución convencional de formalina para fijación y posterior inclusión en parafina en el Servicio de Anatomía Patológica. Previo a su congelación, se hizo una impronta del tejido con el fin de asegurar la presencia de tumor. En el caso de las piezas quirúrgicas tras neoadyuvancia, se enviaron al laboratorio centralizado (CIC, Salamanca).

Las piezas tumorales del estudio GEICAM 9906 se fijaron en formaldehído tamponado al 10% durante 24-48 horas. Seguidamente se deshidrataron en alcohol y posteriormente se incluyeron en parafina de acuerdo a protocolos convencionales. Se realizaron cortes de 4 μ m que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para seleccionar los bloques con más del 80% de celularidad tumoral.

Las muestras biológicas fueron enviadas a los respectivos laboratorios de diagnóstico molecular en North Carolina y en Utah (USA) por mensajería urgente en una caja de poliespam y cubiertas de nieve carbónica para impedir que se descongelaran. Recepcionadas y conservadas en frío, se mantuvieron en sus instalaciones hasta su procesamiento y posterior análisis genómico.

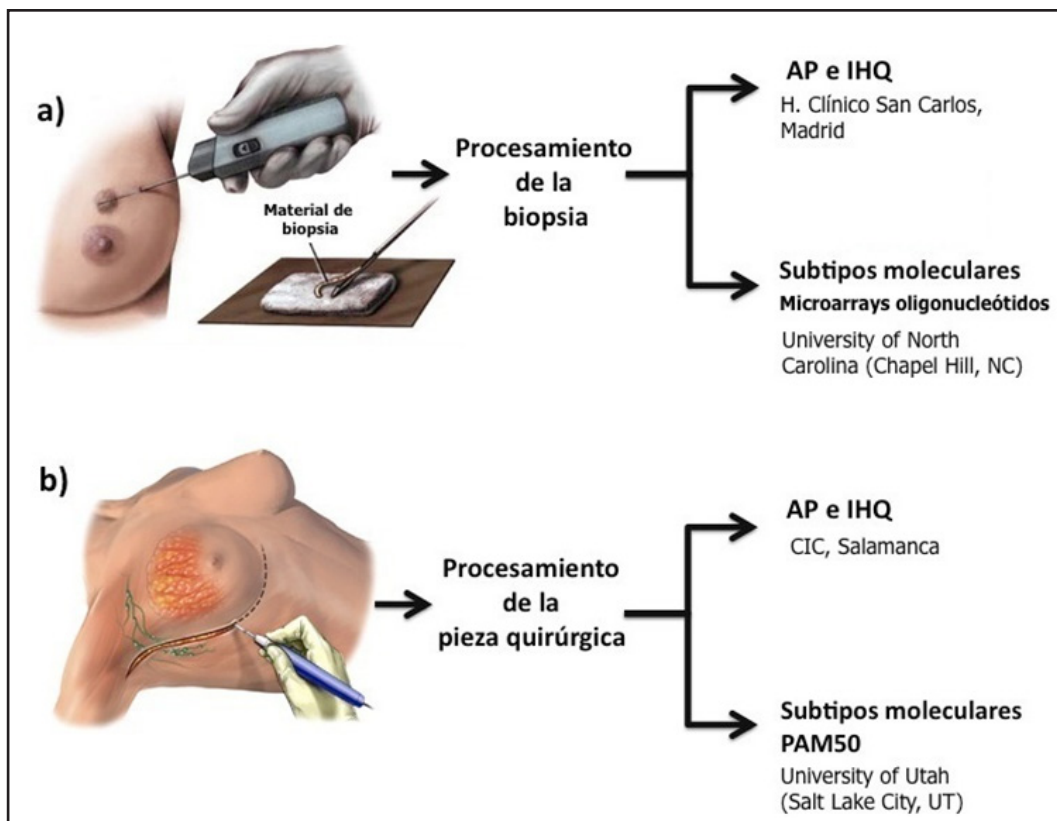


Figura 4. Esquema de la recogida de las muestras de tejido a estudio y su procesamiento posterior. A) Muestras de pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante. Se realizó una BAG y el material fue analizado por el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Estas mismas muestras fueron enviadas a University of North Carolina (Chapel Hill, NC) donde se analizaron por PAM50 los subtipos moleculares estudiando la expresión génica mediante microarrays de oligonucleótidos. B) Las pacientes de esta muestra fueron sometidas a cirugía y tratamiento adyuvante complementario bajo ensayo clínico. El material fue analizado en el CIC (Salamanca) con la batería estándar IHQ. Para el análisis de expresión génica se enviaron las muestras a la Universidad de Utah (Salt Lake City) y se utilizaron microarrays de ADN mediante el conjunto de genes de la firma intrínseca descrito por Parker et al [49] (set de genes previos a la equiparación con PAM50)

Tabla 1. Comparativa de ambas muestras a estudio. Diferencias en cuanto a la modalidad y esquema de tratamiento, tamaño muestral, perfil clínico de las pacientes o tipo de microarray utilizado son recogidas en esta tabla. Abreviaturas: *FEC*: 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida; *P*: paclitaxel; *T*: tamaño tumoral; *N*: afectación adenopática (ambos según el sistema de estadificación TNM American Joint Committee on Cancer Staging Manual [6ª Edición]).

	NCT00123929 (a)	NCT00129912 (b)
Tratamiento administrado	Neoadyuvancia Doxorrubicina x 4 Vs Docetaxel x 4	Adyuvancia FECx6 Vs FECx4–Px8
Número pacientes en cada muestra	125	825
Perfil de las pacientes en cada estudio	IIB, IIIA, IIIB y con biopsia previa a tratamiento	T1-3, N+ operadas
Tipo de microarrays (PAM50)	Microarrays de oligonucleótidos (University of North Carolina)	Microarrays de DNA (University of Utah)

3.3. Evaluación anatomo-patológica

Las muestras parafinadas obtenidas de las biopsias tumorales (bien mediante *tru-cut*/PAAF previo a tratamiento, bien durante la cirugía) fueron evaluadas mediante técnicas de IHQ.

Se determinaron los RP con el anticuerpo (Ac) anti-receptor de progesterona (clon PgR636, dilución 1:50, producto M3569, DAKO, Carpintería, CA); y el RE con el Ac anti-receptor de estrógeno (clon 1D5, dilución 1:35, producto M7047, DAKO). Para ello, se secaron los cortes de 3-4 μm a 60°C por 1 hora y se desparafinaron con baños de xilol por 5 minutos c/u. Se hidrataron posteriormente las muestras con 2 baños de alcohol 100° por 3 min c/u, 2 baños de alcohol 95° por 3 min c/u, y baño de agua corriente por 30 segundos, siguiendo este orden. A continuación, se diluyó la muestra en 1:10 solución recuperadora Antigenica en Pascal (epitope retrieval solution 10X, Dako) y se programó la temperatura (Tª) a 125°C durante 5 minutos y por 1 min a 90°C. Preparación del recuperador: a 30 ml de agua bidestilada agre-

gando 3 ml de solución de recuperación y se dejó enfriar a T^a ambiente (20°C) durante 20 min. A continuación, lavado en Buffer (1:10) 2 veces por 3 min c/u, bloqueo de Peroxidasa por 5 minutos a T^a ambiente, nuevo lavado e incubación con los Ac anti-receptor específicos (clones PgR636, dilución 1:50, producto M3569 y 1D5, dilución 1:35, producto M7047) a T^a ambiente. Se realizaron tras esto, nuevos lavados en buffer (2 veces por 3 min c/u) y se incubó con reactivo de visualización 30 min a T^a ambiente. 5 lavados de 2 min c/u con Buffer y nueva incubación con solución buffer-sustrato más DAB (diaminobencidina): 1 gota de DAB en 1 ml de buffer-sustrato por 10 minutos. Tras esto, lavado abundante nuevamente en buffer. Se procedió tras completar correctamente todos los pasos al contraste nuclear con Hematoxilina, deshidratación, aclaramiento y montaje de las preparaciones.

Los resultados están expresados tanto en porcentaje de células teñidas con cada uno de estos Ac específicos como por la puntuación de Allred, suma de las puntuaciones según número de células inmunoreactivas (de 0–5) y la intensidad de la tinción (0–3). Un Allred score menor a 3 o positividad menor al 1% de células teñidas se consideraron como RH negativos.

La determinación del HER2 se realizó mediante Herceptest (Dako A/S, Glostrup, Denmark). El protocolo es similar al de la determinación de RH en cuanto a las diferentes etapas a seguir. Tras el corte, desparafinación e hidratación como antes comentamos, se sumergieron las muestras en la dilución 1:10 solución recuperadora antigénica (epitope retrieval solution 10X, Dako) en baño termo-regulado hasta los 97°C. Se llevaron a cabo los mismos lavados que en el protocolo anterior y bloqueo de Peroxidasa (Kit Dako) durante 5 minutos a T^a ambiente. Tras nuevo lavado en Buffer (1:10) 2 veces por 3 min c/u, se procedió a su incubación con Ac primario (Kit Dako) 30 min a T^a ambiente. Lavado en Buffer 2 veces por 3 min c/u e incubación con reactivo de visualización (Kit Dako) otros 30 min a T^a ambiente. Tras esto se procedió como en el protocolo antes descrito hasta su posterior montaje.

Los valores de esta determinación están comprendidos entre 0 a 3+, según la intensidad y el patrón de la tinción de la membrana (p.e., toda la membrana o parte de ella). Una puntuación de 3 (intensa tinción en la membrana completa celular, en más del 30% de células invasivas) se consideró positivo; 0 y 1, negativos. Aquellos receptores con dos puntos (entre 1/3 y 2/3 de las células teñidas) se consideraron “dudosos” y se catalogaron como positivos o negativos atendiendo al resultado de la *hibridación in situ* (FISH) (con el HER2 FISH pharmDx kit, producto K5331, DAKO, Glostrup, Denmark), siendo éste positivo cuando el ratio HER2/cromosoma 17 \geq 2,2.

Para la determinación de Ki67 se usó el Ac monoclonal derivado de ratón MIB-1 a 1:70 de dilución (clon MIB-1, DAKO M7240), detectado vía DakoCytomation envision/HRP kit K5007 (Cambridge, U.K.). Únicamente se distinguieron células de carcinoma invasivo usando la puntuación semi-cuantitativa, según microscopía de luz, como “nula” (no inmuno-tinción), baja (13% o menos de inmuno-positividad) o alta ($\geq 14\%$ de células inmuno-reactivas), para coincidir con el punto de corte de la clasificación molecular mediante IHQ como aparece en el artículo de Cheang et al^{[50][55]}.

La determinación de la mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se realizó mediante el kit (EGFR, clon EGFRr.25, 1:50. Leica Microsystems) con un sistema de puntuación de 0 a 3+. La determinación de las CK5/6 mediante su anticuerpo (CK 5/6, clon D5/16B4, prediluted, Master Diagnostica) fue considerada positiva cuando se observaba como mínimo una célula tumoral teñida en, al menos, un punto.

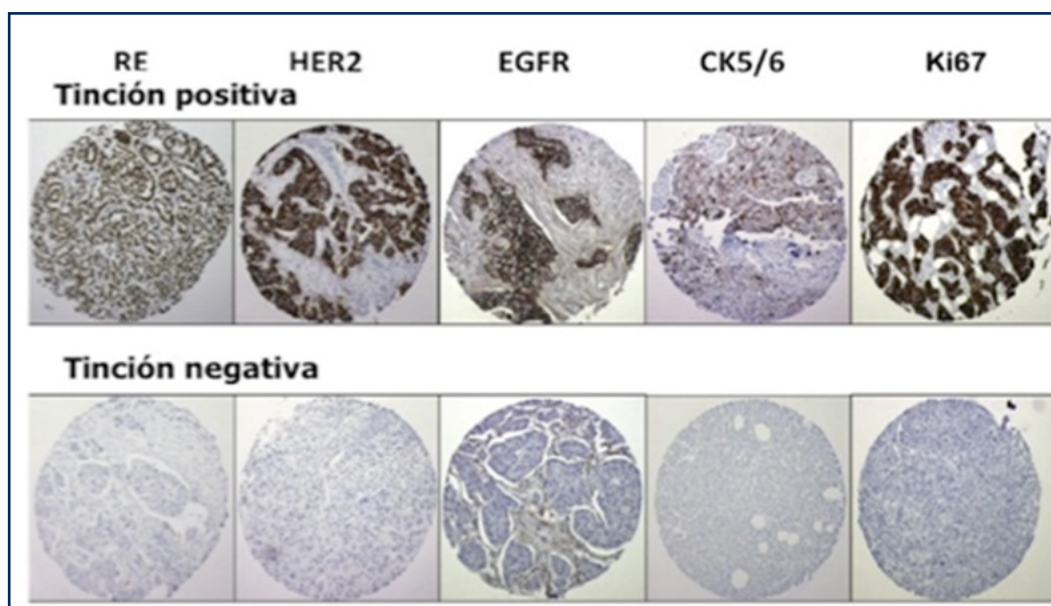


Figura 5. Ilustración del panel IHQ. Inmuntinciones positivas (panel superior) y negativas (fila inferior) para receptor de estrógeno (RE), HER2, epidermal growth factor receptor (EGFR), citoqueratina 5/6 (CK5/6) y Ki67. Modificado de *Breast cancer molecular subclassification and estrógeno receptor expresión to predict efficacy of adjuvant anthracyclines-based chemotherapy: a biomarker study from two randomized trials. Ann Oncol (2007);18(9):1477-1483.*

Todos los tumores fueron etiquetados según el grado nuclear usando la clasificación histológica de Elston-Ellis (G1-3)^[56]. El estadio tumoral TNM fue establecido de acuerdo con el *American Joint Committee on Cancer Staging Manual (6ª Edición)*^[57]. La RPC se definió como la ausencia de cáncer invasivo tanto en el tumor resecado como en los ganglios linfáticos tras completar el tratamiento neoadyuvante. Pacientes con carcinoma ductal residual in situ se consideraron también como RPC.

3.4. Panel IHQ para la determinación de los subtipos intrínsecos

Los tumores fueron clasificados en los subtipos intrínsecos moleculares basándose en los parámetros IHQ/FISH o usando los perfiles de expresión génica por el set de genes de Parker^[49] o la plataforma derivada de este último, PAM50 (muestra neoadyuvante). El primer método, que ahora se describe, se basa en un inmuno-panel de 4 biomarcadores previamente descritos por Hugh et al^[58], obteniendo 4 subtipos (luminal A y B, HER2 y triple-negativo [TN])^[59]:

Tabla 2. Subtipos moleculares de CM de acuerdo con su inmunofenotipo usando la combinación de 4 biomarcadores. Obsérvese que el punto de corte para Ki67 es del 14%. Basado en los datos de Cheang y Hugh (referencias en el texto).

Subtipo molecular	RH	HER2	Ki67 (14%)
Luminal A	RE y/o RP +	-	Bajo
Luminal B	RE y/o RP +	+ -	Bajo Alto
HER2	RE y/o RP -	+	Alto/bajo
Triple negativo	RE y RP -	-	Alto/bajo

3.5. Obtención del material genético (microarrays de ADN)

3.5.1 Extracción de ARN

Para la obtención del ARN se empleó el Kit de RNeasyMicro Kit de Quiagen®. La extracción de ARN a partir de fragmentos de tumores congelados se realizó utilizando 30 mg de tejido. El tejido se maceró en el tampón de lisis RLT del Kit de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial, en presencia de un 1% de β -mercaptoetanol y, posteriormente, pulverizado en mortero en presencia de nitrógeno líquido. Para ello, se añadieron 600 μ l de tampón RLT a 30 mg de tejido pulverizado y se transfirió esta mezcla a una columna QIAshredder insertada en un tubo colector de 2 ml de capacidad. Tras centrifugar 2 minutos a máxima velocidad y a 20-25°C, se descartó la columna y de nuevo se centrifugó el lisado durante 3 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo al que se añadieron 350 μ l de etanol al 70%. Un máximo de 700 μ l de esta mezcla fueron depositados en columnas RNeasy insertadas en tubos colectores de 2 ml de capacidad. Las columnas fueron centrifugadas durante 15 segundos a 10.000 rpm y se desechó de nuevo el sobrenadante. La

solución de DNasa constaba de 70 μ l RDD buffer, se pipeteó y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Las ARNasas estaban disueltas en solución amortiguadora C (Tris.HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, desferroxamina 2.5 mM a pH=7.4). A continuación se añadieron 350 μ l de tampón RW1 a las columnas que fueron de nuevo centrifugadas durante 15 segundos a 8000 \times g. Posteriormente y de modo secuencial, se efectuaron dos lavados añadiendo 700 μ l de tampón RW1 a las columnas y centrifugándolas a 8000 \times g durante 15 segundos, y 500 μ l de RPE buffer y realizando la misma centrifugación. Se añadieron 500 μ l de etanol al 80% y se centrifugó un minuto a 8000 \times g. Por último, se añadió a cada columna 40 μ l de agua libre de ARNasas y tras una centrifugación a 8000 \times g durante 1 minuto, se obtuvieron los extractos de ARN total purificados correspondientes a cada una de las muestras, que se almacenaron a -80° C para su correcta conservación, en agua libre de ARNasas.

En los casos de las muestras procedentes del estudio GEICAM 9906, el Kit utilizado para la extracción de ARN de las muestras parafinadas fue gracias al *High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)* para la qRT-PCR. La contaminación del material genético, en este caso, fue eliminado usando el *Turbo DNase (Ambion, Austin, TX)*, según las indicaciones del fabricante.

3.5.2 Medición de la concentración de ácidos nucleicos y comprobación de su pureza

La concentración de ARN extraído de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría gracias al *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)* midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm (A₂₆₀). Gracias a la *Ley de Beer Lambert*, y de una forma práctica, sabemos que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 44 μ g/ml de ARN, medida en una cubeta de cuarzo de 1 cm de anchura y siempre y cuando el pH sea neutro. De esta simple correspondencia se calcula la concentración de ARN (ng/mL) en función de la anchura de la plataforma en la que se deposita la muestra y es atravesada por el haz de luz. El ratio entre los valores de absorbancia medidos entre 260 y 280 nm estiman la pureza del ARN. Valores de ARN A_{260/280} is ~2 indican una buena pureza, correspondiendo este valor de 2 al 100% de material genético libre de contaminantes, fundamentalmente, proteínas (p.e, un ratio de 1,94 corresponde a un 70% de ácidos nucleicos y un 30%, contaminación).

Las muestras que presentaron una baja concentración de ARN fueron analizadas de nuevo empleando el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, California), que mediante microfluidos nos proporciona una medición fiel y precisa de los ácidos nucleicos.

3.5.3 Control de calidad de las muestras de ARN

Para comprobar la integridad del ARN extraído se utilizó el bioanalizador 2100 *Bioanalyzer de Agilent Technologies*®. Este sistema consta de dos chips que contienen una red de microcanales y reservorios interconectados donde se realiza la electroforesis. El software calcula la concentración del ARN y dos parámetros numéricos que indican la integridad del ARN: la relación entre los ARN ribosómicos 28S y 18S (28S/18S) y el número RIN (RNA Integrity number). El parámetro RIN es un indicador del grado de degradación de la muestra de RNA. Un RNA intacto tiene un RIN 9-10, mientras que un RNA degradado tendría un RIN <6. Para las aplicaciones de RT-PCR y microarrays se recomienda un RIN mínimo de 7, aunque depende del tipo de muestra. Gracias a esta tecnología se estandariza el proceso de interpretación de la integridad del ARN y se eliminan los sesgos asociados a la interpretación individual, utilizando mínimas cantidades de muestra.

3.5.4 Síntesis de ADNc por transcripción reversa del ARNm

Para sintetizar el ADNc se utilizó el Kit 12371-019 *SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen)*®. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, el cual consiste en mezclar 5 µg de ARN total con 1 µl de dNTP mix 10 mM más 1 µl de Oligo dT 0,5 µl y 1 µl de agua estéril. La mezcla se incubó a 65°C para permitir el alineamiento del Oligo dT con el Poly-A del ARNm. Posteriormente se incubó en hielo durante 2 minutos y se preparó para cada reacción una mezcla de 2 µl de buffer RT 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0.1M y 1 µl de RNaseOUT™, recombinante inhibidor de ribonucleasas. Se incubó a 42 °C por 2 minutos y se agregó 1 µl de transcriptasa reversa SuperScript™ II, incubando la mezcla a 42°C por 50 minutos. La reacción finalizó colocando los tubos a 70°C durante 15 minutos; posteriormente a hielo 2 minutos más. Se agregó 1 µl de E. coli RNasa H y se incubó a 37°C, 20 minutos más.

Para comprobar que la retrotranscripción había salido correctamente se realizaron PCRs con cebadores específicos para ADNc de β-actina tal y como se describe en el artículo de Kreuzer et al^[60].

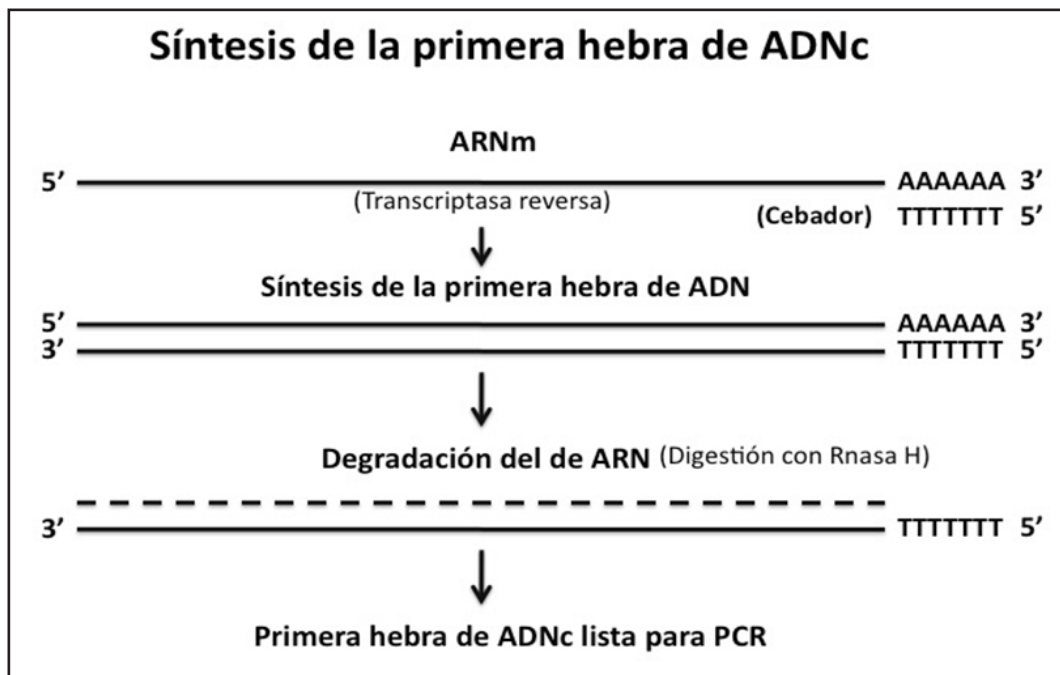


Figura 6. Representación esquemática de la síntesis de la primera hebra de ADNc obtenida desde el ARNm por la acción crucial de la transcriptasa reversa.

Para la obtención de microarrays en ambas poblaciones se recurrió al sistema “*Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44K*” de la casa Agilent® por ambos laboratorios colaboradores estadounidenses. Estos microarrays constan de 44.000 sondas, de los cuales 41.000 son sondas de genes humanos y los otros 3.000 corresponden a sondas control que permiten conocer la eficacia y calidad de la hibridación y, por lo tanto, saber si los resultados son reproducibles. Se estima la media de la desviación estándar en 0,013 para la reproducibilidad de la técnica, según la propia casa comercial.

3.6. Construcción de los microarrays de ADN

3.6.1 Esquema del proceso

Como ya hemos comentado, en primer lugar, se retrotranscribe el RNA a ADNc y, a partir de éste, se obtiene el ARNc, piedra angular para la unión a las sondas de microarrays. Estos ARNc deben ser marcados con un radioisótopo o un fluorocromo para que posteriormente puedan ser detectados. Así se marcan de manera diferente con dos colores (Cy3 y Cy5), como se ilustra en la imagen, el ARNc de referencia (Cianina 3-CTP 10 mM, verde) y el de la muestra a analizar (Cianina 5-CTP 10 mM, rojo). Ambos ARNc se hibridan de forma competitiva en el mismo microarray. Este microarray se excitará mediante láser y dependiendo de la distinta longitud de onda, así obtendremos información al analizar informáticamente ésta. Por lo tanto, la cantidad de un ARN determinado está referida a un ARN de referencia que debe de ser el mismo para todas las muestras.

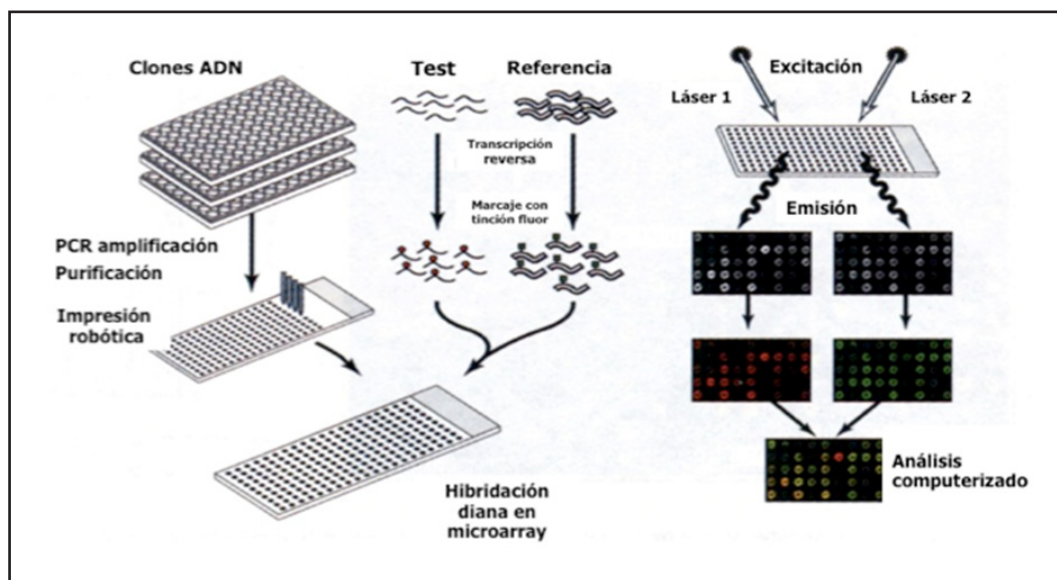


Figura 7. Esquema general de trabajo con microarrays de ADN. Abreviaturas: PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

3.6.2 Marcaje y amplificación

En todas las muestras, la cantidad de RNA de partida fueron 2.5 ug. Todo el proceso se hizo siguiendo el protocolo del kit *Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit* de Agilent®. El RNA de referencia empleado contiene un pool de RNA de tejido mamario sano más RNA de tres líneas celulares de mama (MCF-7, SUM 102, SUM 149) en proporciones iguales. La concentración del ARNc obtenido se midió en el espectrofotómetro (UV-visible) Nanodrop ND-1000. Se registraron las medidas de concentración de cRNA (ng/ µl), de cianina 3 y cianina 5 (pmol/ µl) y el ratio de absorbancia 260nm/280nm. Además, se calculó la cantidad de ARNc obtenido en µg, así como los pg de cianina por µg de ARNc (actividad específica), según las fórmulas que se detallan a continuación:

- $Concentración\ de\ ARNc \times 30\ \mu l\ (volumen\ de\ elución) / 1000 = \mu g\ de\ ARNc$, para calcular el rendimiento de ARNc.
- Para determinar la actividad específica, se usó las concentraciones de ARNc (ng/ µl) y de cianina 3 o cianina 5 (pmol/µl): $(Concentración\ de\ Cy3\ o\ Cy5) / (Concentración\ de\ ARNc) \times 1000 = pmol\ Cy3\ por\ \mu g\ de\ ARNc$.

Todas las muestras que rindieron una concentración menor de 825 ng de ARNc se descartaron, así como las muestras con una actividad específica menor de 8 pmol de cianina por µg ARNc, como así recomienda el fabricante.

3.6.3 Hibridación del ARNc

El protocolo que se siguió es el que recomienda la casa comercial (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Quick Amp Labeling®. Version 6.5). Para cada microarray se añadieron para la hibridación, 825 ng de la muestra a estudio (Cy5) y 825 ng de la de referencia (Cy3), en un total de 55 μL de volumen, junto con 11 μL de 10X Blocking Agent, 52,8 μL de agua libre de nucleasas y 2,2 μL de 25X Fragmentation Buffer. Este volumen se incubó a 60° C durante 30 minutos para conseguir la fragmentación del ARN. Inmediatamente se enfrió la muestra con hielo durante 1 minuto y se añadieron 55 μL 2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM. Se centrifugó la muestra durante 1 minuto a 13.000 rpm en una microcentrífuga y, tras pasar por hielo, se cargó en el array tan pronto como fue posible. Para conseguir la hibridación completa se necesitó la incubación de las muestras durante 17 horas a 65°C.

3.6.4 Lavado de los microarrays

Para evitar las secuencias repetidas o inespecíficas, se procedió al lavado de los microarrays previamente a su escaneado, mediante 2 lavados sucesivos con los reactivos que se especificarán a continuación y utilizando el *Human Cot-1 DNA, 1 mg/mL (Invitrogen®, cat. no. 15279-011)*, según el protocolo del fabricante. Para evitar la degradación de las cianinas por el ozono del ambiente (Cy5) se escanearon inmediatamente.

Solución de lavado 1		Solución de lavado 2	
Componente	Volumen (mL)	Componente	Volumen (mL)
MilliQ water	974	MilliQ water	977
10% SDS	1,0	20 x SSC	3,0
20 x SSC	25	Volumen	1000
Volumen	1000		

Figura 8. Lavado de los microarrays: soluciones de lavado. Extraído de Agilent Human 1 cDNA Microarray Kit Protocol User's for use with cat. No G4100A.

3.6.5. Escaneado de los microarrays

La lectura de la señal fluorescente emitida por los microarrays se obtuvo gracias al scanner *GenePix 4000B®* (*Axon Instruments, Inc*). Este aparato es capaz de excitar, simultáneamente, con 2 haces de láser distintos: láser SH-YAG con longitud de onda de 532 nm (verde: 557-592 nm) y láser HeNe de 635 nm (rojo: 650-690 nm). Este hecho hace que el tiempo de escaneado se reduzca dramáticamente (5 minutos para un escáner completo). Además, tiene dos filtros de emisión 575DF35 (verde) y 670DF40 (rojo), optimizados para la emisión de las cianinas 3 y 5, respectivamente. La fluorescencia emitida se detecta gracias a dos tubos fotomultiplicadores (PMT) que captan de manera más o menos sensible la señal emitida por el fluorocromo (y convierten los fotones en electrones), recogen la longitud de onda emitida y se digitaliza, proporcionando mapas de intensidad para cada longitud de onda. El mapa obtenido por cada fluorocromo se superpone y esta imagen será analizada. Los escáneres tienen diferentes variables que el usuario puede ajustar, sin embargo, existen unas condiciones estándares en cuanto al tamaño del pixel, el porcentaje de saturación de la intensidad de la imagen y la potencia en que el láser excita los fluorocromos. Para ajustar la sensibilidad del PMT se hizo un análisis rápido a baja resolución (40 μm). El software del equipo permite seleccionar, al usuario, el voltaje aplicado en el PMT a fin de conseguir que el ratio entre la ganancia de ambos PMT sea lo más próxima a la unidad. Es decir, que la sensibilidad para la detección de ambas cianinas sea la misma. Además, controlando este parámetro se controla la saturación de la señal de los puntos, así como el ratio entre la señal y el ruido de fondo. Con los valores óptimos para cada parámetro, se escaneó la imagen a 10 μm y fue almacenada en una computadora como un archivo de imagen (.TIFF) para los posteriores análisis.

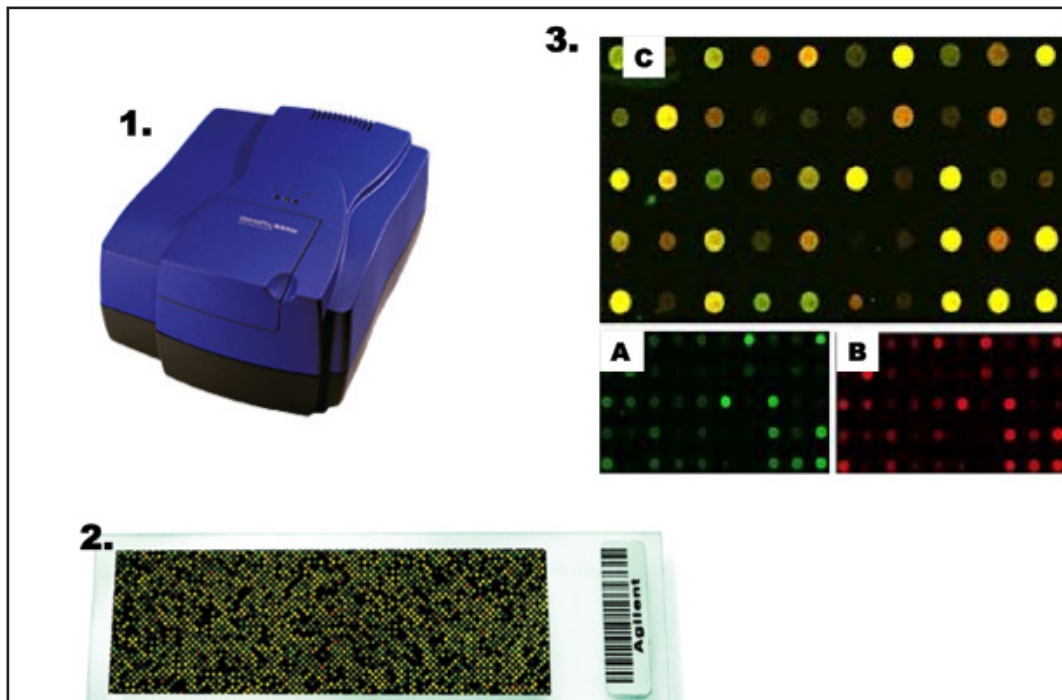


Figura 9. 1). Escáner GenePix4000B® (*Axon Instruments*) para lectura y obtención de datos de hibridación de microarrays de ADN. 2). Ejemplo de un microarray de oligonucleótidos de la marca comercial Agilent®. 3). Ejemplo de los 3 tipos de imágenes obtenidas tras el escaneado del microarray: A) Imagen de la señal proveniente de Cy3; B) Imagen de la señal proveniente de Cy5; C) Imagen compuesta de las 2 anteriores.

Tras el escaneado de los microarrays, éstos se almacenaron en películas de polipropileno, en la oscuridad, dentro de cajas purgantes de N₂ para preservarlos del blanqueamiento-fotoinducido en las tinciones de cianinas.

3.6.6 Análisis de los datos obtenidos

Una vez escaneado el array, la imagen obtenida fue tratada con el programa *GenePix Pro 5.1*®. El primer propósito del análisis de la imagen es obtener las intensidades del *background* (o intensidad lumínica de fondo) y el *foreground* (correspondiente a cada punto o spot) para los canales rojo y verde de cada spot en el microarray. Un propósito secundario del análisis de la imagen es obtener medidas cualitativas para cada spot que podrían ser usadas para marcar spots o arrays defectuosos o para evaluar la reproducibilidad de cada spot. Con las medidas de las intensidades de fluorescencia de los canales F635 y F532 para cada uno de los fragmentos impresos en el microarray, el programa GenePix genera un archivo con la extensión *.gpr* que puede ser abierto con el programa Excel de Microsoft.

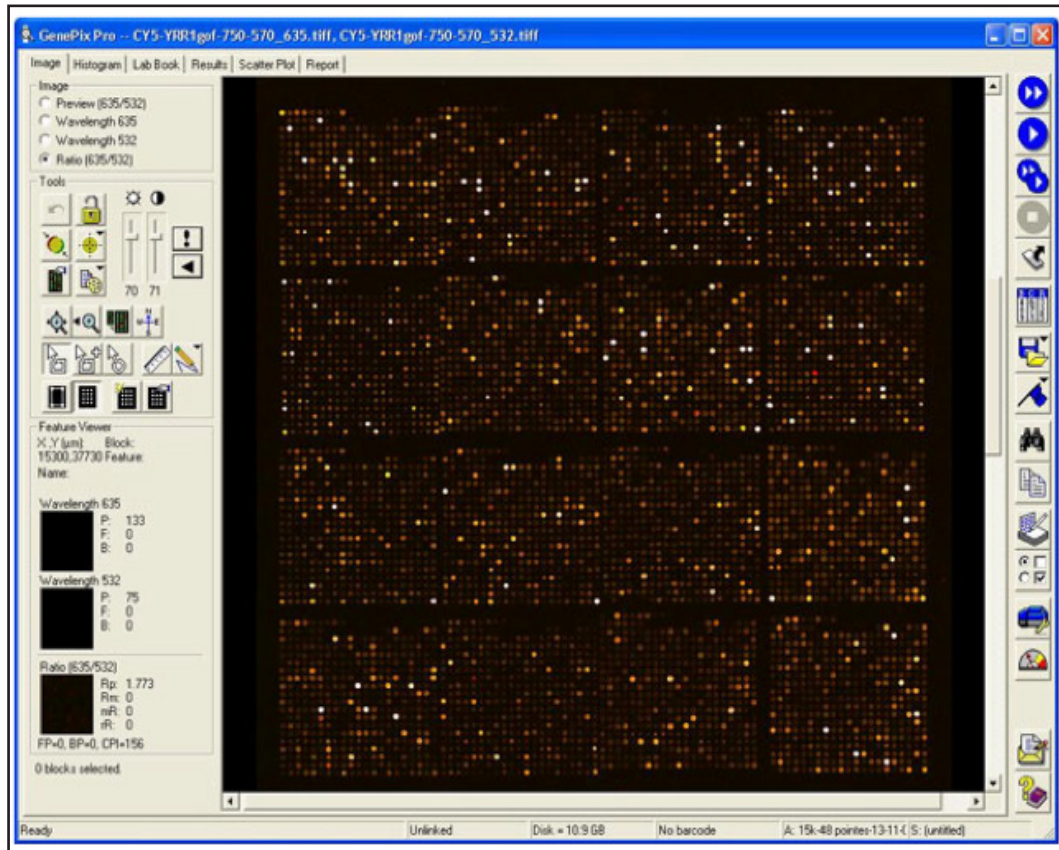


Figura 10. Ejemplo de una ventana abierta (software de GenePix Pro 5.1). La pantalla se divide en 3 partes: la selección y navegación de la imagen a la izquierda; el área de visualización de la imagen en el centro y la barra de herramientas a la derecha.

3.7. University of North Carolina (UNC) Microarray Database

La información extraída de los microarrays así como sus archivos en imágenes se almacenaron en la University of North Carolina (UNC) Microarray Database (UMD) (<https://genome.unc.edu/MicroArray/SMD/>), portal en Internet cortesía de la UNC (USA) dirigida por Perou y su equipo. Además, UMD ofrece interfaces para la recuperación de datos, el análisis, visualización y normalización del dato en bruto.

3.7.1. Normalización

El objetivo de la normalización es identificar y eliminar variaciones sistemáticas, desviaciones con respecto al ideal, conservando la señal biológica. Con esto, se pretende asegurar que las diferencias en intensidad en el análisis posterior sean debidas realmente a expresión génica diferencial y no tanto a problemas técnicos. Las principales raíces de estas discrepancias son: diferencias en la incorporación de los fluorocromos Cy3 y Cy5, diferencias en la cantidad de ARNm, diferencias en las propiedades del escaneado o en las intensidades de los 2 láseres, diferencias entre los grupos de agujas (print-tip), efectos

espaciales y efectos debidos al plato. Previamente a la normalización se procedió al filtrado de los datos primarios para eliminar aquellos valores que probablemente fueran producto de errores, desechando valores de intensidad mayores que un umbral, que pudieran ser valores de señales sobresaturadas.

Si se hibrida en un mismo chip una muestra marcada con ambos fluorocromos, como es nuestro caso, se espera que los valores \log_2 (*conjunto de valores de intensidades de la muestra marcada en rojo/ conjunto de valores marcados en verde*) sean 0 al asumirse que se dispone de iguales cantidades de ARN en las muestras que se comparan, por lo que el número de moléculas en cada una es también el mismo y además, los elementos impresos en el chip son una muestra aleatoria de los genes; sin embargo, lo que se observa en la mayoría de los casos es una desviación de estos valores tanto para intensidades bajas como altas. Es decir, que el gen promedio no cambia su expresión bajo la condición en la que está siendo estudiado. Esto es debido a que sólo entre el 10 y 20% de los genes son expresados al mismo tiempo. *Lowess (Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots)* es un método de normalización que puede eliminar estos efectos específicos del marcaje, que dependen de los valores de intensidad. El gráfico más común es el denominado MA-plot de Dudoit et al. En este se representan los valores M (también conocido como log-ratio) en el eje vertical y los valores A en el horizontal. Con *lowess* se estima la función, que ajusta los valores del gráfico-MA y sólo estará afectada por los genes expresados diferencialmente, los cuales se comportan para estos propósitos como datos aberrantes o datos extremos (*outliers*).

Así, esta función viene expresada por la siguiente fórmula, cumpliéndose que los puntos en el plot de $M = \log_2(\text{Cy5}/\text{Cy3}) = \log_2(\text{Cy5}) - \log_2(\text{Cy3})$ versus $A = (\log_2(\text{Cy3}) + \log_2(\text{Cy5})) / 2$ deben estar alrededor de una línea horizontal (M es por "Minus" y A es por "Add"). El plot MA equivale a una rotación de 45 grados en sentido antihorario del plot de $\log_2(\text{Cy5})$ versus $\log_2(\text{Cy3})$ seguido de un re-escalamiento. Este método puede aplicarse sobre todos los elementos del chip o puede estimarse una función en cada partición del chip.

3.7.2 Preprocesamiento a los datos de expresión

Una vez los datos fueron normalizados, los valores de expresión fueron sometidos a una serie de transformaciones previas al análisis de los mismos, para intentar solventar problemas que aún persistieran como pudieran ser los datos replicados, los planos o aquellos perdidos. De este modo, en el caso de los datos replicados se tomó la mediana de los valores de intensidad del gen determinado en el array. En el caso de los datos perdidos se recurrió a la imputación con *K*-

Nearest Neighbors (KNN), reponiendo aquellas ausencias con los valores medios de los datos vecinos. Para filtrar aquellos genes que mantenían su expresión casi constante en todos los chips, se utilizó la desviación estándar de su perfil de expresión (pequeña y menor que el determinado umbral).

3.7.3 Análisis de agrupamientos

El objetivo de los métodos de agrupamiento o *clustering* con datos de expresión génica es construir grupos de genes o muestras con perfiles de expresión similares utilizando una medida de distancia, siendo las más usadas, la *euclidiana* y la correlación de *Pearson (r)* que viene definida esta última por la siguiente fórmula:

$$r = \frac{1}{N} \sum_{i=1, N} \left(\frac{X_i - \bar{X}}{\sigma_X} \right) \left(\frac{Y_i - \bar{Y}}{\sigma_Y} \right) ,$$

siendo X e Y dos series de números; \bar{X} , la media de los valores X y (σ), la desviación estándar. La (r) comprenderá valores entre +1 a -1: 1= idénticas; 0=independientes; -1: totalmente opuestas.

Por lo general, estos análisis no requieren la información del grupo, clase o condición experimental a la que pertenece cada muestra, sino que por el contrario pueden sugerir un nuevo agrupamiento de las muestras basado en el grado de similitud entre los perfiles de expresión de los genes en estudio.

Estos métodos, aplicados a datos de expresión, sirven para identificar grupos de genes coexpresados y patrones en los perfiles de expresión de las muestras, sin la necesidad de clases predefinidas que supervisen este análisis. El método de agrupamiento más empleado en datos de microarrays es el jerárquico. Este método no supervisado deriva una serie de particiones de los datos; en este caso, cada dato será el perfil de expresión de una muestra o gen. El resultado de estos métodos es una estructura de árbol o dendrograma.

En el presente trabajo, Cluster y TreeView fueron los programas que se utilizaron para el análisis de agrupamientos, proporcionando información gráfica de los datos computerizados del análisis de microarrays de ADN. El programa Cluster, organiza y analiza los datos. Es el programa Java Treeview el que permitió visualizar estos datos organizados en una matriz de genes/arrays.

3.7.4 Análisis supervisado de microarrays

Para determinar aquellos genes cuya expresión molecular se diferencia de manera significativa de las condiciones a estudio, es necesario el uso de métodos para la comparación de clases. Estos métodos supervisados requieren la información del grupo o condición del experimento y el resultado de los mismos son aquellos genes expresados de manera diferente en los grupos o condiciones definidos.

La prueba utilizada para comparar 2 condiciones es una *t* modificada que está implementada en el software SAM (*Significance Analysis of Microarrays*, <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Este sistema asigna un valor para cada gen en base a los cambios en la expresión génica relativa a la desviación estándar de múltiples mediciones. Para seleccionar aquellos genes que se consideraron diferencialmente expresados, se prefijó como criterio el cálculo de la proporción de descubrimientos falsos, *FDR* (False Discovery Rate), calculándose mediante las permutaciones de las medidas repetidas.

3.8 Transcripción reversa y PCR (microarrays PCR)

La obtención de material biológico se obtuvo de muestras parafinadas, procesadas para su análisis en el laboratorio liderado por Philip Bernard y su equipo (University of Utah, Salt Lake City). La amplificación por PCR y el análisis de la curva de fusión fue realizada por el LightCycler 480 using *SYBR Green I Master Mix* (Roche Applied Science), siguiendo el protocolo que a continuación se detalla: el ADNc fue lavado con el *QIAquick polymerase chain reaction (PCR) purification column* (Qiagen Inc, Valencia, CA) y almacenado a -80°C en 25 mmol/L de Tris y 1 mmol/L de EDTA hasta su uso. Cada 5- μL de la reacción por PCR incluía 1,25 ng (0,625 ng μL) de ADNc de las muestras a estudio o 10 ng (5 ng μL) para los controles, 2 pmol de ambos cebadores: upstream (5') y downstream (3') primers, además del LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Cada fase contenía carga génica de 1 gen por duplicado para las muestras a analizar, la de estudio y la del control negativo. La muestra de ADNc contribuyó por igual en el total de ARN humano de referencia (Stratagene, La Jolla, CA) junto con las líneas celulares de mama MCF7, ME16C, y SKBR3. La amplificación por PCR se llevó a cabo con el LightCycler 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) realizándose un paso inicial de desnaturalización (95°C , 8 minutos) seguido por 45 ciclos de desnaturalización (95°C , 4 segundos), alineamiento (56°C , 6 segundos con $2,5^{\circ}\text{C}/\text{transición}$), y elongación de la cadena (72°C , 6 segundos con $2^{\circ}\text{C}/\text{seg}/\text{transición}$). La fluorescencia (530 nm) de la tinción SYBR Green I del ADN de doble cadena fue adquirida para

cada ciclo tras la fase de elongación. La especificidad de la técnica fue determinada postamplificación gracias al análisis de las curvas de fusión: las muestras se enfriaron a 65°C y posteriormente calentadas lentamente a 2°C/seg hasta 99°C mientras se realizaba una monitorización constante de la fluorescencia (10 adquisiciones/1°C).

3.8.1 Prehibridación (blocking)

Los microarrays fueron pre-hibridados a 42°C durante al menos 1 hora en 20–30 µl de la solución tampón (5X SSC, 0,1% SDS y 1% BSA) cubiertos con el portaobjetos. Los slides fueron lavados rápidamente mediante su inmersión en agua destilada durante 2 minutos, seguido de otra inmersión, en isopropanolol, durante otros 2 minutos con su secado al aire posterior.

3.8.2 Hibridación y lavado de los microarrays por PCR

El soporte para la hibridación de los microarrays fue *Agilent Human oligonucleotide (Agilent Human A1, Agilent Human A2, and custom oligonucleotide)* en una olla *Robbins® Scientific Hybridization (Matrix Technologies, Hudson, NH, USA)* utilizando 2 µg de tinción de cianina Cy3 (muestra de referencia modificada de la versión de *Stratagene Human Universal Reference*), y 2 µg de Cy5, como muestra experimental. Los arrays fueron incubados toda la noche y lavados durante 10 minutos en 2× SSC (citrato salino estándar) y 0,0005% Triton® X-102, y 2 veces 5 minutos en 0,1× SSC; posteriormente fueron inmersos en solución secante y estabilizadora (*Agilent Technologies*) durante 20 segundos.

3.8.3 Escaneado y análisis de los datos obtenidos

El escaneado de estos microarrays, al igual que en la anterior población a estudio, se realizó con el GenePix 4000B Scanner® (Molecular Devices, Union City, CA, USA) con el canal Cy3 del PMT a 450 nm y 550 nm para el canal Cy5. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con GenePix Pro 4.1® y cargadas en la UNC-CH Microarray Database (<https://genome.unc.edu/>) donde con la normalización de Lowess ya descrita se ajustaron los canales de Cy3 y Cy5.

3.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos recogidos se ha utilizado el programa SPSS para Windows versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). El test de Chi-cuadrado se utilizó para relacionar los diferentes grupos a estudio. Todos los tests utilizados fueron bilaterales y el valor de p para considerar la significación estadística fue menor de 0,05.

Se empleó el índice kappa como coeficiente de concordancia (K) para escalas nominales (que mide la confiabilidad y validez del diagnóstico) entre la determinación de los subtipos intrínsecos del CM por IHQ/FISH y por PAM50, componiendo una tabla de contingencia 2x2. El coeficiente kappa refleja la concordancia inter-observador y puede ser calculado en tablas de cualquier dimensión, siempre y cuando se contrasten dos observadores^[61]. El coeficiente K puede tomar valores entre -1 y +1. Mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador; por el contrario, mientras más cercano a -1, mayor es el grado de discordancia inter-observador. Un valor de K=0 refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar, mientras que un valor de 1 indica una concordancia perfecta^[62].

La interpretación de la fuerza de concordancia del índice kappa se rige de acuerdo con el valor de k, con los criterios que describieron Landis y Koch^[63] como se recogen en la siguiente tabla (**Tabla 3**):

Coeficiente Kappa	Fuerza de la concordancia
0,00	Pobre (<i>poor</i>)
0,01 a 0,20	Leve (<i>slight</i>)
0,21 a 0,40	Aceptable (<i>fair</i>)
0,41 a 0,60	Moderada (<i>moderate</i>)
0,61 a 0,80	Considerable (<i>substantial</i>)
0,81 a 1,00	Casi perfecta (<i>almost perfect</i>)

resultados

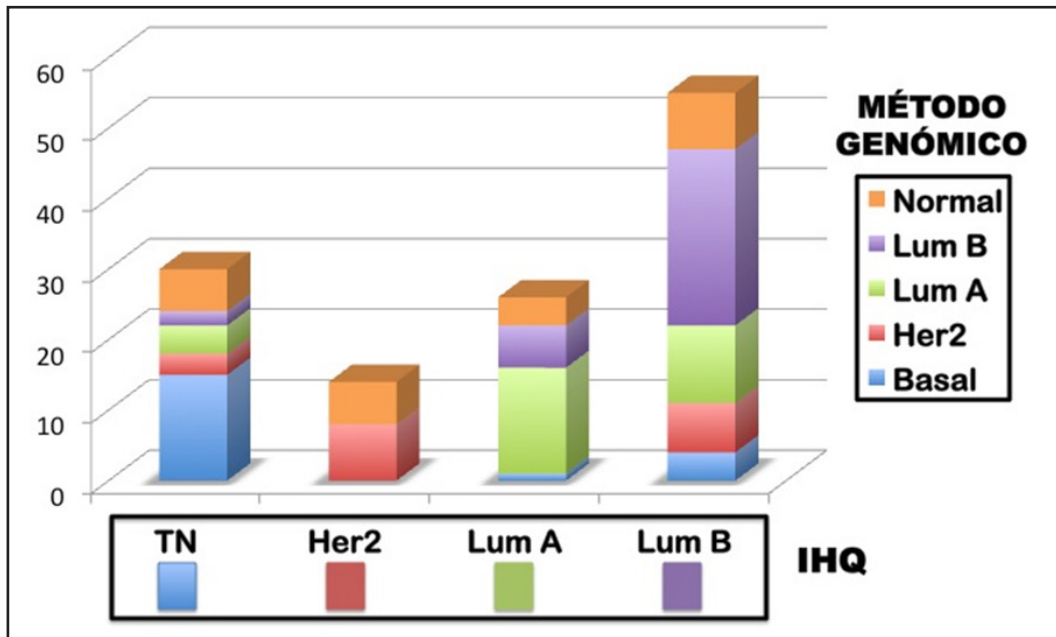
TESIS DOCTORAL

res ult dos

4.1 Correlación entre los subtipos intrínsecos moleculares determinados por PAM50 y por técnicas IHQ

A) Muestra neoadyuvante

A continuación se analiza el grado de concordancia de la determinación de los subtipos intrínsecos mediante la plataforma génica PAM50 y el panel de marcadores de inmunotinción. Para ello se recurre a la elaboración de tablas de contingencia calculando en cada caso el índice kappa para determinar el grado de correlación entre ambos métodos clasificadores. Hay que decir que se han tenido en cuenta 4 subtipos intrínsecos caracterizados por IHQ (luminal A y B, HER2 y TN), prescindiendo del subtipo basal, ya que está actualmente en discusión su validez, definición por biomarcadores y aplicabilidad en la práctica clínica (subtipo basal determinado por IHQ corresponde a RE-, RP-, HER2- y CK5/6 y/o EGFR+).

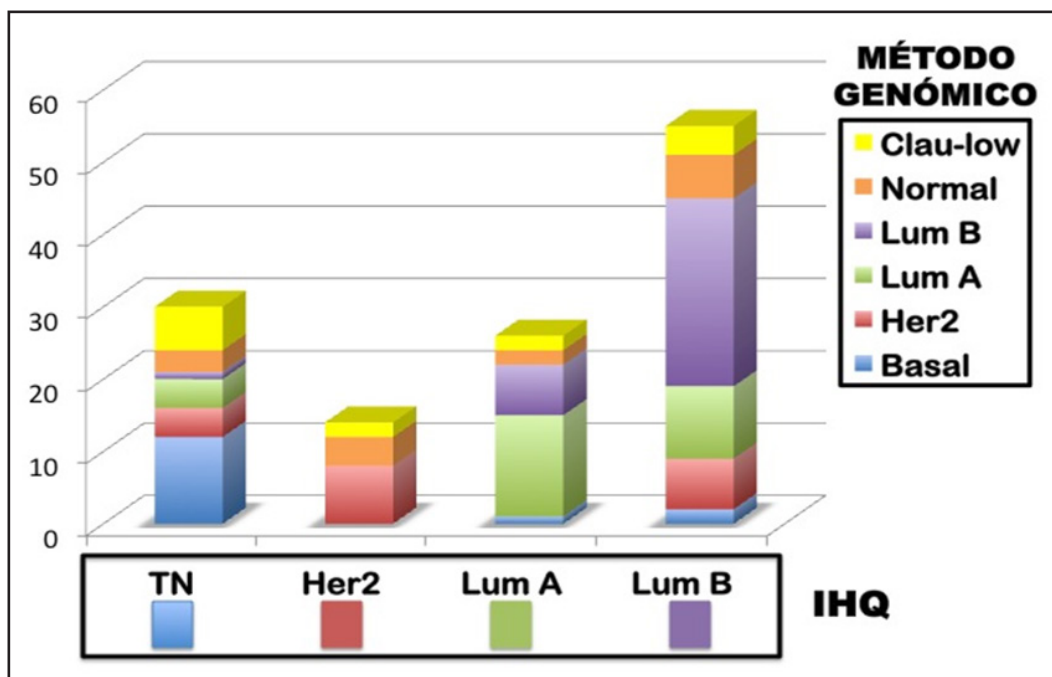


	Basal _{PAM50}	HER2 _{PAM50}	LumA _{PAM50}	LumB _{PAM50}	Normal _{PAM50}	Total
LUMB _{IHQ}	4	7	11	25	8	55
LUMA _{IHQ}	1	0	15	6	4	26
HER2 _{IHQ}	0	8	0	0	6	14
TN _{IHQ}	15	3	4	2	6	30
Total	20	18	30	33	24	125

Gráfico 1. Correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores inmuno-histoquímicos y por el método genómico en la muestra neoadyuvante. En la tabla que aparece en la parte inferior se especifica la frecuencia para cada uno de los subtipos determinados por ambos métodos.

El estudio comparativo entre los diferentes subtipos determinados por perfiles de expresión génica e IHQ **mostró diferencias significativas entre ellos**, mediante el método de Chi-cuadrado. **P= 0,000.**

Para conocer el grado de correlación entre ambos métodos clasificadores se utilizó **el coeficiente de contingencia o índice Kappa** (ver en Material y Métodos). El valor de kappa es igual a **0,34** lo que indica una **correlación tan solo aceptable**. Esto quiere decir, que si bien las variables presentan un moderado grado de concordancia no existe entre ellas una relación de dependencia.



	Basal _{PAM50}	HER2 _{PAM50}	LumA _{PAM50}	LumB _{PAM50}	Normal _{PAM50}	ClauLow _{PAM50}	Total
LUMB _{IHQ}	2	7	10	26	6	4	55
LUMA _{IHQ}	1	0	14	7	2	2	26
HER2 _{IHQ}	0	8	0	0	4	2	14
TN _{IHQ}	12	4	4	1	3	6	30
Total	15	19	28	34	15	14	125

Gráfico 2. Correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores inmuno-histoquímicos y por el método genómico en el contexto neoadyuvante (incluyendo la determinación del subtipo claudin-low). En la tabla que aparece en la parte inferior del gráfico se especifica la frecuencia para cada uno de los subtipos determinados por ambos métodos.

El valor de Chi-cuadrado de Pearson fue de 87,759 con una significación asintótica (bilateral) de $P=0,000$. Sin embargo, en esta ocasión no fue posible calcular los estadísticos Kappa ya que se requiere una tabla simétrica de 2 vías en la que los valores de la primera variable sean idénticos a los valores de la segunda.

A continuación se analizará el porcentaje de concordancia entre ambos métodos clasificadores. En el gráfico que se muestra a continuación se ilustra el porcentaje de casos en los que hubo discrepancias a la hora de definir los subtipos intrínsecos por ambos métodos (genómico e IHQ). En esta muestra hubo 63 tumores en los que ambos métodos les asignaron el mismo subtipo (hay que decir que se excluye el subtipo genómico normal al no tener una correlación directa con la clasificación por marcadores IHQ; 24 normales: 6 TN, 6 HER2, 4 Lum A, 8 Lum B).

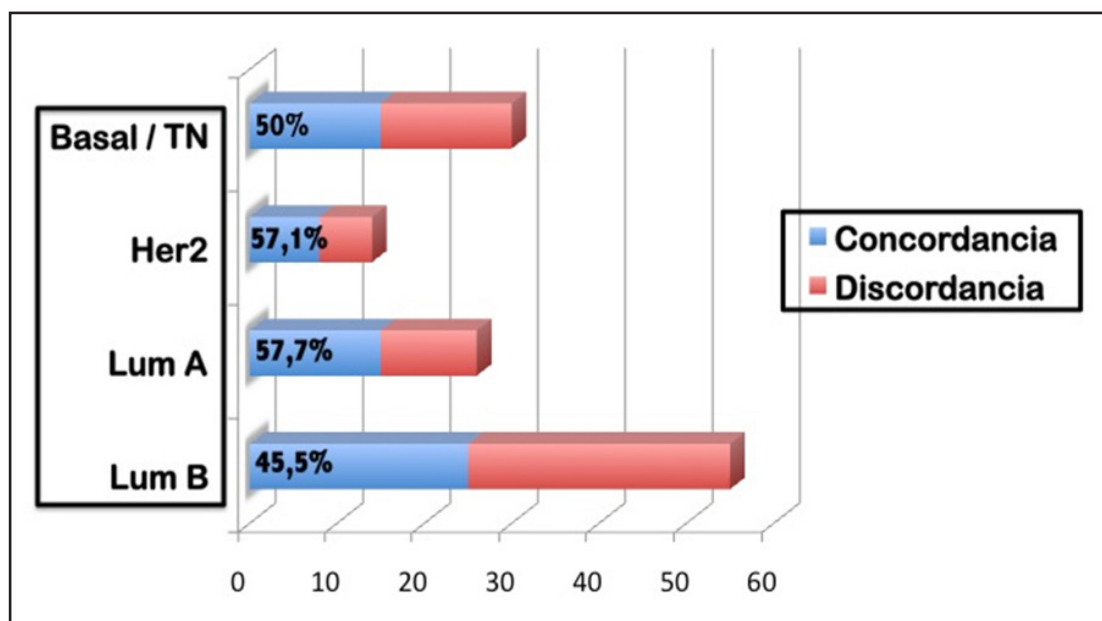
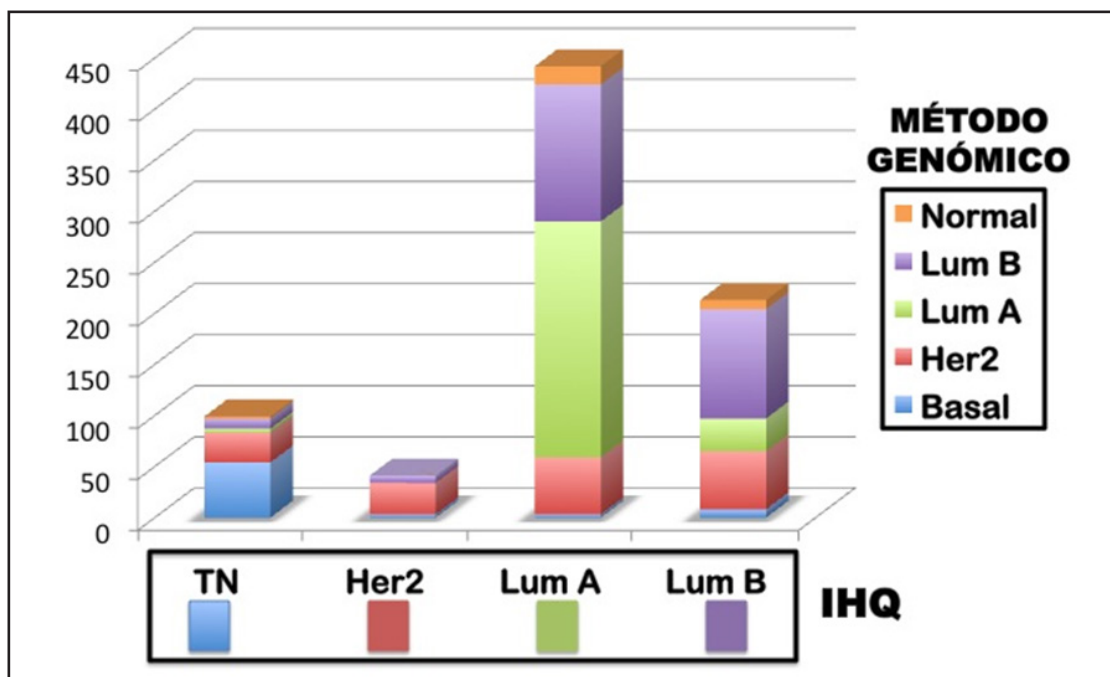


Gráfico 3. Grado de correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores IHQ y por el método genómico en el contexto neoadyuvante (se excluye el subtipo genómico normal al no tener una traducción conocida en el panel de inmunotinción).

B) Muestra en adyuvancia

Del mismo modo, analizamos la correlación entre subtipos intrínsecos por ambos métodos en la muestra adyuvante (795 tumores en total en los que se analizaron su expresión génica por microarrays de ADN). Sin embargo, no se obtuvo en esta muestra la clasificación en el subtipo claudin-low.



	Basal _{PAM50}	HER2 _{PAM50}	LumA _{PAM50}	LumB _{PAM50}	Normal _{PAM50}	Total
LUMB _{IHQ}	8	57	32	107	9	213
LUMA _{IHQ}	3	56	231	134	18	442
HER2 _{IHQ}	3	31	0	7	0	41
TN _{IHQ}	54	29	4	10	2	99
Total	68	173	267	258	29	795

Gráfico 4. Correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores inmuno-histoquímicos y por la plataforma genómica PAM50 en la muestra adyuvante. En la tabla que aparece en la parte inferior de este gráfico se especifica la frecuencia para cada uno de los subtipos determinados por ambos métodos.

El estudio comparativo entre los diferentes subtipos determinados por perfiles de expresión génica e IHQ **mostró diferencias significativas entre ellos**, mediante el método de Chi-cuadrado. **P= 0,000.**

Para conocer el grado de correlación entre ambos métodos clasificadores se utilizó **el coeficiente de contingencia o índice Kappa** (ver en Material y Métodos). El valor de kappa es igual a 0,371 lo que indica también una **correlación modesta**. Esto quiere decir, que si bien las variables presentan un moderado grado de concordancia no existe entre ellas una relación de dependencia.

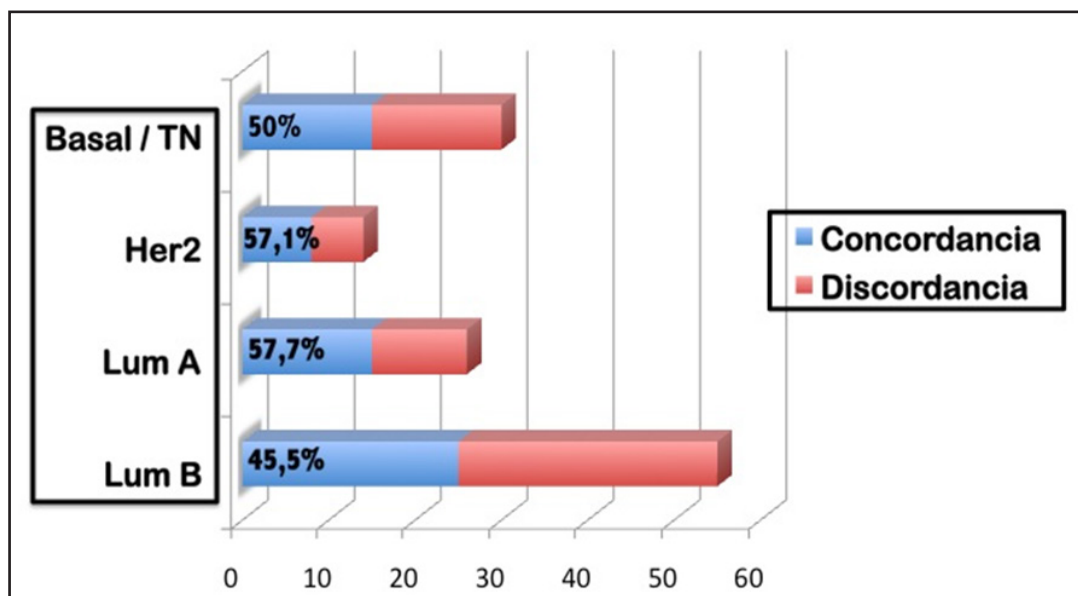


Gráfico 5. Grado de correlación entre los subtipos intrínsecos determinado a por el panel de biomarcadores IHQ y por la plataforma genómica PAM50 en el contexto adyuvante (se excluye el subtipo genómico normal al no tener una traducción conocida en el panel IHQ).

Analizando las discrepancias entre ambos métodos para la determinación de los subtipos intrínsecos se observa que los subgrupos luminal A y basales/TN son los mejor caracterizados con alrededor del 80% de acierto entre ambos métodos. Sin embargo, es el HER2 el que mayor discrepancia alberga entre la IHQ y método genómico (82,1%). En este caso también se han excluido los tumores normales (29 en total). Su distribución fue TN 2, Lum A 18, Lum B 9 y ningún HER2.

4.2 Características clínicas de las pacientes incluidas en el estudio

A continuación se describirán las características clínicas de las pacientes incluidas en ambas series. Dicha descripción se realizará separadamente, comenzando por la cohorte neoadyuvante.

A) Muestra neoadyuvante

Un total de 250 mujeres recibieron tratamiento neoadyuvante en el contexto del ensayo clínico ya mencionado (Doxorrubicina x 4 ciclos Vs Docetaxel x 4, con cruzamiento de tratamiento tras la cirugía como se describe en Material y Métodos). Del total de 250 pacientes incluidas en tal trabajo, 125 mujeres fueron elegibles para el análisis realizado en este trabajo ya que se disponía de la determinación de los subtipos intrínsecos moleculares por la plataforma PAM50. De la población elegible, 63 pacientes recibieron el brazo de tratamiento de antraciclinas frente a 61 pacientes que recibieron el taxano.

La media de edad al diagnóstico fue de 53,93. La edad mínima al diagnóstico fue 27 años, y la máxima 83 años. El 54,4% de las pacientes eran postmenopáusicas. El diámetro promedio tumoral fue de 7,49 ($\pm 5,7$) cm.

La distribución de los tumores atendiendo al estadio tumoral y el grado histológico se representa en los siguientes gráficos. Se observa que en nuestra población los tumores mayoritarios fueron del estadio IIB, IIIA y IIIB y de grado histológico tipo dos.

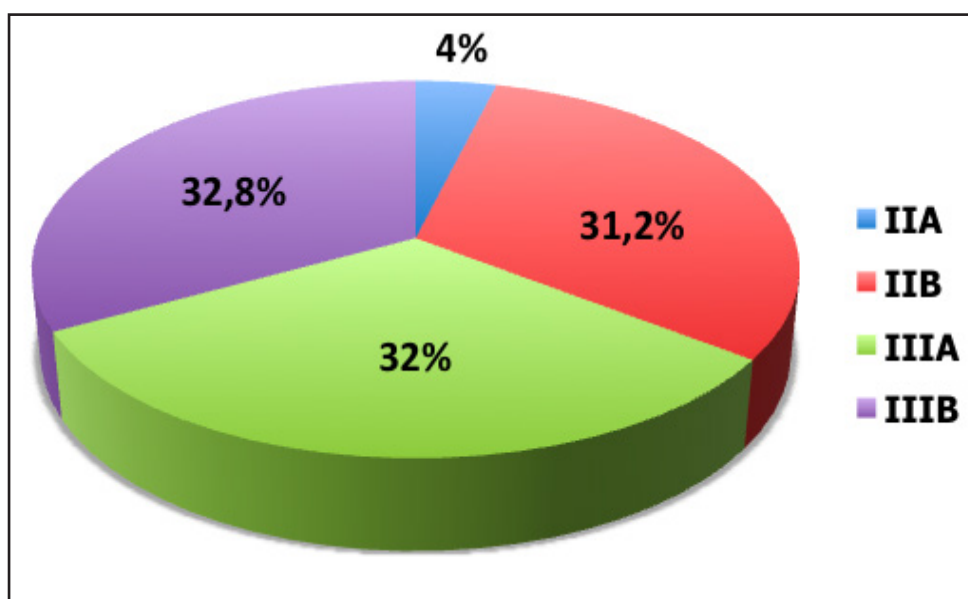


Gráfico 6. Estadio clínico tumoral de la muestra neoadyuvante según la Clasificación de la American Joint Committee on Cancer Staging (6ª Ed.)

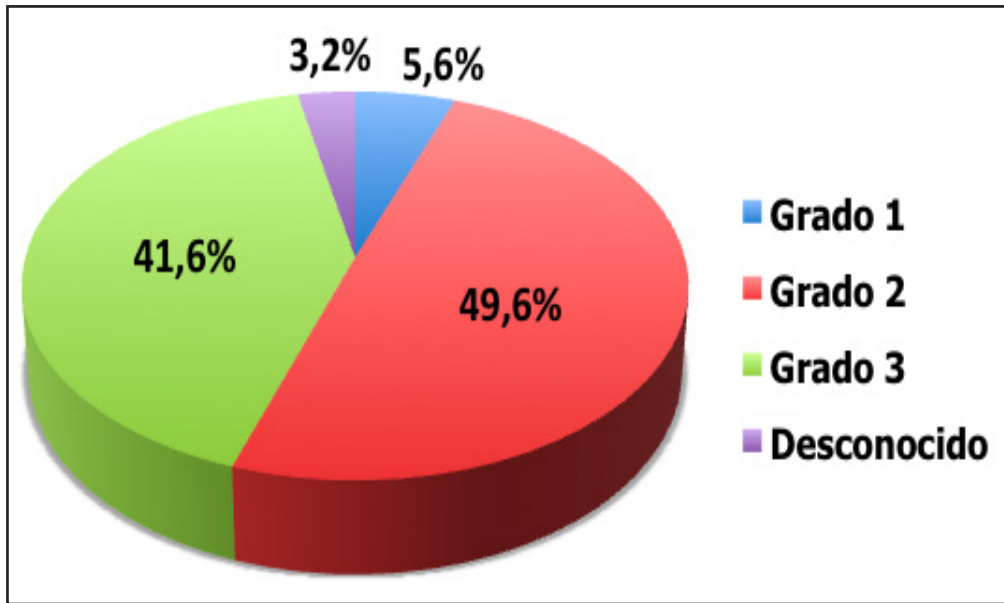


Gráfico 7. Distribución de los tumores en función del grado histológico. Nótese que hubo 4 muestras en las que no se pudo determinar el grado nuclear.

En cuanto al subtipo histológico, el ductal infiltrante fue el diagnóstico anatómo-patológico más predominante con 104 casos (83,2%). El lobulillar infiltrante fue el segundo subtipo más frecuente como se muestra en el siguiente gráfico circular:

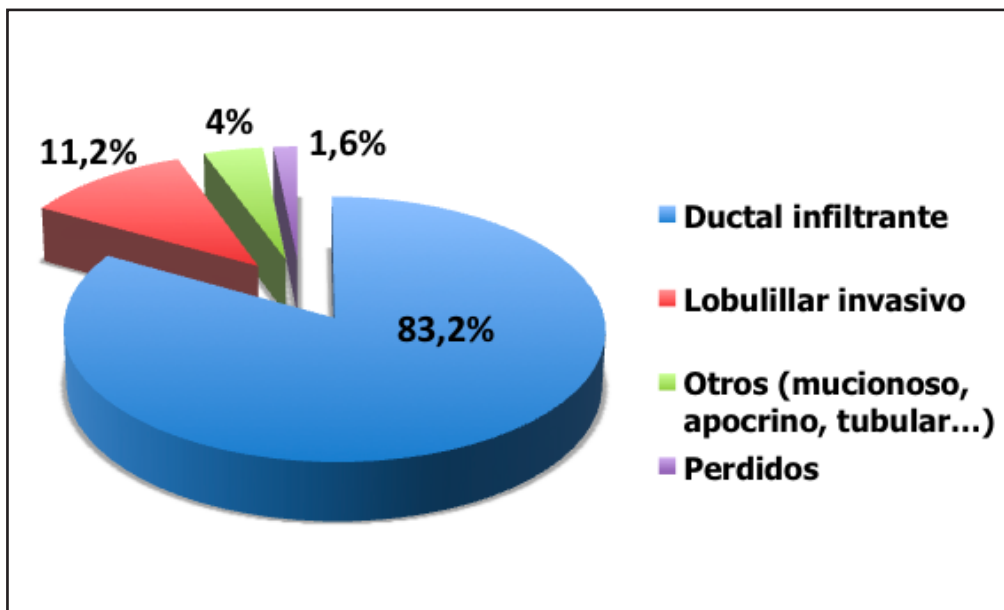
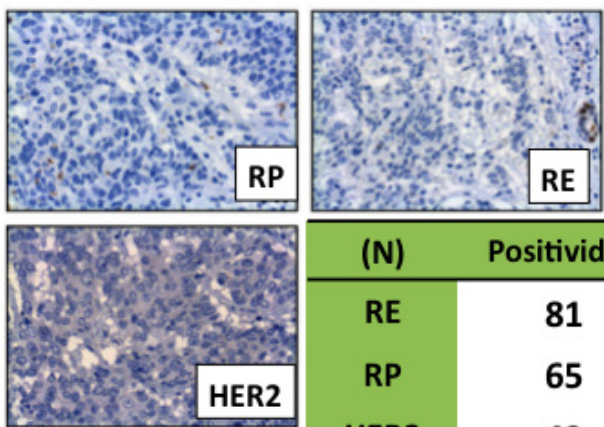


Gráfico 8. Distribución de los tumores en dicha muestra en función del subtipo histológico.

Respecto al grado de proliferación celular, el porcentaje promedio de células que sobre-expresaban Ki67 fue del 34,66% ($\pm 27,47\%$). La proporción de tumores con $Ki67 \geq 14\%$ (alto grado de proliferación celular) fue del 71,2%.

En cuanto al estado de los RH encontramos que un 64,8% de los tumores son positivos para el RE y el 52% para el RP. Por otro lado, el 34,4% de los tumores fueron HER2 positivos. Además, encontramos que un 24% de los tumores fueron TN.

Tabla 4. Distribución de los tumores según la positividad de los RE, RP y HER2. Los criterios de positividad se han comentado en la sección de Material y Métodos.



(N)	Positividad	Negatividad
RE	81	44
RP	65	60
HER2	43	82
		125

La distribución de los tumores mamarios en los subtipos intrínsecos atendiendo a los biomarcadores IHQ vendría dada como se ilustra en el siguiente sector circular. Se observa que el subtipo Luminal B es el más prevalente en esta serie con un 44% de los tumores analizados.

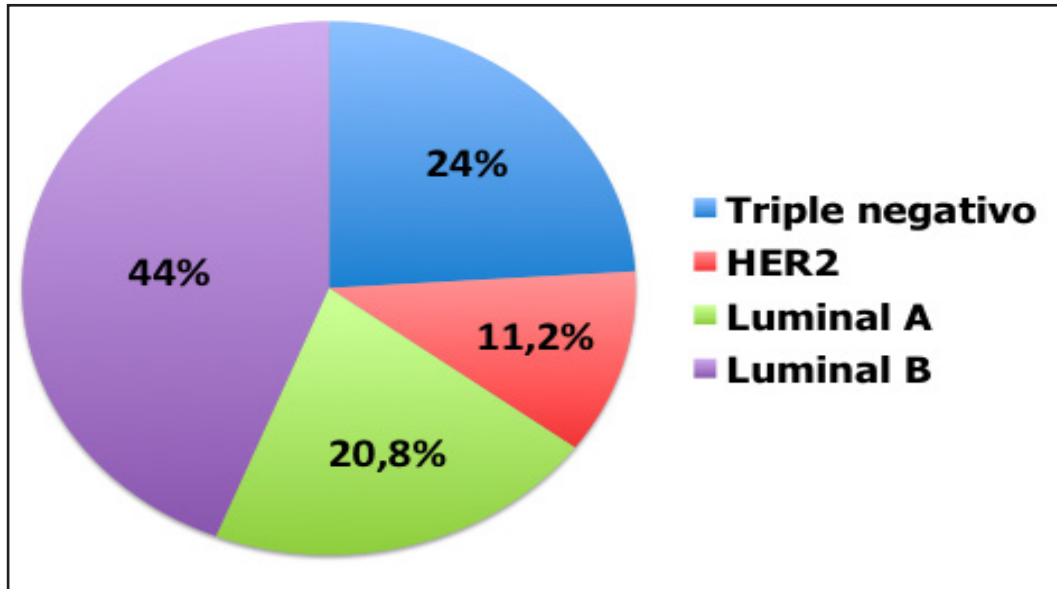


Gráfico 9. Subtipos intrínsecos de CM determinados por marcadores inmuno-histoquímicos.

Atendiendo a la positividad de las CK5/6 y/o del EGFR se obtendría el subtipo basal. En la muestra, un 19,2% de los tumores fueron positivos para EGFR y un 25,6% para CK5/6. Así dentro de los 30 tumores clasificados anteriormente como triples-negativos, 17 de ellos serían basales conforme a la clasificación de Cheang.

En relación al tratamiento administrado, se obtuvo la RPC en un 12,8% de las pacientes. Los subtipos intrínsecos que asociaron mayores tasas de RPC (16 en total) fueron los HER2 y los basales, representando el 50% de todas las RPC objetivadas (4 para cada uno de estos subtipos). El único subtipo en el que no se obtuvo ninguna remisión patológica fue en el luminal A. Se pudo realizar la cirugía conservadora en 43 de las pacientes (34,4%).

B) Muestra adyuvante

En el escenario de la adyuvancia, la muestra seleccionada fue la participante en un ensayo clínico fase III que comparaba FEC solo o seguido de Paclitaxel. De la totalidad de 1246 pacientes incluidas en este estudio, fueron elegibles para nuestra muestra un total de 825 que resultaron óptimos para la determinación de los subtipos intrínsecos moleculares por expresión génica. De la población elegible, 419 pacientes recibieron el brazo de tratamiento FECx6 mientras que las otras 406 mujeres recibieron el tratamiento combinado con el taxano.

La media de edad al diagnóstico fue de 51,19 años. En esta muestra el 46,1% de las pacientes eran postmenopáusicas. En cuanto al tipo de cirugía, a un 59,2% de las pacientes se les practicó la mastectomía. El diámetro promedio tumoral fue de 2,7 ($\pm 1,59$) cm. La media de ganglios aislados en la cirugía fue de 16,96 ($\pm 6,28$) mientras que la media de ganglios con afectación tumoral fue de 4,27 ($\pm 4,77$). Atendiendo a la clasificación TNM, las pacientes presentaron la siguiente distribución por tamaño tumoral y número de ganglios afectados en la cirugía:

Tablas 5 y 6. Distribución de las pacientes según el estadio tumoral primario y el número de ganglios afectados en la cirugía.

	Frecuencia	Porcentaje		Frecuencia	Porcentaje
T1 < 2 cm	342	41,5%	N1 1-3 ganglios	508	61,6%
T2 2-5 cm	434	52,6%	N2 4-9 ganglios	229	27,8%
T3 > 5 cm	46	5,6%	N3 > 10 ganglios	85	10,3%
Total	822	99,6%	Total	822	99,6%
Perdidos	3	0,4%	Perdidos	3	0,4%

En cuanto al subtipo histológico, el ductal infiltrante fue también el diagnóstico anatómico-patológico (AP) mayoritario con 708 casos (90,08%). El lobulillar infiltrante fue el segundo en prevalencia con un 7,76%. La distribución de los tumores atendiendo al grado histológico se representa en el siguiente gráfico de sectores:

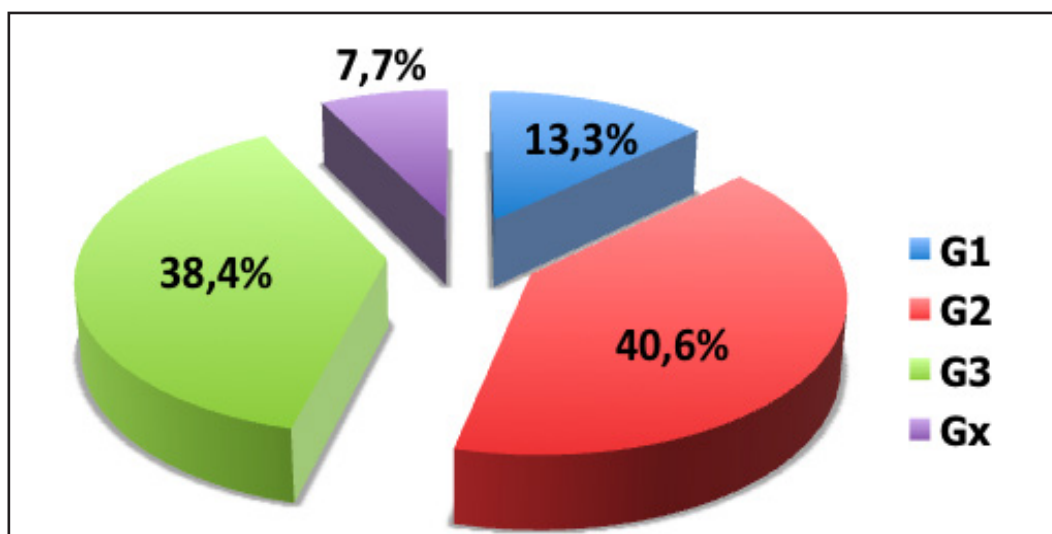


Gráfico 10. Distribución de los tumores en función del grado histológico. G=grado nuclear; Gx: grado indeterminado.

Respecto al grado de proliferación celular, el porcentaje promedio de células que sobre-expresaban Ki67 fue del 32,45% ($\pm 23,57\%$). La proporción de tumores con $Ki67 \geq 14\%$ (alto grado de proliferación celular) fue del 68,7%.

En cuanto al estado de los RH encontramos que un 78,1% de los tumores son positivos para el RE y el 69,1% para el RP. Por otro lado, el 14,2% de los tumores fueron HER2 positivos (por FISH). Por IHQ, aquellos tumores con 3+ en la positividad del HER2 fueron 80 (9,7%) y 2+, el 113 (13,7%). Además, encontramos que un 12,1% de los tumores fueron TN en esta serie.

Tabla 7. Distribución de los tumores según la positividad de los RE, RP, HER2 y Ki67. Los criterios de positividad se han comentado en la sección de Material y Métodos.

Frecuencias Porcentajes		
RE		
RE+	644	78,10%
RE-	173	21%
Indeterminados	8	1%
RP		
RP+	570	69,10%
RP-	246	29,80%
Indeterminados	9	1,10%
Her2		
Her2+	117	14,20%
Her2-	696	84,40%
Indeterminados	12	1,50%
Ki67		
Ki67 \geq 14	567	68,70%
Ki67<14	236	28,60%
Indeterminados	22	2,70%

La distribución de los tumores mamarios en los subtipos intrínsecos atendiendo a los biomarcadores IHQ vendría dada como se ilustra en el siguiente gráfico. Se observa que el subtipo Luminal A es el más prevalente en esta serie con un 53,7% de los casos.

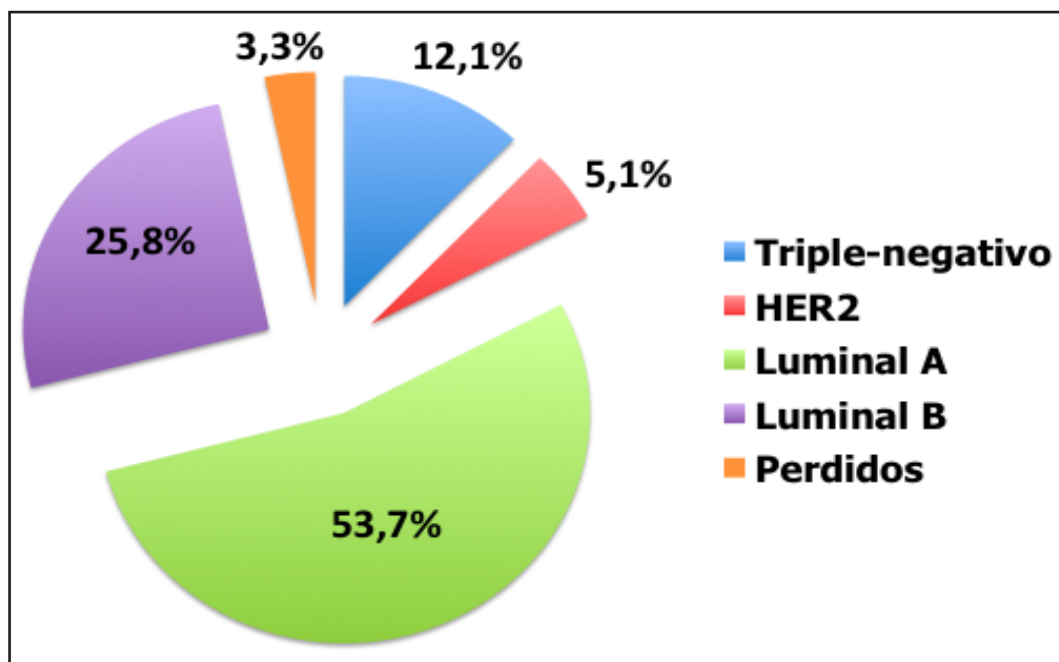


Gráfico 11. Subtipos intrínsecos de CM determinados por criterios IHQ.

Atendiendo a la positividad de las CK5/6 y/o del EGFR, un 21,3% de los tumores fueron positivos para EGFR y un 28,6% para CK5/6. De este modo, dentro de los 100 tumores clasificados anteriormente como triples-negativos, 48 de ellos serían basales conforme a la clasificación propuesta por Cheang.

4.3. Distribución de los subtipos intrínsecos determinados por el método genómico

En la muestra neoadyuvante, como se observa en los 2 gráficos siguientes, el subtipo intrínseco más prevalente fue el luminal B con alrededor de un 27%. Obsérvese que en el Gráfico 13 se contemplan las predicciones del subtipo claudin-low por el Claudin-low assay (representando un 11,2% de los tumores y siendo a su vez el subtipo menos frecuente). Dado que el método PAM50 no era capaz de discriminar los tumores claudin-low, se completó aquel con una plataforma complementaria (también conocida como *9-Cell Line Claudin-low Predictor*) capaz de identificar a los tumores de este subtipo específico basándose en la expresión de 703 genes.

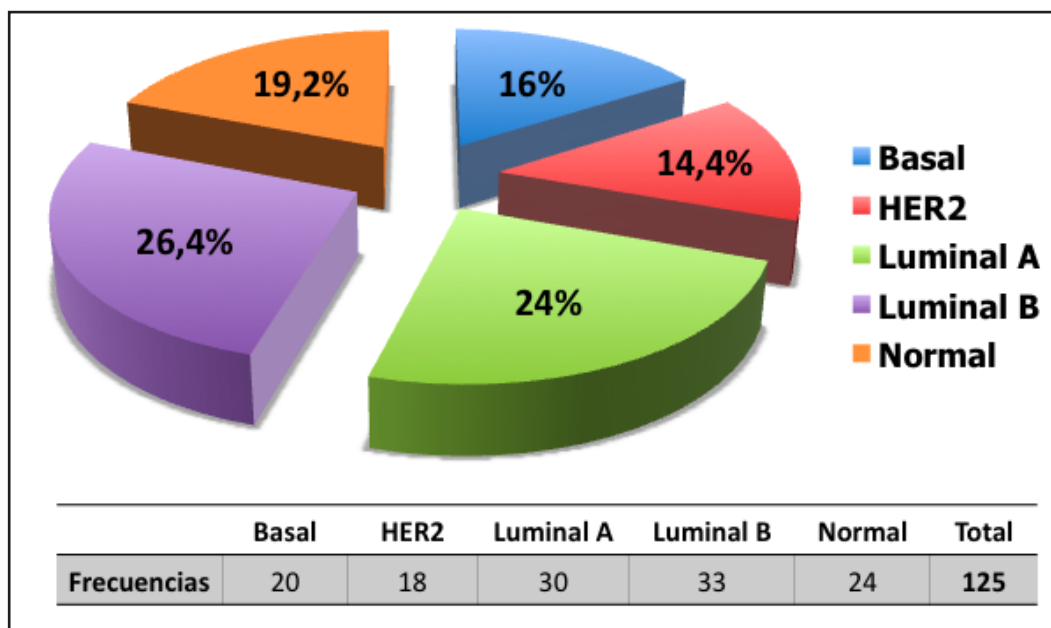


Gráfico 12. Subtipos intrínsecos moleculares de CM en la muestra neoadyuvante determinados por el método de expresión génica. En el gráfico se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

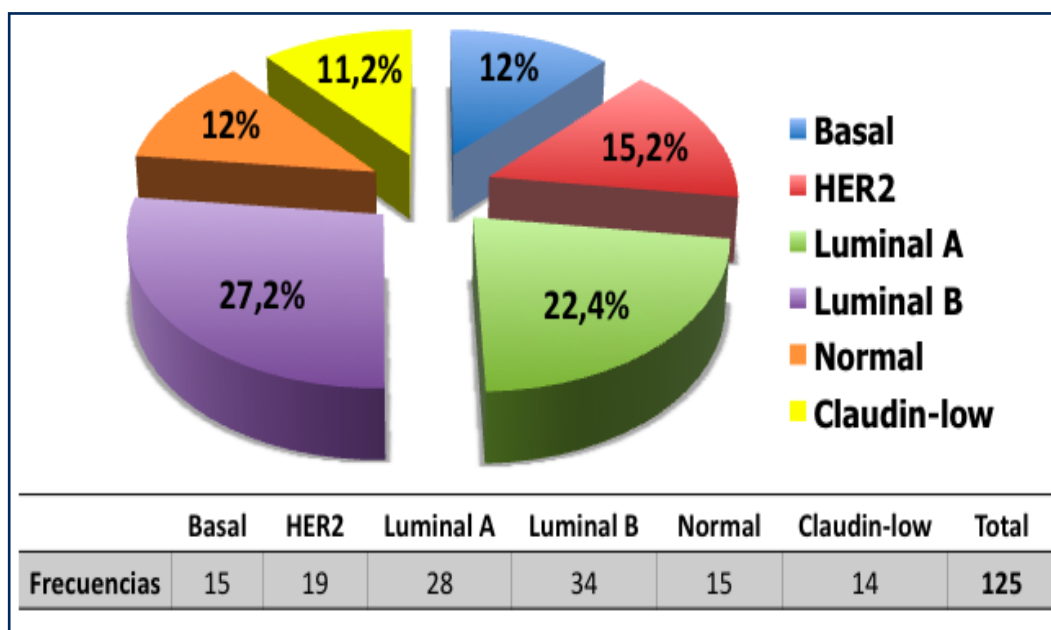


Gráfico 13. Subtipos intrínsecos moleculares de CM en la muestra neoadyuvante determinados por el método genómico (incluyendo el subtipo claudin-low). En el gráfico se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

Con respecto a la distribución de los subtipos intrínsecos determinados por la expresión génica en la muestra tratada en adyuvancia varía la frecuencia de cada uno de los subtipos. En este caso, el subtipo más frecuentemente encontrado es el luminal A con 278 muestras con este diagnóstico de expresión génica (un 33,7% del total). Prácticamente el mismo porcentaje es observado para el subtipo luminal B (32%). El subtipo minoritario es el normal (3,8%). Nótese que en esta muestra no se dispuso de la determinación complementaria del subtipo claudin-low y hubo 5 muestras en las que se obtuvo un resultado indeterminado.

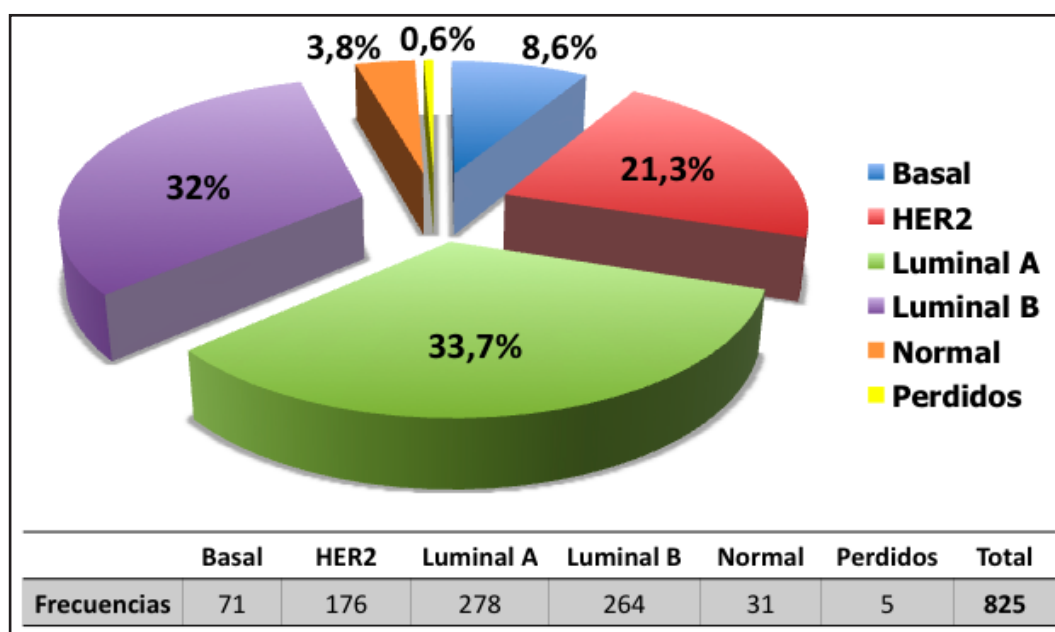


Gráfico 14. Subtipos intrínsecos moleculares de CM en la muestra adyuvante determinados por PAM50. En el gráfico se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

4.4. Relación entre variables clínicas y los subtipos por expresión génica tumoral.

A) Muestra neoadyuvante

- Edad de las pacientes: el subtipo intrínseco que alberga las pacientes más jóvenes es el basal con una media de edad de 48,47 años (IC 95%: 42,93-54). Las pacientes con más edad fueron aquellas que presentaron tumores claudin-low con una media de edad de 58,86 años (IC 95%: 51,08-66,63), seguidas del subtipo luminal A con media de 57,85 años (IC 95%: 52,85-62,86).

- Estado menstrual: El 64,7% de los HER2 fue un diagnóstico en mujeres premenopáusicas. El luminal A fue el subtipo más frecuente entre las postmenopáusicas, con 29 casos (65,5%).

- Tamaño tumoral: los subtipos luminales A y B fueron los que presentaron un mayor tamaño tumoral con unas medias de 7,89 cm y 8,69 cm, respectivamente. Los tumores tipo basales fueron los que se asociaron a menor tamaño al diagnóstico ($5,13 \pm 2,03$ cm).

- Número de ganglios afectados: Los subtipos normal y claudin-low fueron los subtipos con mayor afectación adenopática al diagnóstico con una media de 6 ganglios. HER2 fue el subtipo con menor número de ganglios afectados ($2,5 \pm 3,3$).

- Subtipo histológico: Analizaremos los 2 diagnósticos anatómopatológicos más frecuentes (ductal y lobulillar infiltrantes). En la tabla que se muestra a continuación se ilustra la distribución de ambos diagnósticos por subtipos intrínsecos moleculares. Como se puede observar, el 100% de los HER2 y claudin-low son ductales infiltrantes y alrededor de un 20% de los luminales y normales son lobulillares. Decir que hubo 2 diagnósticos de medulares que fueron compatibles ambos con el subtipo basal. Otras categorías: 2 tubulares, ambos en el subtipo luminal A y 1 mucinoso en el subtipo normal.

Tabla 8. Correlación entre el subtipo histológico y los subtipos intrínsecos moleculares. Se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

	Basal	HER2	Luminal A	Luminal B	Normal	Claudin- low	Total
Ductal infiltrante	13 (86,7%)	19 (100%)	20 (71,4%)	27 (79,4%)	11 (73,3%)	14 (100%)	104 (83,2%)
Lobulillar Infiltrante	0 (0%)	0 (0%)	5 (17,9%)	6 (17,6%)	3 (20%)	0 (0%)	14 (11,2%)

- Grado nuclear: Como se evidencia en la tabla a continuación, los subtipos basales y HER2 son predominantemente de alto grado (alrededor del 63% son grados 3). Los subtipos luminales y claudin-low son los únicos subtipos que albergaron tumores de bajo grado nuclear. Como se ha comentado con anterioridad, el grado 2 es el más frecuente en esta serie (49,6% del total).

Tabla 9. Correlación entre el grado histológico y los subtipos intrínsecos moleculares. Se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

	Basal	HER2	Luminal A	Luminal B	Normal	Claudin-low	Total
G1	-	-	5 (17,9%)	1 (2,9%)	-	1 (7,1%)	7 (5,6%)
G2	5 (33,3%)	6 (31,6%)	17 (60,7%)	19 (55,9%)	8 (53,3%)	7 (50%)	62 (49,6%)
G3	10 (66,6%)	12 (63,2%)	5 (17,9%)	12 (35,3%)	7 (46,7%)	6 (42,9%)	52 (41,6%)
Gx	-	1 (5,3%)	1 (3,6%)	2 (5,9%)	-	-	4 (3,2%)
Total	15 (100%)	19 (100%)	27 (100%)	34 (100%)	15 (100%)	14 (100%)	125 (100%)

Se incluirá en este apartado la tasa de RPC y la relación de ésta con los distintos subtipos intrínsecos moleculares así como el esquema de tratamiento neoadyuvante prescrito en cada caso. En total se registraron 16 RPC (12,8%). La distribución de la magnífica respuesta patológica según los distintos subtipos vendría dada en el siguiente gráfico. Así, un 26,7% de los basales, un 21,1% de los HER2, un 8,8% de los luminales B, un 13,3% de los normales y un 21,4% de los claudin-low alcanzaron una RPC. El único subtipo que no consiguió ninguna respuesta completa fue el luminal A. Se obtuvo RPC con el esquema que contenía adriamicina en 3 de las 4 RPC en los basales, en 2 de las 4 de HER2, en 2 de las 3 de los luminales B, 1 de 2 de los normales y 2 de las 3 RPC de los claudin-low.

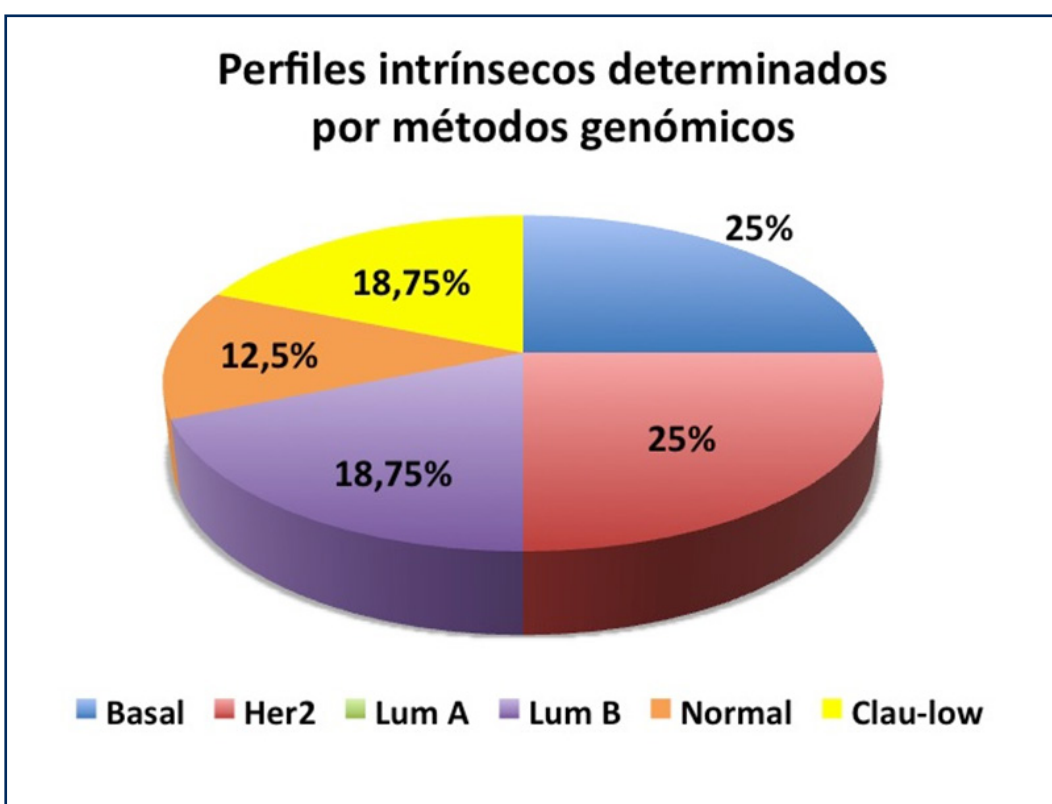
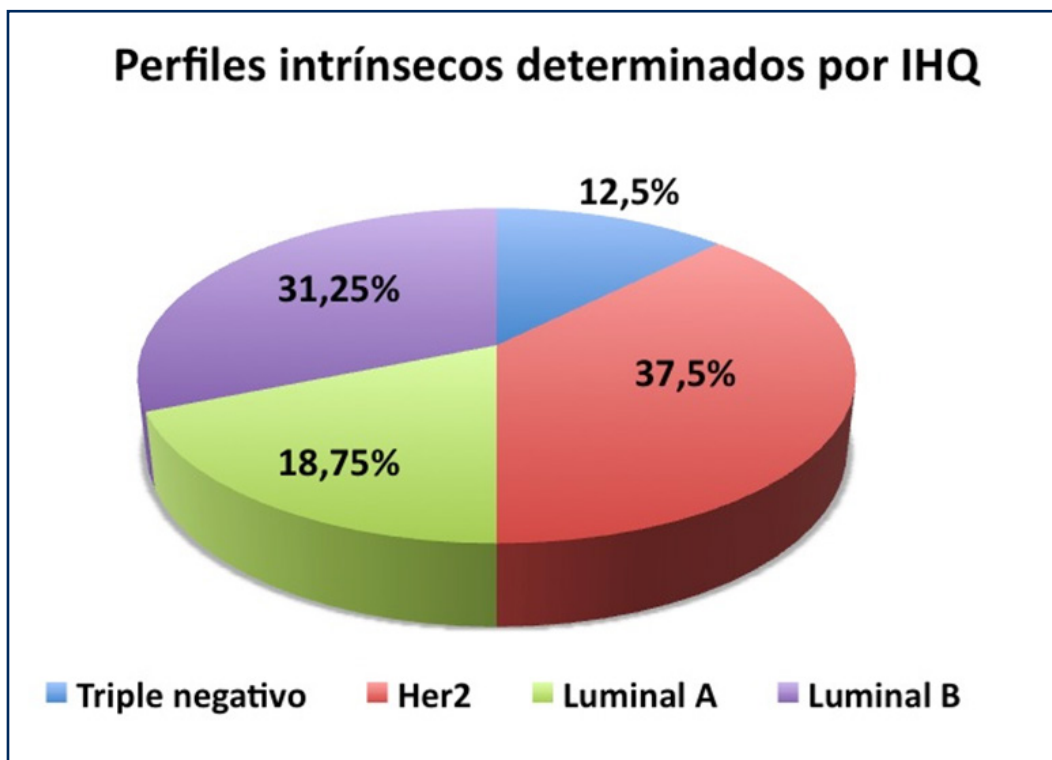


Gráfico 15. Proporción de las 16 respuestas patológicas completas (RPC) obtenidas en la muestra y su distribución según subtipos intrínsecos determinados por ambos métodos clasificadores (IHQ y genómico).


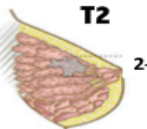
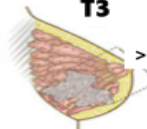
B) Muestra adyuvante

- Edad de las pacientes: el subtipo intrínseco que alberga las pacientes más jóvenes es el normal con una media de edad de 48 años (IC 95%: 45,15-50,84). Las pacientes con más edad fueron aquellas que presentaron tumores claudin-low con una media de edad de 51,84 años (IC 95%: 49,33-54,35), seguidas del subtipo luminal B con media de 51,71 años (IC 95%: 50,33-53,08).

- Estado menstrual: El 74,2% de los normales fue un diagnóstico en mujeres premenopáusicas. Sin embargo, luminales A y B concentraron el mayor número de mujeres premenopáusicas (168 y 123, respectivamente). También fueron estos subtipos los más frecuentes entre las mujeres postmenopáusicas, reuniendo conjuntamente 249 pacientes (110 y 139 para luminal A y B, respectivamente), aunque la mayor proporción registrada se observó en el subtipo basal (54,3% de un total de 70). Estas diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($P=0,002$).

- Tamaño tumoral: el subtipo basal (seguido del HER2) fue el que presentó un mayor tamaño tumoral con una media de 3,2 cm (IC 95%: 2,77-3,63). Los tumores tipo normales fueron los que se asociaron a menor tamaño al diagnóstico con 2,07 cm (IC 95%: 1,63-2,52) como media. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P=0,002$). Ver Tabla 11.

Tabla 10. Correlación entre el tamaño tumoral (conforme al sistema de estadificación TNM) y los subtipos intrínsecos moleculares. Se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos. Nótese que hubo 8 muestras en las que no se pudo obtener esta información (perdidos).

	Basal	HER2	Luminal A	Luminal B	Normal	Total
 T1 < 2 cm	17 (24,3%)	64 (36,9%)	142 (51,1%)	97 (37%)	19 (61,3%)	340 (41,6%)
 T2 2-5 cm	46 (65,7%)	96 (54,5%)	123 (44,2%)	154 (58,8%)	12 (38,7%)	431 (52,8%)
 T3 >5 cm	7 (10%)	15 (8,5%)	13 (4,7%)	11 (4,2%)	0 (0%)	46 (5,6%)
Total	70 (100%)	176 (100%)	278 (100%)	262 (100%)	31 (100%)	817 (100%)

- Número de ganglios afectados: HER2 fue el subtipo con mayor afectación adenopática al diagnóstico con una media de 5,26 ganglios positivos (IC 95%: 4,41-6,1). En el extremo opuesto, el subtipo luminal A fue el de menor número presentando una media de 3,44 adenopatías patológicas (IC 95%: 2,98-3,91). $P=0,000$.

- Subtipo histológico: El diagnóstico histopatológico de ductal infiltrante según subtipos moleculares se distribuyó de la siguiente manera: basal 62 (88,6%), HER2 163 (92,6%), luminal A 229 (82,4%), luminal B 232 (88,5%) y normal 25 (80,6%). El lobulillar infiltrante se diagnosticó con mayor frecuencia entre los luminales A (38 casos que suponen el 13,7% de los luminales A). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los subtipos luminal A y HER2 ($P=0,000$).

- Grado nuclear: Como se evidencia en la tabla que se muestra a continuación, los subtipos basales y HER2 son predominantemente de alto grado (87,1% y 54,5%, respectivamente) y siendo estadísticamente significativas las diferencias con los subtipos luminales B y normales. Los subtipos luminales y claudin-low son los subtipos que más frecuentemente se asociaron a bajo grado nuclear. Grados 2 y 3 representaron cada uno de ellos alrededor de un 40% de la muestra.

Tabla 11. Correlación entre el grado nuclear y los subtipos intrínsecos moleculares. Se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos. Nótese que hubo 8 muestras en las que no se pudo obtener esta información (perdidos) y 59 muestras con grado indeterminado.

	Basal	HER2	Luminal A	Luminal B	Normal	Total
G1	0 (0%)	6 (3,4%)	69 (24,8%)	26 (9,9%)	7 (22,6%)	108 (13,2%)
G2	4 (5,7%)	67 (38,1%)	141 (50,7%)	110 (42%)	13 (41,9%)	335 (41%)
G3	61 (87,1%)	96 (54,5%)	40 (14,4%)	112 (42,7%)	6 (19,4%)	315 (38,6%)
Gx	5 (7,1%)	7 (4%)	28 (10,1%)	14 (5,3%)	5 (16,1%)	59 (7,2%)
Total	70 (100%)	176 (100%)	278 (100%)	262 (100%)	31 (100%)	817 (100%)

discusión

TESIS DOCTORAL

dis cus ión

5.1. Correlación entre los subtipos determinados por IHQ y por PAM50

5.1.1. Correlación entre los subtipos determinados por IHQ y por PAM50. Literatura existente al respecto

La clasificación molecular del CM en subtipos intrínsecos de acuerdo a los distintos patrones de expresión génica en el tejido tumoral es considerado por la comunidad científica como la corriente actual de actuación; sin embargo, el uso generalizado de estos perfiles génicos sigue siendo limitado (dados la dificultad de la técnica, el gasto económico y la complejidad de esta tecnología). Es por estos motivos que en la práctica clínica así como en muchos de los trabajos de investigación actuales se ha considerado la expresión de determinadas proteínas en las células tumorales una posible alternativa a los estudios genéticos. Sin embargo, existen muchos interrogantes en lo que respecta a esta extrapolación del método genómico e IHQ. Por ejemplo, no existe a día de hoy un consenso de qué marcadores IHQ deben utilizarse o qué subtipos son más superponibles por ambos métodos clasificadores^{[64][65]}.

Nuestros resultados muestran que la correlación entre la determinación de inmuno-tinción y la de expresión génica de los subtipos intrínsecos moleculares es únicamente aceptable con un coeficiente kappa de 0,4.

Las implicaciones clínicas de estas discrepancias pasaremos a discutir a continuación^{[33][34]}: así los subtipos-IHQ RE+/HER2- se componen de 2 subtipos luminales: A (buen pronóstico, quimiorresistencia y sensibilidad a las terapias hormonales) y B (peor pronóstico, quimiorresistentes y menos hormonosensibles que los anteriores). Estas diferencias entre ambos subtipos parecen tener su explicación en el estado de proliferación (de ahí la aproximación del panel IHQ de diferenciar entre Ki67 alto o bajo). Es de importancia vital esta discriminación a la hora de elegir la terapéutica adecuada para las pacientes. Datos de ensayos clínicos en neoadyuvancia ponen de manifiesto la mayor quimiosensibilidad de los luminales B respecto a los A (con tasas de RPC cercanas al 20%)^[66].

Los subtipos-IHQ (RE+/HER2+) comprenden fundamentalmente 2 subtipos intrínsecos con características clínicas y terapéutica completamente distinta: Luminales B y HER2. Quizás suponga el mayor reto a la hora de poder discriminar entre estos 2 subtipos ya que engloban conjuntamente un amplio abanico de terapia dependiendo sea uno o el otro: hormonoterapia, quimioterapia convencional y tratamiento anti-HER2^[67].

El patrón IHQ (RE-/HER2+) corresponde, según la literatura, aproximadamente a un 50-90% al subtipo molecular HER2. En nuestras series uno de los subtipos donde se concentran las mayores discrepancias. Existen cuestiones sin resolver como el beneficio universal de la terapia anti-HER2 en este subtipo-IHQ^[64].

Finalmente, dentro del heterogéneo grupo de los triple negativos (RE-/HER2-), basales y claudin-low son los subtipos intrínsecos más frecuentemente identificados. En este subgrupo de pacientes la quimioterapia parece ser el tratamiento de elección a día de hoy. Como se ha comentado con anterioridad, la problemática de la nomenclatura utilizada, el mal pronóstico de este subgrupo y la necesidad de encontrar tratamientos diana (como los inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y/o anti-CSC) hacen que sea una necesidad imperiosa el poner en marcha estudios para definir su complejidad biológica y la terapéutica más adecuada^{[68][69]}.

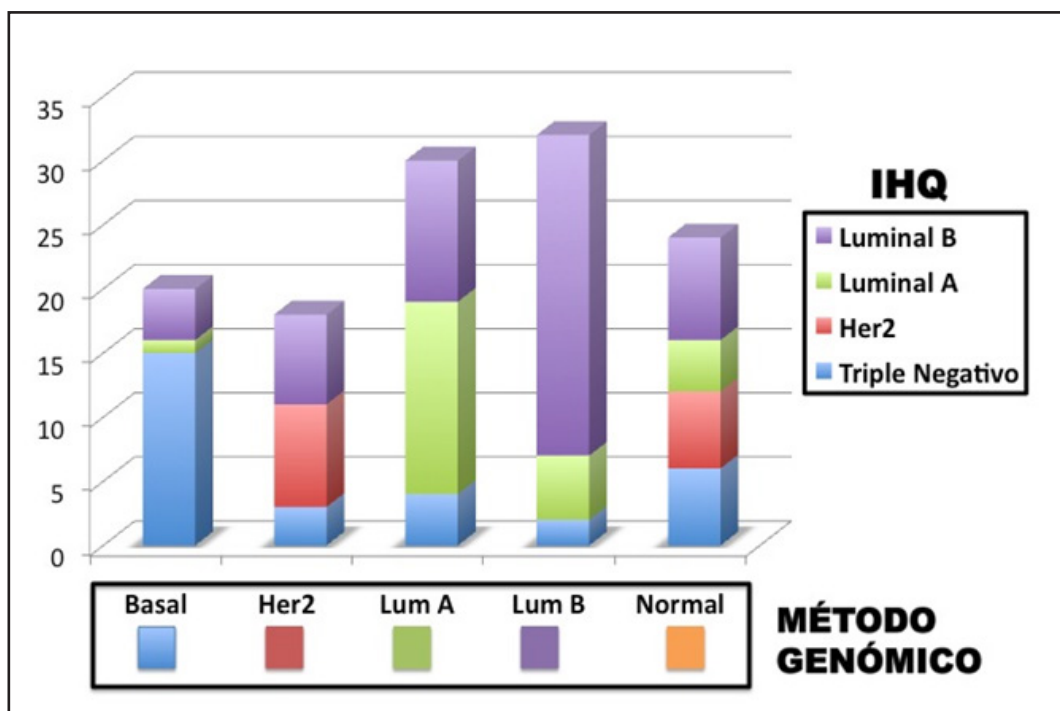


Gráfico 16. Correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores inmuno-histoquímicos y por el método genómico en la muestra neoadyuvante.



Gráfico 17. Correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores inmuno-histoquímicos y por el método genómico en nuestra muestra en el contexto adyuvante.

No existe ningún estudio que analice el grado de correlación con el grado de concordancia Kappa entre la IHQ como marcador subrogado para la determinación de los subtipos moleculares y la plataforma génica PAM50. En un trabajo encabezado por Nielsen^[70], en el que sí que se utiliza la plataforma PAM50, no existe una comparación directa con los perfiles designados por un panel IHQ. Será utilizado este trabajo en epígrafes posteriores como de referencia a la hora de hacer comparaciones con nuestras muestras a estudio. Estos autores analizan el estado de los RH y del HER2 respecto a los 5 subtipos moleculares designados por PAM50. Como se puede observar la correlación en este caso tampoco es idónea y existe también un gran margen de error en los subtipos moleculares HER2 y basal y un 10% de las pacientes fueron clasificadas en estos subgrupos (hay que aclarar que todas las pacientes incluidas en este trabajo eran RH+).

Tabla 12. Estado de los RE, RP y HER2 de la cohorte participante en el estudio de Nielsen et al. Tabla modificada de T. O. Nielsen, "A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer" *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 21, pp. 5222–5232, 2010.

Clinical parameter		Total	PAM50 subtype (all N = 786)				
			Luminal A	Luminal B	HER2	Basal	Normal
Sample size	<i>n</i>	786	372	329	64	5	16
Clinical ER status (DCC ligand-binding assay)	Missing	9	5	3	0	0	1
	Negative (0-9 fmol/mg)	9	3	2	4	0	0
	Positive (>10 fmol/mg)	768	364	324	60	5	15
	Median (fmol/mg)	254.5	255.5	327.0	74.0	32.0	54.0
Clinical PR status (DCC ligand-binding assay)	Missing	161	84	53	15	2	7
	Negative (0-9 fmol/mg)	72	15	39	18	0	0
	Positive (>10 fmol/mg)	553	273	237	31	3	9
	Median (fmol/mg)	129	202	84.5	17	153	239
IHC HER2 with FISH correction on 2+ cases	Negative	696	348	294	34	4	16
	Positive	75	15	30	29	1	0
	Unknown	15	9	5	1	0	0

Un trabajo que merece mención en este apartado es el publicado recientemente por Huang^[71]. En este estudio el objetivo primario era evaluar la potencia predictiva de los distintos subtipos moleculares del CM designados por 3 plataformas de genes intrínsecos (Sørlie 500, Hu 306 y PAM50) así como describir las características clínicas de los subtipos moleculares en la población asiática. Para ello contaron con 169 muestras de carcinoma mamario. Lo interesante de este trabajo es que aportan en la información suplementaria una correlación directa entre los subtipos intrínsecos por Hu 306 y su correlación con el panel de biomarcadores IHQ que se ha utilizado también en este trabajo y que se ilustra en el gráfico siguiente [luminal A (RE+/HER2-), luminal B (RE+,HER2+), HER2 (RE-, HER2+), TN (RE-, HER2-)].

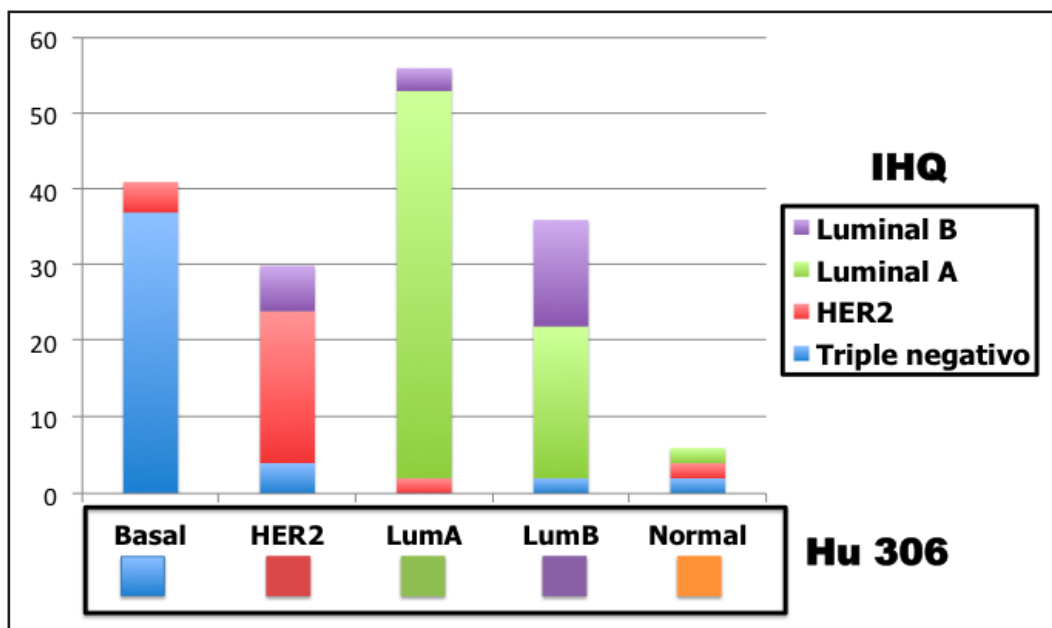


Gráfico 18. Correlación entre los subtipos intrínsecos determinados por el panel de biomarcadores IHQ y por el método genómico en el estudio de Huang et al "Prediction consistency and clinical presentations of breast cancer molecular subtypes for Han Chinese population. *J Transl Med.* 2012. Este gráfico se ha elaborado a través de los datos facilitados como Material adicional y suplementario.

Es por esto que los autores concluyen que existe un sustancial desacuerdo entre los "subtipos-IHQ" y los subtipos moleculares como se evidencia en el gráfico. Sin embargo, en este trabajo no se facilita el coeficiente de correlación (kappa) ni ningún otro parámetro de medidas simétricas, no pudiendo hacer una comparación directa con nuestros resultados.

5.1.2. Contextualización de nuestros valores K de concordancia

En este apartado se analizará el grado de correlación o acuerdo entre los distintos tests disponibles en CM (tanto a nivel AP como por el análisis de expresión génica). Una revisión excepcional a este respecto es la publicada de la mano de Aleix Prat^[72] y de la que extraemos la tabla comparativa que se muestra a continuación. En ella se estratifica el grado de correlación en 3 diferentes niveles de concordancia (desde moderada a casi perfecta, comprendiendo los valores de kappa entre 0,4 a 1).

Tabla 13. Datos de reproducibilidad de los biomarcadores actualmente en uso en el carcinoma mamario. Tabla modificada de A. Prat, M. J. Ellis, and C. M. Perou, "Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists" *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 9, no. 1, pp. 48–57, 2011. Abreviaturas: Ac: anticuerpos; NA: no aplicable; LBA: ligand-binding assay.

Nivel de coincidencia	Tipo de test	Protocolos idénticos (inter-laboratorio y/o inter-observador)	Protocolos o tecnologías diferentes (inter-método)
Nivel 1 (K ≥ 0,81) Correlación casi perfecta	Anatomo-patológico	<ul style="list-style-type: none"> IHQ RE con mismos Ac (+ vs -) FISH Her2 (+ vs -) IHQ Her2 con mismos Ac (+ vs -) 	NA
	Basado en expresión génica	<ul style="list-style-type: none"> Oncotype Dx y MammaPrint Subtipos intrínsecos basal y Her2 por análisis supervisado y distinto listado de genes de expresión. 	<ul style="list-style-type: none"> Subtipo intrínseco Basal por diferentes listados de genes y plataformas de expresión basadas en centroides
Nivel 2 (K 0,6-0,8) Correlación sustancial	Anatomo-patológico	<ul style="list-style-type: none"> IHQ Her2 con mismos Ac (+ vs -) Grado histológico IHQ RP con mismos Ac (+ vs -) IHQ RE, 3 o más grupos 	<ul style="list-style-type: none"> IHQ RE con distintos Ac RE por IHQ vs LBA IHQ Her2 con distintos Ac Her2 por IHQ vs FISH
	Basado en expresión génica	<ul style="list-style-type: none"> Subtipos intrínsecos por análisis supervisado y distinto listado de genes de expresión. Lum A/ Lum B/ Normal por análisis supervisado y distinto listado de genes de expresión. 	<ul style="list-style-type: none"> Subtipos intrínsecos por diferentes listados de genes y plataformas de expresión basadas en centroides
Nivel 3 (K 0,4-0,59) Correlación moderada	Anatomo-patológico	<ul style="list-style-type: none"> Grado histológico IHQ RE, 4 o más grupos IHQ RP, 4 o más grupos 	<ul style="list-style-type: none"> RP por IHQ vs LBA IHQ RP con distintos Ac IHQ RE con distintos Ac Her2 por IHQ/FISH vs FISH
	Basado en expresión génica	NA	<ul style="list-style-type: none"> Comparación grupos de riesgo por Oncotype Dx vs MammaPrint y Oncotype Dx vs PAM50-ROR Subtipos intrínsecos por diferentes listados de genes y plataformas de expresión basadas en centroides Lum A/ Lum B/ Normal por análisis supervisado y distinto listado de genes de expresión.

Es por esta tabla que las plataformas Oncotype DX® y MammaPrint® presentan un nivel 1 de correlación cuando se analiza repetidamente la misma muestra en distintos días o en manos de distintos técnicos, mostrando un coeficiente de correlación Kappa > 0,9. En el caso de PAM50, hasta la fecha no existen estos datos de reproducibilidad publicados.

Weigelt B^[73] y su equipo publicaron en el año 2010 un trabajo en el que exploraban el grado de correlación de 3 plataformas génicas^{[49][74][75]} validadas a la hora de definir los subtipos intrínsecos moleculares dentro de una misma muestra. Para este fin utilizaron 3 cohortes de pacientes estudios previos (NKI-295^[45], Wang^[76] y transBIG^[77]) con un total de 779 pacientes y una cohorte interna de 53 pacientes (tumores ductales infiltrantes, GIII). Los resultados mostraron que el grado de concordancia en la designación de subtipos intrínsecos entre las plataformas fue de moderado a considerable (Kappa=0,4-0,79), siendo el subtipo basal el que mayores concordancias reflejaba (Kappa>0,812).

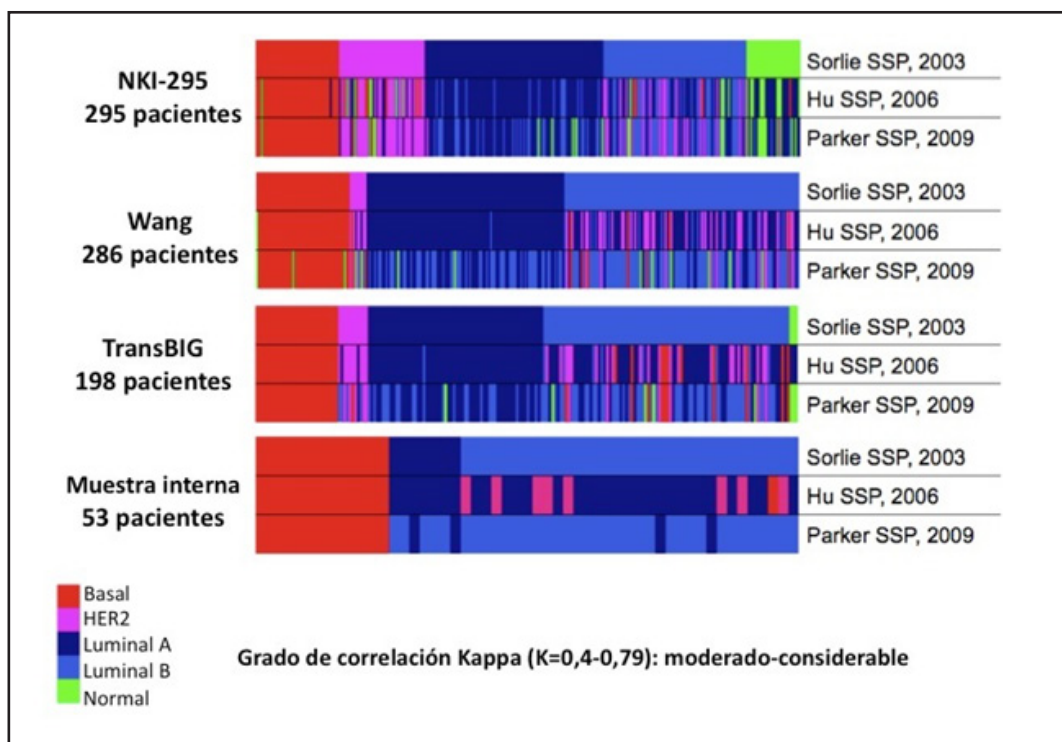


Figura 11. Grado de correlación entre los subtipos intrínsecos de CM determinados por 3 plataformas genómicas para las cohortes ilustradas a la derecha de la figura. Como puede observarse con el código de colores en el margen inferior izquierda, es el subtipo basal el que mayor grado de concordancia presenta entre las diferentes muestras y determinaciones. Modificado de *Weigelt et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. 2010 Apr;11(4):339-49.*

Conforme a los niveles de correlación que se han ilustrado en la tabla anterior, nuestros resultados (Kappa=0,37) se localizarían por debajo del nivel 3. Este grado de concordancia, aunque se considera “aceptable” en términos estadísticos, no lo es así en cuanto a la repercusión clínica, es decir, teniendo en cuenta el pronóstico o la elección de la terapéutica de las pacientes. Una paciente cuyo tumor tuviera una expresión génica como perteneciente al subtipo intrínseco HER2 pero

que fuera clasificada por su subtipo-IHQ como luminal A no recibiría, en este caso, tratamiento anti-HER2. ¿Sería una aproximación acertada? ¿Hay que fiarse de los subtipos intrínsecos determinados por expresión génica o por los marcadores AP? ¿Son equiparables ambas aproximaciones? Son interrogantes que serán discutidos a continuación en los siguientes epígrafes.

5.1.3. Panel IHQ como marcador subrogado de los subtipos intrínsecos moleculares

Un enfoque simplista de la clasificación molecular determinada por marcadores IHQ es contemplar únicamente 3 biomarcadores, utilizados de rutina en la práctica clínica (RE, RP y HER2). Asumiendo esta aproximación, los carcinomas con RH+ se definirían como luminales, mientras que los RH- y HER2- (a menudo designados como TN) se equiparan con los tumores basales de los subtipos moleculares. Este esquema simple tiene algún valor, ya que incide en la diferente naturaleza de los carcinomas mamarios atendiendo a la positividad o negatividad de los RE (aunque probablemente representa la simplificación máxima y poco aproximada de la complejidad molecular). Sin embargo, estudios más recientes apuntan a la obligatoriedad de utilizar otros biomarcadores, además de RE, RP y HER2, para aproximarse con mayor precisión el subtipo molecular determinado por expresión génica.

En el año 2004, Nielsen y col^[78], utilizando un panel de cuatro anticuerpos (RE, HER2, HER1 y CK5/6), observaron que existía una buena correlación entre el perfil génico y el perfil IHQ. En este estudio, la sensibilidad de la IHQ en la clasificación de estos tumores fue de un 76% y la especificidad de un 100%. Otros autores proponen la utilización de otros marcadores en la definición de los carcinomas de mama (CK14, Ki67, CK17, EGFR, c-kit, p63, P-cadherina y actina de músculo liso)^[79].

Nielsen identificó como marcadores consistentes en el subtipo basal la positividad de EGFR y CK5/6 y la negatividad de RH y HER2, alcanzando con esta aproximación y respecto a la determinación génica una sensibilidad del 100% y una especificidad del 76%. Livasy^[79] coincide en la consistencia de RH y HER2- pero añade una expresión variable de otros marcadores IHQ (CK8/18, EGFR, CK5/6).

Abd El-Rehim^[80] estudió más de 1000 casos de CM y 26 biomarcadores distintos. Este autor identificó 6 grupos de tumores que corresponden aproximadamente a los cinco subtipos moleculares intrínsecos previamente identificados, además de un pequeño grupo que constaba únicamente de 4 casos. Los subgrupos de tumores definidos en este estudio difieren significativamente en términos de la expresión de RE, RP, HER2, CK5/6, CK18, p53, MUC1, BRCA1 nuclear, y la E-cadherina.

Del mismo modo, en el caso del luminal B se ha propuesto la evaluación de la tasa de proliferación, midiendo la expresión de Ki67 como marcador subrogado de aquella, para identificar este subtipo (ya que sólo un 30% de los luminales B son HER2 positivos)^[50].

Dunkler^[81] reanalizó los datos de la cohorte empleada en la validación de Mammaprint y sus resultados mostraron que la contribución de la plataforma respecto a los parámetros clínico-patológicos fue marginal. Más recientemente, Dowsett^[82] comunicó en San Antonio Breast Cancer Symposium de 2011 la comparativa en información pronóstica entre las plataformas PAM50 y Oncotype Dx y 4 marcadores IHQ (RE, RP, HER2 y Ki67) analizando las pacientes del estudio ATAC. La información pronóstica obtenida por parámetros IHQ fue equiparable a la que el OncotypeDx ofreció.

Sin embargo los investigadores que desarrollaron PAM50, liderados por Parker^[49], sostienen que los subtipos intrínsecos moleculares fueron concebidos para ser independientes de los marcadores patológicos y mantienen que el estado de los RE y HER2 por sí solos no son verdaderos marcadores subrogados de los subtipos determinados por la expresión génica. Ellos sostienen que únicamente un 64% de los tumores que sobre-expresaban HER2 fueron designados como subtipos HER2 por la expresión génica. Nuestros resultados ilustran un mayor porcentaje de discrepancias entre ambos métodos en los subtipos HER2, luminales B y basales, siendo precisamente el primero de ellos el más discordante (82,1% de los tumores dentro de la muestra adyuvante). Esta discrepancia entre el fenotipo clínico HER2 y el subtipo molecular plantea la preocupación y el debate de si estas pacientes deben ser manejadas de acuerdo a los resultados de IHQ/FISH o por los perfiles de expresión génica.

En el año 2012 han sido publicados 3 artículos en relación a la plataforma PAM50 que merecen especial mención en este trabajo. El primero de ellos, Bastien RR^[83] y colaboradores, analizan las discrepancias entre la clasificación de los subtipos intrínsecos en el CM por IHQ con los subtipos moleculares designados por PAM50 tomando como cohorte la del estudio GEICAM 9906^[53]. Este grupo de trabajo encuentra que el análisis de los genes ESR1, PGR, ERBB2, así como otros genes de proliferación aporta mayor valor pronóstico respecto al que ofrecen los marcadores IHQ.

También en el 2012 se publica el trabajo de Chia SK et al^[84] en el que se compara el valor predictivo y pronóstico de la plataforma PAM50 respecto al panel de biomarcadores IHQ analizando una muestra de pacientes de CM participantes en un ensayo clínico (tamoxifeno Vs placebo en mujeres premenopáusicas)^[85]. Se exploran la SLE y la

SG por ambos métodos y estos autores concluyen que en el estudio MA.12 el PAM50 es muy superior a la IHQ tumoral a la hora de definir los subtipos intrínsecos, aportando no sólo un mayor valor pronóstico sino también predictivo de respuesta al tamoxifeno adyuvante.

Prat A^[86] evalúa la capacidad de 6 firmas genómicas (entre ellas las ya mencionadas Mammaprint, OncotypeDx y PAM50) de predecir la recidiva tumoral en 1380 pacientes con CM RE+ tratadas con tamoxifeno en adyuvancia. La conclusión de este trabajo, una vez más, es que las firmas genómicas predicen de una forma más exitosa la evolución de las pacientes, en este caso RE+, respecto a parámetros IHQ. Se sugiere además que en lo que todas las plataformas evaluadas coinciden es en identificar perfectamente el subtipo luminal A con ganglios negativos (hecho importantísimo pues estas pacientes se beneficiarían exclusivamente de la hormonoterapia adyuvante).

Como ya se ha comentado con antelación, la terminología de los subtipos de carcinomas mamarios determinados por IHQ ha sido adoptada a partir de estudios de expresión génica, por lo que es importante reconocer que estos términos se corresponden sólo parcialmente a las clases moleculares definidas por expresión génica. Una posible explicación a las discrepancias entre ambos métodos (como así concluyen algunos de los trabajos mencionados anteriormente) pudiera residir en algunas limitaciones de las técnicas de inmunotinción. Para evitar sesgos en futuros ensayos clínicos y valorar su efectividad predictiva sería conveniente que los anatomopatólogos unificaran criterios en la determinación IHQ de los marcadores para la clasificación del CM^[87]. Analizaremos a continuación las dificultades que se presentan con las técnicas IHQ para alcanzar esta universalización.

5.2. Crítica y limitaciones de la IHQ

La IHQ requiere una metodología de laboratorio muy distinta de la del laboratorio clásico de AP y, para su correcta utilización, es indispensable conocer en profundidad sus ventajas y limitaciones. Es fundamental disponer de una amplia batería de Ac que permita trabajar con paneles amplios protocolizados y actualizados. La elección de un panel de Ac inapropiado o excesivamente limitado puede llevar a conclusiones insuficientes o erróneas. El panel inicial de estudio debe elaborarlo el patólogo en función de la clínica y del estudio morfológico previo y, siempre que sea posible, debe incluir distintos Ac para cada una de las líneas de diferenciación que se investigan. El personal técnico y médico debe estar específicamente entrenado en el manejo y evaluación de los distintos Ac y disponer de información apropiada acerca de su sensibilidad y especificidad, del método de evaluación de resultados y de su posible trascendencia clínica. La interpretación debe efectuarse siempre conjuntamente con el contexto clínico y los hallazgos morfológicos.

Es importante conocer las posibles causas de falsos positivos y falsos negativos con los distintos Ac y seguir una sistemática escurpulosa de controles negativos y positivos en cada proceso de laboratorio. Los Ac de nueva incorporación requieren siempre un enfoque crítico y cauto en las primeras fases de utilización ya que la presunta especificidad y sensibilidad inicial puede modificarse al acumular experiencia y publicaciones.

Un aspecto elemental, pero esencial, es la preservación del tejido desde el momento de su obtención. La inmensa mayoría de técnicas de IHQ pueden aplicarse a tejido fijado e incluido en parafina con buenos resultados, siempre que la fijación tisular, su procesado e inclusión se realicen correctamente. La utilización de métodos o reactivos inapropiados en el tratamiento tisular previo a la IHQ determina pérdidas de antigenicidad que limitarán o impedirán la obtención de resultados fiables. Asimismo se ha constatado, como veremos a continuación, una cierta subjetividad por el observador que también induce a imprecisiones. Por consiguiente, esta técnica diagnóstica, utilizada de rutina en la práctica clínica diaria y con enorme peso en la toma de decisiones terapéuticas, no está exenta de errores^[87].

Es por esta problemática que en el año 2007 la Sociedad americana de Oncología Médica y el Colegio de Patólogos americanos (ASCO y CAP, respectivamente) elaboran conjuntamente unas guías de recomendación para la determinación de HER2 en la práctica clínica. Definen así los estándares de calidad y proponen un algoritmo diagnóstico en el que están implicadas tanto técnicas de inmunotinción evaluando la expresión proteica de HER2 como la valoración de la amplificación génica de HER2 mediante FISH^{[58][88]}.

La IHQ y la FISH son los métodos más utilizados para el estudio de HER2. Ambos permiten la interpretación de resultados sobre el contexto microanatómico. Con la IHQ se evalúa el grado de expresión de la proteína en la membrana celular y con FISH se evalúa el número de copias del gen en el núcleo celular para detectar su amplificación. Mientras que la IHQ está incorporada en muchos laboratorios de Patología, la técnica de FISH es menos asequible, requiere equipamiento de mayor coste y es difícil de implementar y acumular experiencia en laboratorios con bajo volumen de actividad.

La literatura de los últimos años ha proporcionado múltiples estudios comparativos entre ambos métodos con resultados variables pero, en general, el análisis comparativo de sus conclusiones es complejo por la ausencia de estandarización entre distintos ensayos, tanto en aspectos técnicos como de interpretación y confirmación de resultados.

Algunos autores han defendido la mayor fiabilidad de la técnica de FISH, pero en los ensayos clínicos se ha utilizado preferentemente IHQ y, en algunos de ellos, se han detectado importantes discordancias entre los resultados del primer laboratorio que efectuaba el test y los de un laboratorio de referencia de mayor volumen que lo repetía con posterioridad, antes de indicar el tratamiento. En un 20% de casos el primer resultado se consideró incorrecto. Esta variabilidad de resultados se atribuye a factores preanalíticos, como la fijación y el procesado tisular, analíticos, como los reactivos o los procedimientos del laboratorio, y post-analíticos, como los criterios de interpretación de resultados^{[89][90][91]}.

Con la totalidad de los datos actualmente disponibles en la literatura, no puede demostrarse superioridad de ninguno de los dos métodos respecto al otro para predecir respuesta a la terapia anti-HER2, pero sí se ha evidenciado que es esencial emplear metodología adecuadamente validada independientemente del método elegido.

Los algoritmos de decisión terapéutica consensuados y utilizados hasta la actualidad, asumiendo un alto nivel de concordancia entre IHQ y FISH no claramente justificado por la literatura disponible, recomiendan la utilización de IHQ como test primario, indicando FISH sólo en los casos de positividades intermedias, no concluyentes (2+). Los casos de alta positividad (3+) se consideran candidatos a trastuzumab y los de positividad baja (1+) o nula se informan como negativos y no se consideran susceptibles de respuesta. Estas directrices nacen de diferentes estudios y ensayos validados e intentan proporcionar unas pautas de estandarización común aunque, en la actualidad, muchas cuestiones siguen aún en debate o no están del todo aclaradas. De hecho, ASCO y CAP reconocen que en el ámbito clínico estas técnicas tienen una no despreciable tasa de error que se estima en alrededor del 20% (principalmente en forma de falsos negativos)^{[92][93]}.

5.2.1. Problemática de la determinación de los RH por IHQ

La determinación del estado de los RH es una parte esencial en el diagnóstico y tratamiento de todas las pacientes con CM, ya que entre otros aspectos, sirve para determinar si una paciente en concreto se beneficiaría de tratamiento hormonal. El *gold standard* para evaluar el estado de los RH a día de hoy es la IHQ, previo procesamiento del tejido tumoral. Se calcula que alrededor del 75% de los CM invasivos expresan RE (la gran mayoría de éstos con una localización nuclear) por lo que existe una variación enorme en el estado de estos receptores al expresarse el grado de positividad celular mediante un rango que comprende entre 0% a 100%. La importancia de este porcentaje radica en que existe una correlación positiva entre el nivel de expre-

sión de los RE y la probabilidad de la respuesta clínica a las terapias hormonales. Sin embargo se ha adoptado como punto de corte para positividad de RE el 1% de las células teñidas, a la luz de los datos obtenidos de distintos estudios en los que se demostraba un beneficio significativo con la terapia hormonal en aquellos tumores con baja expresión de RE (1-10%) frente a los que no los expresaban (RE-). Esto explica que la determinación de los RE por IHQ asocie un modesto valor predictivo positivo (30-60%) para la respuesta a un agente hormonal único^{[94][95]}.

Por otra parte, hay una considerable variación en los resultados por IHQ de la determinación de RE, ya sea por la propia técnica de inmunotinción, como por el tipo de Ac empleado y su dilución, del sistema de detección o del rescate antigénico; factores todos ellos considerados modificables y susceptibles de estandarización intra e interlaboratorio. Un segundo grupo de variables estaría integrado por factores relacionados con el proceso de fijación tisular (tipo de fijador, tiempo de fijación, método), procesamiento tisular y la preservación y expresión antigénica intrínseca de cada tejido. Estos últimos factores, de notable impacto en el resultado final, están sujetos a frecuente variación, resultando más problemática su estandarización^{[90][96]}.

El estudio NSABP B24^[97] mostró que en aquellas pacientes con RH positivos su riesgo de recaída se reducía considerablemente cuando se administraba terapia antiestrogénica, comparado con aquellas pacientes RH negativos. Aquí reside la relevancia del problema.

Un trabajo que explora esta variabilidad inter-laboratorio es el publicado por Rhodes^[90] en el año 2000. Ellos investigaron estas discrepancias en la determinación de RE por IHQ en 200 laboratorios de 26 países distintos y calcularon la tasa de falsos negativos. Las preparaciones de los tumores mamarios presentaban bajos, medios y altos niveles de expresión de RE y estas muestras se enviaron a cada uno de los centros participantes para la inmunotinción. Más del 80% de los laboratorios fueron capaces de demostrar la positividad de los RE en aquellos tumores con expresión de los mismos media y alta, pero sólo el 37% de los centros participantes detectaron los tumores con baja expresión. En conclusión, existe una considerable variabilidad inter-laboratorio, especialmente cuando se analizan tumores con baja expresión de receptores de estrógenos, estimándose la tasa de falsos negativos entre un 30% a un 60%.

Otra posible causa de estas diferencias en los resultados entre los distintos grupos de trabajo puede residir en la elección del Ac anti-RE. Aunque existen varios Ac anti-RE disponibles en el mercado, el

Ac ideal es aquel que sea robusto y fácil de utilizar y clínicamente validado. Fundamentalmente se utilizan 3 Ac: 1D5, 6F11 y SP113, que han reportado correlación con la evolución clínica de las pacientes. Sin embargo, algunos datos apuntan a que el Ac monoclonal SP1 de conejo identificaría con mayor probabilidad aquellas pacientes que responderían mejor al Tamoxifeno frente al clon 1D5^[98].

Dramáticas son también las variaciones de resultados dentro de un mismo laboratorio. Así también se ha estudiado el efecto que provoca la duración de la fijación con formalina en la determinación de RH por IHQ. 24 muestras de tumores de mama fuertemente positivas para RE fueron sometidas a distintos tiempos de fijación en formalina (3, 6, 8 o más de 8 horas de procesamiento). Goldstein^[99] con este experimento demostró que se requieren al menos 6-8 horas de fijación de las muestras obtenidas por biopsia para conseguir una determinación fidedigna de los RH. La fijación por debajo de los tiempos establecidos se traducirá en mayor riesgo de falsos negativos para RE.

5.2.2. Problemática con la determinación de Her2/neu por IHQ

Otro elemento esencial en el estudio del CM, especialmente en casos de enfermedad avanzada, es el estado del oncogen HER2/neu que se estudia con técnicas de IHQ y FISH. Además del valor pronóstico, el receptor de membrana codificado por este oncogen es diana terapéutica para determinadas moléculas dirigidas como es el caso del trastuzumab, cuando se demuestra la amplificación de HER2 con las técnicas moleculares. El tratamiento adyuvante con terapia anti-diana HER2 (trastuzumab) ha demostrado reducir el riesgo de recurrencia a la mitad y a un tercio la mortalidad en pacientes con estadios precoces de CM HER2+^{[100][101]}.

La IHQ del HER2 plantea desafíos incluso mayores a los ya comentados con los RH: tanto por la precisión de la técnica como por la evaluación semi-cuantitativa de los resultados que dificultan la tarea. Factores que interfieren en la homogeneidad de los resultados ya se han comentado con la problemática anterior como son la fijación de los tejidos, la elección de Ac, y la determinación de los puntos de corte para la positividad del HER2.

5.2.2.1 Concordancia entre ambos métodos: IHQ y FISH

A pesar de la estrecha asociación que existe en el CM HER2+ entre la amplificación del gen HER2 y la sobre-expresión de la proteína, son muchas las publicaciones que han explorado este respecto. Así Press^[102] demostró en su trabajo que la determinación IHQ en tejido desparafinado y fijado en formalina puede ser bastante variable en su habilidad de identificar las amplificaciones de HER2 en el tumor.

Otros autores, como Yamauch^{i[103]} o Yaziji^[93], concluyen en sus trabajos que cuando se realiza la técnica diagnóstica adecuadamente existe una fuerte correlación entre IHQ y FISH, y ambas serían equivalentes (y algunas veces complementarias) en la práctica clínica.

No está claro si las discordancias entre ambos métodos pueden reflejar diferencias biológicas de los tumores o si son el resultado de un artefacto (variaciones preanálisis o del procesamiento). A este respecto, varias hipótesis se han propuesto para explicar estas divergencias: defectos en la fijación de la muestra, polisomía para el cromosoma 17, la subjetividad y la reproducibilidad de los criterios de puntuación, y las muy diversas sensibilidades y especificidades de los Ac utilizados para la detección IHQ de HER2^{[91][102][104]}.

5.2.3. Concordancia entre laboratorios

Los resultados de la determinación de HER2 debe ser fiables, coherentes y universales de modo que las comparaciones se puedan hacer entre distintas instituciones y laboratorios. Estudios recientes apuntan a niveles de discordancia altos entre los resultados obtenidos por laboratorios pequeños respecto a los centros de referencia. Las tasas de discordancia pueden incluso llegar a alcanzar el 20%, sobre todo en laboratorios locales, con bajo volumen de actividad; mientras, en laboratorios centrales, con mayor número de determinaciones mensuales, este porcentaje se cree mucho menor.

Estudio interesante el NSABP B-31^[105] donde uno de sus objetivos principales era evaluar la concordancia de la determinación de HER2 entre laboratorios locales y centrales. Una puntuación del Hercep-Test de 3+ y la amplificación del gen por FISH fueron los dos criterios de inclusión aceptables para la participación en el estudio. Una revisión central de los 104 primeros casos incluidos en el estudio en base a sus resultados IHQ mostraron que de todos ellos, 82 resultaron HER2+ con 3+ por HercepTest (21,2% discordancia); 82 de 104 casos fueron también designados por PathVysion como FISH+ (21,2% discordancia). Lo llamativo de estos datos es que las discrepancias entre laboratorios de alto volumen (definidos como aquellos con más de 100 determinaciones mensuales) y laboratorios más modestos fueron prácticamente las mismas.

Un análisis similar se realizó en las primeras 119 muestras de pacientes incluidas en el ensayo clínico del NCCTG N9831. Este estudio demostró resultados muy similares, con una tasa de discordancia del 26% entre laboratorios locales y el central^[106].

En la tabla que se muestra a continuación se recogen las principales características para cada una de las plataformas diagnósticas (pronósticas y/o predictivas) en el CM.

Tabla 14. Comparativa entre las diferentes plataformas pronósticas en CM. Tabla modificada de Ross JS et al *“Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast Cancer” Oncologist 2008 May;13(5):477-93.*

	IHQ	FISH	RT-PCR	Microarrays
Material requerido	FFPE	FFPE	FFPE o tejido fresco	Tejido fresco
Información morfológica	SI	SI	NO	NO
Nº de genes testados	Bajo	Bajo	Intermedio	Alto
Tipo de medida	Semi-cuantitativa	Semi-cuantitativa	Cuantitativa	Cuantitativa
Complejidad del cálculo estadístico	Baja	Baja	Intermedia	Alta
Habilidad de explorar varias vías moleculares simultáneamente	Baja	Baja	Intermedia	Alta
Valor pronóstico	Establecido	Establecido	Establecido	Establecido
Predicción de respuesta a terapia hormonal	Establecido y en práctica clínica	Establecido y en práctica clínica	Establecido pero no de uso rutinario	Establecido pero no de uso rutinario
Predicción de respuesta a terapia anti-Her2	Establecido y en práctica clínica	Establecido y en práctica clínica	Establecido pero no de uso rutinario	Establecido pero no de uso rutinario
Predicción de respuesta a quimioterapia	No establecido	No establecido	Establecido y en práctica clínica	Establecido pero no de uso rutinario
Coste económico	Bajo (80-300€)	Bajo (200-500€)	Muy alto (2500€ o más)	Muy alto (2500€ o más)
Dificultad de estandarización	Baja	Baja	Intermedia	Alta
Dificultad de automatización	Baja	Baja	Intermedia	Alta

5.3. Incorporación de los perfiles moleculares a la práctica clínica rutinaria: ¿realidad o ficción?

Como se ha comentado en la introducción, el CM es una entidad heterogénea y reviste una enorme variedad de comportamientos clínicos muy distintos. Así, el tipo histológico, el grado nuclear, el tamaño tumoral, el status ganglionar y el estado de los RH, nos han servido durante décadas como apoyo en la toma de decisiones tanto para la administración de tratamiento citotóxico como para predecir la evolución de un grupo de pacientes con similares características. Estas variables clínico-patológicas clásicas han sido combinadas en la práctica clínica dentro de modelos predictivos multivariados como son el Nottingham Prognostic Index o el Adjuvant!Online, entre otros, para

estas decisiones^{[26][107][108]}. Sin embargo, la sustancial variabilidad en el curso clínico, dentro de categorías de riesgo similares, podría estar justificada por las diferencias moleculares de los tumores. Recientemente, y gracias a la proteómica, los perfiles de expresión génica y el desarrollo de numerosas plataformas genómicas se van explorando estas nuevas herramientas e incluyendo poco a poco en el quehacer diario del oncólogo^[109].

Estudios recientes utilizando esta nueva tecnología de microarrays indican que la progresión de un tumor primario a metastático estaría predefinida ya en el tumor inicial mediante la propia expresión génica. Las teorías clásicas de la evolución natural y desarrollo de metástasis abogaban por la adquisición secuencial de cambios fenotípicos que permitían la invasión, diseminación y colonización a distancia. La activación de un único gen podría ser suficiente para desencadenar el proceso metastásico y, en general, la progresión del CM no está acompañada de grandes cambios a nivel de expresión génica^[110].

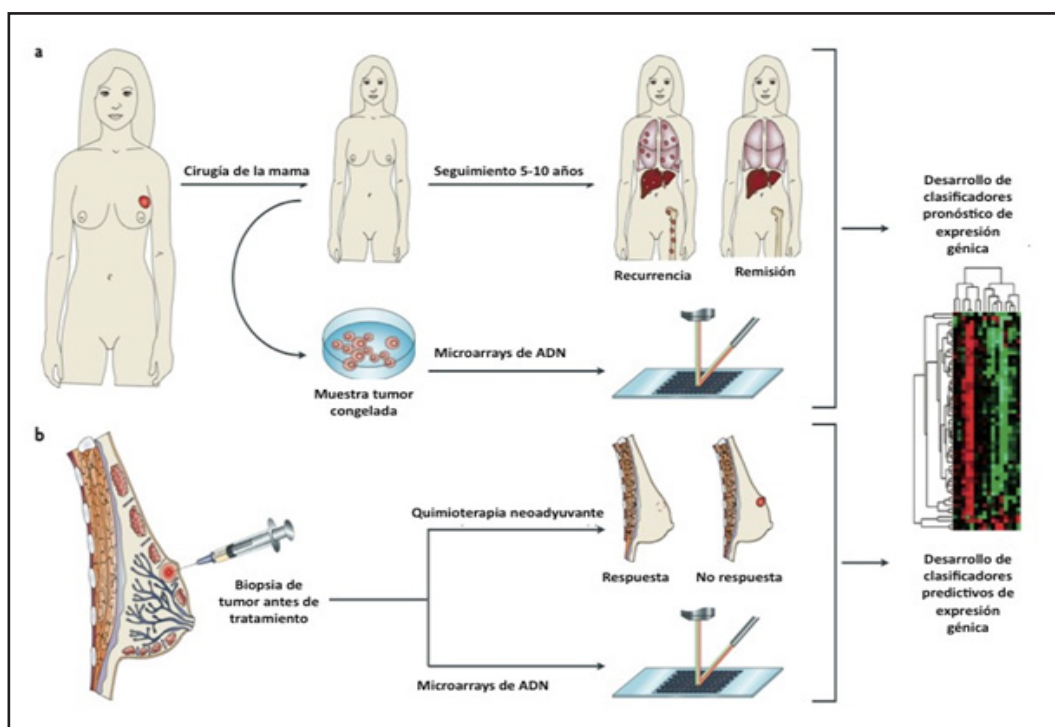


Figura 12. Esquema modificado de Sotiriou C and Piccart MJ. *Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care?*, en el que se muestra el proceso de creación de una plataforma genómica con utilidad pronóstica (a) o predictiva (b).

Entre todas las firmas génicas pronósticas en el área del CM, las 3 plataformas moleculares actualmente disponibles en el mercado para la toma de decisiones clínicas son el 21-gene assay (Oncotype DX, Genomic Health, USA) el 70-gene-signature de van't Veer (MammaPrint, Agendia, Netherlands), y la versión clínica actualizada de los subtipos intrínsecos (PAM50, NanoString, USA) en fases de validación con resultados esperados en 2013. Se hará un breve recorrido histórico por el desarrollo de cada una de estas plataformas de expresión génica.

En el año 2002, Van't Veer y colaboradores^[46], dentro del Nederlands Kanker Instituut (NKI), y aplicando un método supervisado, buscaron identificar una firma de expresión génica capaz de predecir un intervalo corto de producción de metástasis en una cohorte de pacientes con CM. Para ello seleccionaron un grupo de 78 pacientes jóvenes afectas de CM, menores de 55 años, ganglios negativos y cuyo tumor era de menos de 5 cm de diámetro máximo en el momento del diagnóstico, no habiendo recibido tratamiento sistémico alguno. De ellas, 34 habían desarrollado metástasis distantes en 5 años y 44 permanecieron libres de enfermedad durante ese periodo. Se analizaron más de 25.000 genes candidatos con microarrays de ADNc, encontrándose 231 genes relacionados de manera significativa con las metastatización. Posteriormente pudieron reducir el número de genes a 70 y crearon así una plataforma genética, hoy conocida como Firma de Ámsterdam o MammaPrint, capaz de clasificar correctamente en grupos con alto o bajo riesgo de desarrollar metástasis en 5 años (según un coeficiente de correlación estimado por los niveles de expresión de estos 70 genes seleccionados y una media de los perfiles "de buen pronóstico", clasificando como de pobre pronóstico aquellas por debajo de 0,4). Demostraron que, aunque el perfil de expresión podría identificar correctamente pacientes que pudieran necesitar quimioterapia adyuvante, podría reducir la proporción de pacientes que no necesitarían quimioterapia complementaria en aproximadamente un 30%.

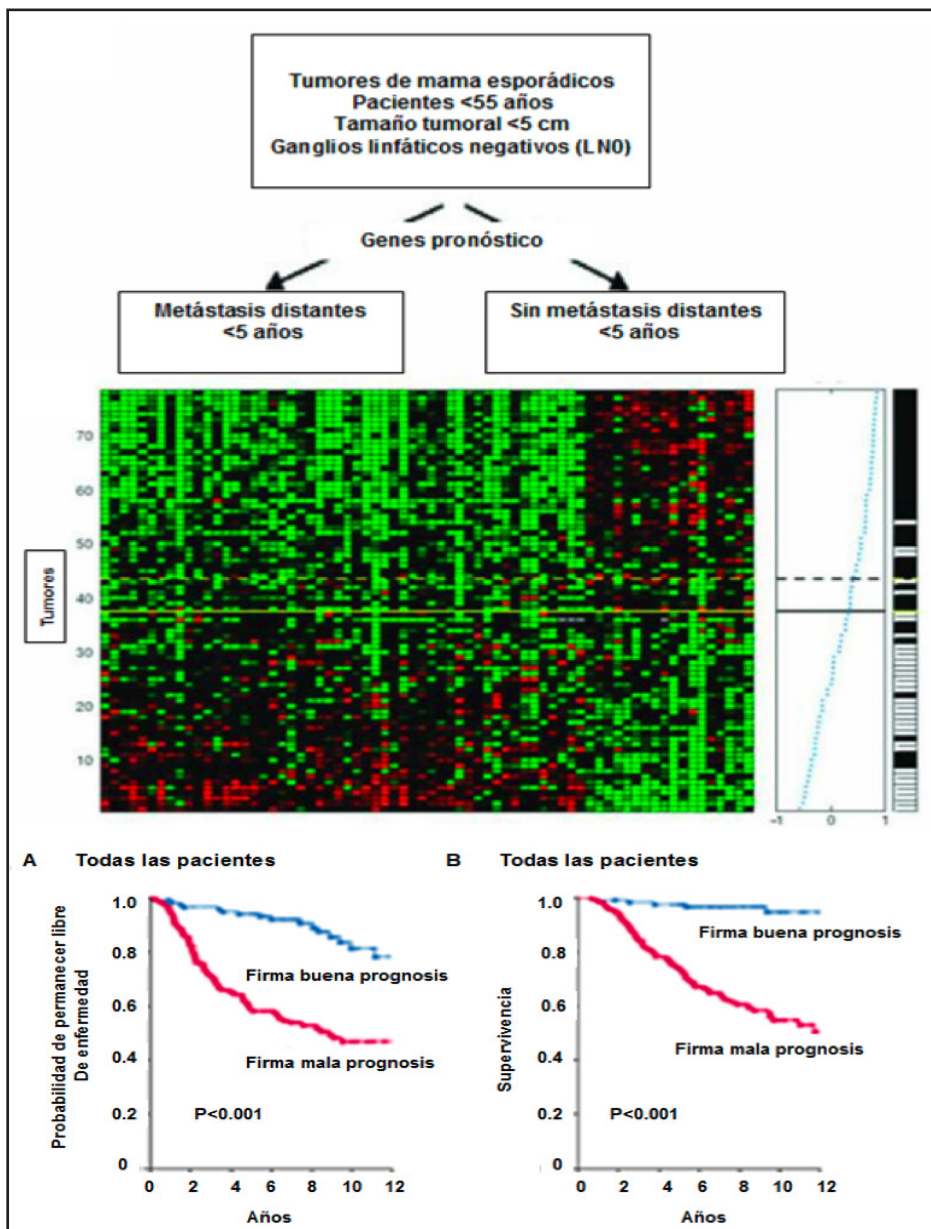


Figura 13. Distinción en tumores de buen y mal pronóstico de acuerdo con el análisis supervisado de la expresión génica. Esta plataforma distingue entre muestras asociadas a mal pronóstico (parte superior del cluster) de las que revisten un pronóstico más óptimo (zona inferior). La presencia de metástasis a distancia se ilustra en el gráfico de su derecha, siendo positivo en color negro. En las gráficas inferiores se ilustra la SLE y SG de acuerdo con la clasificación de buen (azul) o mal pronóstico (rosa).

El mismo grupo holandés, con Van de Vijver a la cabeza^[111], para validar la potencia pronóstica de esta plataforma, calcularon la probabilidad de supervivencia libre de metástasis en 295 pacientes con CM con y sin afectación ganglionar, tanto con receptores hormonales positivos como negativos de acuerdo con la *firma de Ámsterdam*. Con esta firma genética se separaron claramente las pacientes en 2 grupos: uno de ellos con pacientes con un excelente pronóstico a 10 años (con una supervivencia libre de metástasis a distancia del 85%) de un gru-

po con un alto riesgo de recaída del 50%. Pero además, los autores compararon estos cálculos con estimaciones basadas en los criterios pronóstico estándar, prediciendo de un modo más eficaz el riesgo de metástasis a corto plazo que los criterios consenso de St. Gallen y del NIH, basados en características clínicas y patológicas de las pacientes. Estos resultados eran independientes de la edad, tamaño tumoral, número de ganglios positivos y grado histológico.

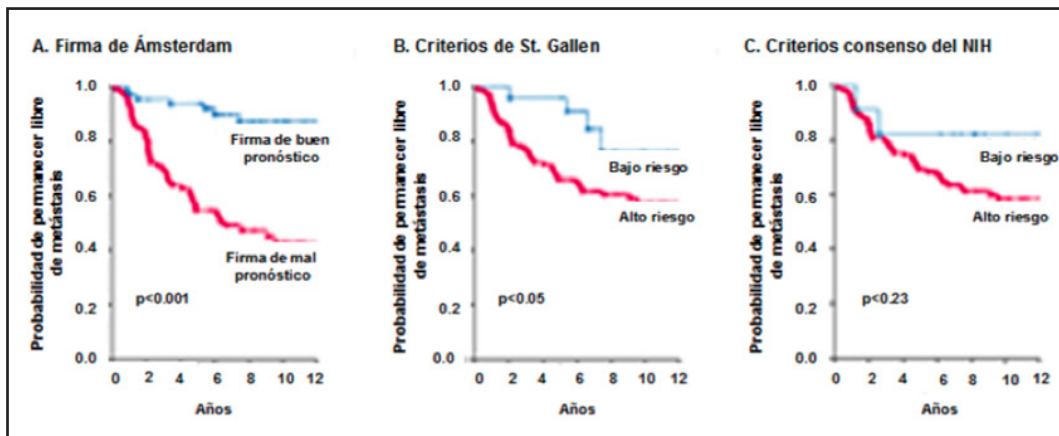


Figura 14. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de metástasis en 151 pacientes con cáncer mamario según las estimaciones de la firma de Amsterdam (A), los criterios de St. Gallen (B) y el consenso del NIH (C).

Mook^[112], en 2004, lleva a cabo el segundo estudio de validación, externa y multicéntrica, para esta plataforma bajo el auspicio del consorcio TRANSBIG (Translating molecular knowledge into early breast cancer management: building on the Breast International Group (BIG) network for improved treatment tailoring). En este caso se analizó tejido tumoral mamario de 302 pacientes de diferentes instituciones europeas, menores de 60 años, con tumores T1 o T2, que no recibieron tratamiento complementario, y de las que se disponía información clínica hasta 10 años después del diagnóstico. La firma genética de los 70 genes demostró ser altamente pronóstica prediciendo tanto el riesgo de metástasis como la supervivencia, superando a los paneles de criterios clásicos.

Recientemente, también se ha validado el perfil de 70 genes en una población de 241 pacientes operadas, con tumores mamarios T1-3, con 1-3 ganglios positivos, y un seguimiento medio de 8 años. Un 53% había recibido quimioterapia adyuvante y el 64% hormonoterapia complementaria. El perfil de 70 genes era capaz de identificar un nutrido grupo de pacientes (99/241, un 41%) con un excelente pronóstico en el que se podría prescindir de la quimioterapia adyuvante con garantías.

Gracias a la utilización de la RT-PCR en tejidos parafinados de CM, Oncotype DX es capaz de determinar la expresión de 16 relacionados con cáncer y 5 de referencia^[42]. Este conjunto de genes pronósticos (de los 250 genes pre-seleccionados) fueron identificados de muestras tumorales de 447 pacientes pertenecientes a tres estudios independientes de largo seguimiento; incluyendo 233 pacientes tratadas con tamoxifeno en el estudio NSABP B-20, donde se comparaba la adyuvancia con Tamoxifeno Vs placebo en cánceres con ganglios negativos y RH positivos. Además, 78 muestras eran consideradas de alto riesgo por ≥ 10 ganglios negativos, y 136 como bajo riesgo^{[43][44]}. El panel de genes cáncer-relacionados incluye 5 genes en el grupo de proliferación, 2 en el grupo de HER2, 4 en el de los RE, 2 en el grupo de invasión, y 3 no asociados a grupo, además de los 5 de referencia. El resultado se expresa como una puntuación de riesgo de recaída, con un rango desde 0 hasta 100, y una clasificación en riesgo de recidiva bajo, intermedio o alto en función de dicha puntuación.

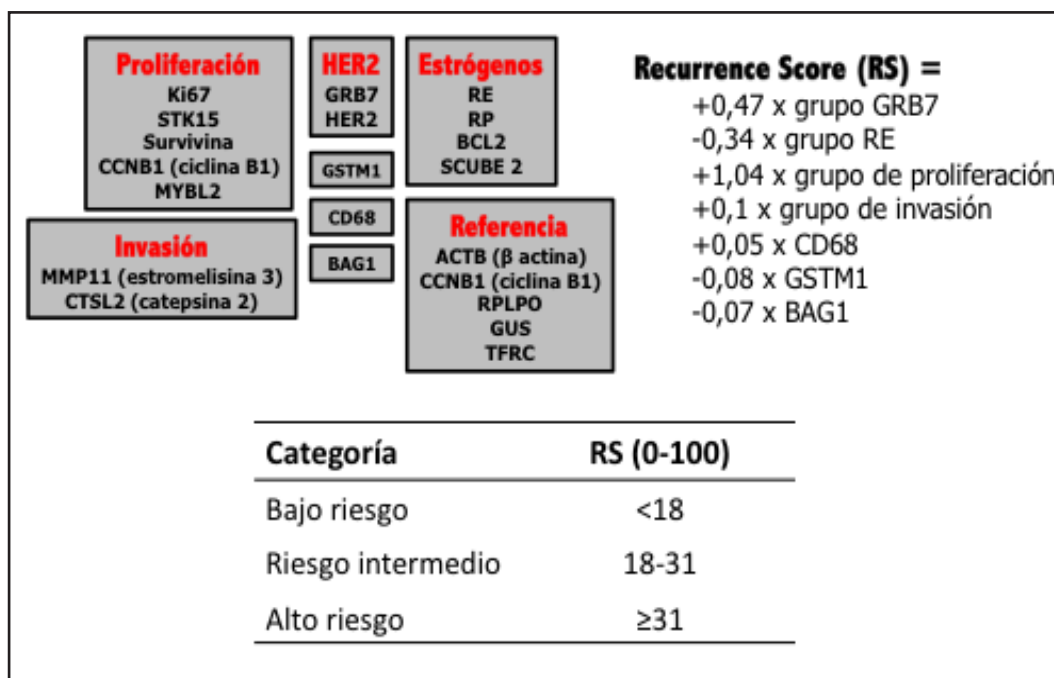


Figura 15. *Oncotype DX Gene Recurrence Score Assay.* Gracias al análisis de 21 genes (16 en relación con el tumor y 5 genes de referencia) se obtiene una puntuación continua de 0 a 100 que estratifica a las paciente con CM en bajo, intermedio y alto riesgo de recaída.

Los porcentajes de pacientes asignados a grupo de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto fueron 51%, 22%, y 27%, respectivamente. La curva de Kaplan–Meier estimaba la tasa de recurrencia a distancia a 10 años en 6,8% [95% CI, 4,0–9,6%] en el grupo de bajo riesgo; 14,3% [95% CI, 8,3–20,3%] en el intermedio; y 30,5% [95% CI, 23,6–37,4%] en el grupo de alto riesgo.

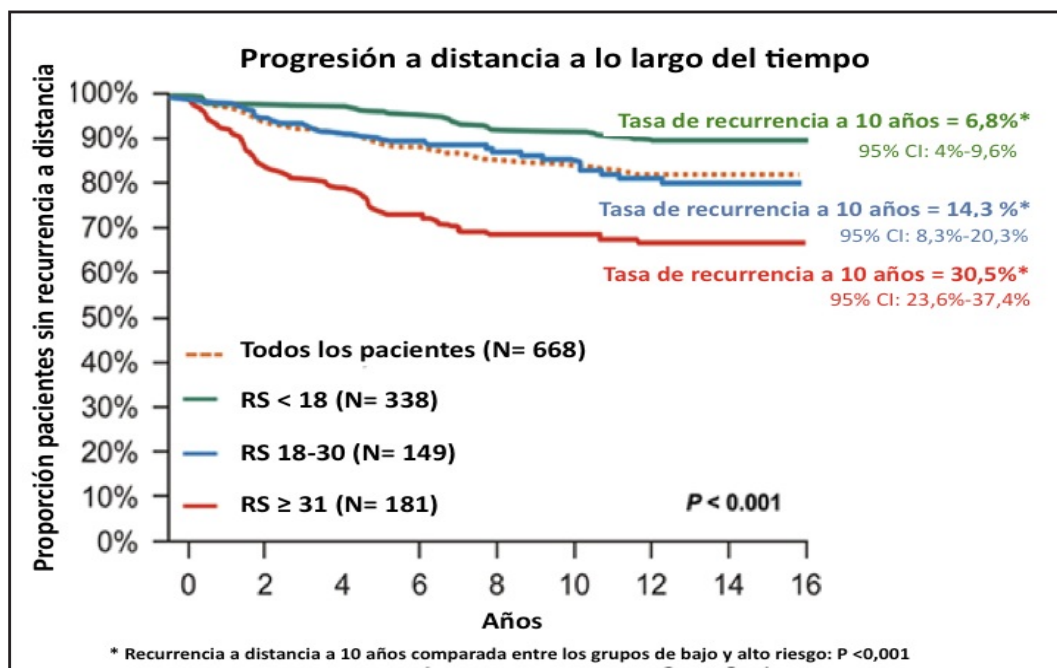


Figura 16. Análisis de Kaplan-Meier que ilustra la tasa de recurrencia a distancia a 10 años en los 3 grupos de riesgo de las pacientes con CM estratificados por *Oncotype DX Gene Recurrence Score Assay*.

Para evaluar el poder pronóstico de esta firma, Habel et al.^[113], llevaron a cabo un estudio de casos-controles utilizando muestras de 4.964 pacientes del registro de tumores Kaiser Permanente del norte de California. Se seleccionaron pacientes con CM diagnosticadas entre 1985 y 1994 que no hubieran sido tratadas con quimioterapia, sin afectación ganglionar, y siendo menores de 75 años. Los 220 casos consistían en pacientes que habían fallecido a causa del CM. Los 570 controles fueron individualmente emparejados a los casos por su edad, raza y origen y tratamiento adyuvante, y eran individuos que estaban vivos. El riesgo relativo de muerte en las pacientes RE positivo que recibieron tamoxifeno era 2,8% en el grupo de bajo riesgo, 10,7% en el grupo de riesgo intermedio y 15,5% en el grupo de alto riesgo, mientras que en las pacientes no tratadas con tamoxifeno el riesgo de muerte era de 6,2, 17,8 y 19,9%, respectivamente. Estos resultados avalaban el papel predictor de recurrencia de Oncotype DX en pacientes con CM con ganglios negativos y RH positivos.

Esteva^[114] evaluó con la aplicación de Oncotype DX una población de 149 enfermas de CM, estadios I-IIA, con independencia del status de RH (69% eran RH positivos) intervenidas entre 1978 y 1995 en el MD Anderson Cancer Center, que no habían recibido tratamiento adyuvante, seguidas durante al menos 5 años y de las que se disponía de tejido tumoral. En este heterogéneo grupo, en cuanto a RH se refiere,

el RS no fue predictivo de recurrencia metastásica en estas mujeres. No obstante, otros factores de riesgo tradicionales como el grado tumoral, el tamaño tumoral y la edad, tampoco se correlacionaban con la SLE. Entre las posibles justificaciones a este estudio negativo podría estar la participación de una única institución (mayor posibilidad de sesgos de selección) y el incluir RE negativos.

El valor pronóstico de Oncotype Dx en CM ganglios negativos y RH positivos queda así demostrado en los estudios comentados con anterioridad. En este sentido, existen también trabajos que investigan acerca del papel pronóstico en otros escenarios, como es el caso de axila positiva. De forma reciente, se han comunicado los resultados del estudio del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) SWOG 8814/INT0100 que analizaba 367 pacientes, ganglios y RE positivos^[115]. Estas se aleatorizaban a recibir tratamiento adyuvante con tamoxifeno (148 pacientes) o a quimioterapia con esquema FAC y tamoxifeno secuencial (219 pacientes). La SLE a 10 años era del 60%, 49% y 43% en pacientes para bajo, intermedio y alto riesgo, respectivamente. El RS demostró ser un factor pronóstico en pacientes con ganglios positivos tratadas con tamoxifeno, tanto para SLE como para SG a 10 años.

Otro estudio, el transATAC^[82], publicado recientemente, explora la utilidad pronóstica de la plataforma en pacientes RH positivos e independencia de status ganglionar, tratadas con Tamoxifeno o Inhibidor de la Aromatasa (IA). En este trabajo sí que se encontró una significación pronóstica en cuanto a recurrencia a distancia tanto en ganglios positivos como negativos; sin embargo, no fue predictor de beneficio para las distintas modalidades de hormonoterapia. El grupo de bajo riesgo para ganglios positivos estaba claramente asociado a un mejor pronóstico comparado con el grupo de alto riesgo (83% Vs 51% libre de metástasis a los 9 años; HR, 2.7; P<,001). El riesgo de metástasis aumentaba según lo hacían los ganglios axilares; así al comparar la axilar negativa con 1-3 ganglios positivos, el riesgo de metástasis era mayor, siendo enorme la diferencia a partir de 4 ganglios afectados.

En el año 2010, un meta-análisis con 1.735 pacientes provenientes de los estudios NSABP B-14 y transATAC propone una nueva herramienta integradora, basada en Oncotype Dx, de características clínicas y patológicas suplementando el RS y, porqué no, disminuyendo así el número de pacientes englobados en el riesgo intermedio. Sin embargo, esta nueva herramienta no tiene utilidad predictiva del beneficio de la quimioterapia en el CM precoz^[116].

Como ya hemos comentado, y haciendo un poco de historia en la andadura del desarrollo de las firmas genómicas, fue Perou y sus colaboradores^[32], en el año 2000, quienes reportaron su Firma Intrínseca a partir de evaluación de diferencias génicas en 65 muestras de 42 mujeres con CM usando técnicas de microarrays de ADN y representando más de 8.000 genes humanos. Este grupo hipotetizaba que el CM comprendía diferentes entidades con expresión génica distinta según la célula originaria de la que provinieran. Del panel génico inicial de 534 genes, gracias a técnicas de microarrays y RT-PCR, en 2009, Parker^[49] simplifica a 50 genes esta plataforma, con 10 genes seleccionados para cada uno de los centroides utilizados para definir los 4 subtipos moleculares (luminales A y B, basales, HER2), más una quinta categoría definida como normal, indicadora de que la muestra tenía insuficiente material para permitir esta clasificación tan precisa.

ACTB	ACTR3B	ANLN	BAG1	BCL2
BIRC5	BLVRA	CCNB1	CCNE1	CDC20
CDC6	CDCA1	CDH3	CENPF	CEP55
CXXC5	EGFR	ERBB2	ESR1	EXO1
FGFR4	FOXA1	FOXC1	GPR160	GRB7
KIF2C	KNTC2	KRT14	KRT17	KRT5
MAPT	MDM2	MELK	MIA	MKI67
MLPH	MMP11	MRPL19	MYBL2	MYC
NAT1	ORC6L	PGR	PHGDH	PSMC4
PTTG1	RPLP0	RRM2	SF3A1	SFRP1
SLC39A6	TMEM45B	TYMS	UBE2C	UBE2T
Genes control		Genes de proliferación		Genes luminales

Figura 17. Cuadro en el que se muestra el set de genes que conforman la plataforma PAM50. Modificada de <http://www.aruplab.com/Lab-Tests/GeneralOncology/PAM50/index.jsp>.

Proporciona una puntuación de riesgo de recurrencia (ROR) continua, basándose en la similitud de 189 muestras individuales de subtipos prototipos. Se demostró su poder pronóstico en 761 pacientes, todas ellas sin tratamiento, además de que en 133 de ellas se evaluó la predicción de obtención de RPC a regímenes con taxanos o antraciclinas. Así la clasificación de los subtipos moleculares designados por el PAM50 mostraba una significación pronóstica en el análisis multivariado por lo que podría incorporarse a los llamados parámetros clásicos (status hormonal, grado histológico, tamaño tumoral y status ganglionar). Se construyó un modelo pronóstico para ganglios negativos usando los subtipos intrínsecos y la información clínica. El C-index (combinación de la información clínica y la que aportaba la cla-

sificación intrínseca de los subtipos) revestía una mejora en cuanto a la potencia pronóstica si se comparaba con cada una de las dos anteriores por separado. PAM50 fue también capaz de predecir la eficacia de la neoadyuvancia con un valor predictivo negativo del 97%.

En ASCO de 2009 se comunican en forma de póster los datos de la significación pronóstica de la utilización de PAM50 en mujeres RH positivos en tratamiento únicamente con Tamoxifeno^[117]. De las 811 muestras, 786 obtuvieron una excelente caracterización molecular. Los autores concluyen que PAM50 es altamente pronóstica en paciente con RH positivos tratados con Tamoxifeno y que esta plataforma es superior a la IHQ y factores pronósticos clínico-patológicos en ese grupo de paciente, pudiéndose considerar un posible nuevo *gold standard*.

Recientemente, Ebbert^[118], ha publicado un estudio para validar esta plataforma. Para ello, extrajeron el ADNc posteriormente amplificado por PCR de 171 muestras de CM (155 invasivos y 16 tejido mamario "normal") y se aplicó el set génico prototípico para cada subtipo dentro de la plataforma. PAM50 es altamente reproducible tanto dentro como a través de otras plataformas génicas (91,6% y 88,1% de concordancia, respectivamente) y válido con independencia del estado hormonal (RH+/-) y del estadio tumoral.

En otro estudio, muestras provenientes del ensayo ATAC fueron analizadas para comparar las puntuaciones ROR PAM50 y la SLMD con los resultados obtenidos de Oncotype DX assay e IHQ4, un set de 4 marcadores IHQ desarrollado por investigadores independientes al estudio (RE, RP, HER2 y Ki67). Dowsett y colaboradores comunicaron que PAM50 asignó a más mujeres como grupo de alto riesgo y menor número en el de riesgo intermedio, al compararlo con la asignación hecha por Oncotype DX. El PAM50-ROR score también predijo la SLMD a 10 años y añadió más información pronóstica sobre el riesgo de metástasis a distancia que lo que se obtiene con las variables clínicas clásicas en todas las pacientes ($p < 0,0001$). Sin embargo, de este trabajo se extrae que el PAM50 no tiene validez predictiva acerca del beneficio de las pacientes a un determinado régimen quimioterápico. Un aspecto importante de este trabajo de Dowsett es que los resultados del análisis comparativo de IHC4 no han sido todavía presentados. La consistencia de los resultados (tanto la puntuación del riesgo por ROR como la clasificación molecular del CM que aporta el PAM50 con sus implicaciones pronósticas a 10 años) hace pensar que en el futuro inmediato se inicien estudios de validación para sentar el papel de esta plataforma como una herramienta útil para los oncólogos a la hora de tomar decisiones clínicas en mujeres con CM en estadios precoces.

Tabla 15. Comparativa entre las diferentes plataformas pronósticas en CM disponibles en la práctica clínica. Tabla elaborada a partir de las referencias citadas en el texto. Abreviaturas: *FFPE: tejido fijado en formalina y embebido en parafina (siglas en inglés de Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded)*; *NA. no applicable*; *NCCN: National Comprehensive Cancer Network*; *ASCO: American Society of Clinical Oncology*; *FDA: Food and Drug Administration*.

	Oncotype Dx	MammaPrint	PAM50-ROR
Tipo plataforma	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR
Compañía impulsora	Genomic Health (Redwood City, Calif)	Agendia BV (Amsterdam)	NanoString Technologies (Seattle)
Material requerido para el análisis	FFPE	Tejido fresco o FFPE	Tejido fresco o FFPE
Características principales	Firma de 21 genes (16 genes tumorales y 5 de referencia); proporciona puntuación continua que estratifica a las pacientes según riesgo de recaída a 10 años	Firma de 70 genes; discrimina entre pacientes de buen y mal pronóstico	Plataforma de 50 genes (más 5 genes de referencia); proporciona el riesgo de recaída (ROR) a 10 años de las pacientes
Datos de interés	Incluido en las guías ASCO y NCCN	Aprobado por la FDA	Obtenido en Septiembre de 2012 el CE Europeo para su comercialización
Coste económico	3.201€	2.675€	NA
Estudios prospectivos de validación	TAILORx	MINDACT	NA

Una segunda generación de plataformas multigénicas pronósticas, basadas por ejemplo en la respuesta inmune del huésped o el microambiente tumoral está en camino (todavía no han sido comercializadas y están en fase de validación externa). En el ámbito de la predicción de respuesta basándose en la carga génica del tumor es, a pesar de multitud de estudios translacionales, un paso más allá que dista aún para su implantación en la práctica clínica.

En los últimos 12 años, tras la primera publicación en la revista Nature de un estudio basado en la expresión génica del CM, se nos ha brindado la posibilidad de conocer mejor la valiosa información que portan los genes en los tumores y obtener rendimiento de ello con terapias dirigidas o discerniendo mejor aquellas pacientes de alto riesgo de recaída. Nuevas tecnologías como la proteómica y la epigenética, las técnicas de secuenciación masiva o el estudio de las células circulantes de tumor como parte fundamental involucrada en el proceso de la metástasis están cobrando un mayor interés en investigación.

Un hito en el mejor entendimiento del CM que merece un párrafo aparte es la reciente decodificación completa del genoma de los tumores mamarios. Un equipo de científicos, integrantes del Proyecto del Genoma Humano Atlas han trabajado en la caracterización genética de 800 tumores mamarios, revelando multitud de mutaciones somáticas como causa de las formas más frecuentes de CM y proporcionando las claves para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Estos hallazgos, que nos acercan al conocimiento íntegro de los mecanismos involucrados detrás de cada subtipo molecular, han sido publicados en la versión online de la revista Nature, el pasado 23 de Septiembre de 2012. Los investigadores, incluyendo un vasto grupo de la Universidad de North Carolina en Chapel Hill (USA), analizaron los tumores mediante 2 aproximaciones: la innovadora tecnología de análisis genómico y la clasificación ofrecida por la plataforma PAM50 en los 4 subtipos moleculares: Luminal A y B, HER2 y basal. Ambos métodos obtuvieron las mismas conclusiones: a pesar de la diversidad genética del CM, 4 subtipos principales son observados. Este descubrimiento y esta nueva tecnología abren nuevos horizontes para la próxima década en la investigación oncológica y, más concretamente, en el CM^[28].

5.4. Biología de los subtipos moleculares del CM y sus características clínicas

Se ha estado comentando en anteriores apartados la importancia vital de clasificar correctamente el tumor mamario dentro de los diferentes subtipos de expresión génica que conocemos en la actualidad. En este epígrafe pasaremos a describir cada uno de los subtipos moleculares atendiendo a su biología y características clínicas propias, gracias a una revisión sistemática de la literatura al respecto^[33].

Subtipos luminales

La mayoría de los CM son RE+ y, de acuerdo con los patrones de expresión génica, se clasifican en el *subtipo luminal*, llamados así porque tienen un patrón de expresión génica que recuerda al componente epitelial luminal de las células mamarias^[32]. Estos tumores se caracterizan por la expresión de RE, RP y genes relacionados con la activación de los RE como son LIV1, TFF1/pS2, y Ciclina D1, así como la expresión de CK luminales 7, 8 y 18 (de bajo peso molecular), expresión génica semejante al epitelio luminal de los conductos mamarios^[119].

Los tumores luminales son generalmente de bajo grado y, en menos del 20% de ellos se encuentran mutaciones del p53^{[74][119][120]}. Los subtipos luminales son de buen pronóstico. Varios estudios han reportado que los tumores RE+ responden poco a la quimioterapia conven-

cional. Se ha demostrado que los pacientes con tumores RE- tienen más RPC a la quimioterapia neoadyuvante que los RE+. Los tumores luminales tienen 6 % de RPC a la quimioterapia primaria, contrario al 45 % en los subtipos basal y HER2+.

Dentro del amplio y diverso grupo luminal, al menos se han descrito 2 subtipos, Luminal A y Luminal B, habiendo diferencias notables entre estos 2 subgrupos, aunque en ocasiones diferenciarlos en función de la expresión génica es complicado. Así, por ejemplo, el subtipo luminal A (que representa, según distintas series, aproximadamente el 40% de todos los CM)^[121] por lo general tiene una alta expresión de RE y genes reguladores de RE, así como baja expresión de la agrupación de genes HER2 y genes relacionados con la proliferación tumoral, incluyendo el Ki-67^{[74][122]}. Estos tumores luminales A suelen tener mejor pronóstico que el resto de los otros subtipos de CM^{[74][75][119][123]}, incluso que el luminal B. En cuanto al punto de vista de la IHQ, el perfil luminal A se define como RE y/o RP muy positivos, HER2 negativo y Ki-67 bajo (dependiendo del punto de corte para el índice de proliferación tomado como tal), se encuentra alrededor de 14%, aunque éste varía según las publicaciones^{[124][125]}.

Por el contrario, el otro gran subgrupo dentro de los luminales es el denominado Luminal B. Este subgrupo es algo menos común, según la literatura (aproximadamente entre el 10-20%). Los tumores luminales B tienen mayor tendencia a presentar altos índices de proliferación, asocian con mayor frecuencia mutaciones en p53 y, en general, muestran menor expresión de genes reguladores para receptores hormonales, expresión variable de la agrupación de HER2 y una mayor expresión de genes de proliferación. Los tumores Luminal B, tienen un pronóstico peor que los tumores luminal A^[23].

Desde el punto de vista IHQ, es el que peor se define, ya que engloba en una misma categoría 2 posibilidades con denominador común y que todavía hoy es motivo de controversia: en principio tendrían receptores hormonales positivos pero con bajos niveles de receptores de estrógenos y progesterona y, o bien HER2 sobre-expresado con independencia del índice de proliferación o HER2 negativo y Ki-67 alto^{[23][126][127]}.

En la actualidad, en la práctica clínica no disponemos de una plataforma de expresión génica capaz de identificar entre estas 2 variantes de luminales. Sin embargo, hay que comentar que la plataforma génica Oncotype DX (que como ya hemos visto, tiene en cuenta 21 genes: 16 genes relacionados con el tumor y 5 de referencia) incluye muchos de estos genes que también se han estudiado para diferenciar entre tumores luminales A y B (HER2, GRB7, ER, SCUBE2, Bcl2, Ki-67, survivina, MYBL2, ciclina B1). Un estudio liderado por Fan y colabo-

radores^[128] analiza los datos de 295 pacientes con estadios I y II de CM, ya utilizados previamente durante el desarrollo de la plataforma MammaPrint, para determinar el riesgo de recurrencia de estas pacientes por el Oncotype DX y la HOXB13:IL17BR expression ratio. Lo interesante de este trabajo, dentro de este epígrafe donde nos encontramos, es que los autores demuestran que el 50% de los tumores clasificados como luminales A tenían una puntuación de recurrencia (RS) bajo, mientras que sólo el 2% de los tumores luminales B tenían un bajo RS. De importancia vital es el conocer aquellos tumores que presenten un mayor riesgo de recurrencia, ya que serán éstos los que mayor beneficio obtengan del tratamiento quimioterápico (en vez de sólo hormonoterapia, en el caso de estar hablando de Oncotype DX, por ejemplo)^[129].

Subtipo HER2

Dentro de la clasificación intrínseca en el CM, aquellos tumores que presentan RH negativos se encuadran dentro de los subtipos HER2, basal y claudin-low. El subtipo HER2 es relativamente poco frecuente, ya que comprende sólo entre el 10% al 15% de todos los CM^[68]. Normalmente, este subtipo muestra no sólo una elevada expresión del gen HER2 sino también de otros muchos genes (muchos de ellos de proliferación) que residen cerca del mismo dominio del HER2, incluyendo GRB7, por lo que es conocido como amplificación de ADN del locus del gen HER2/neu^[21]. Otra característica importante de los HER2 es la alta expresión de genes de proliferación tumoral. Como corresponde a este patrón de expresión, el 75% de estos tumores son de alto grado, y más del 40% presentan mutaciones del gen p53^[68].

Es importante aclarar que no todos los tumores que presenten amplificación/sobre-expresión de HER2, como ya hemos visto en el subtipo anterior, han de ser considerados HER2 (aproximadamente la mitad de los tumores con alta expresión de HER2 pertenecerán al subtipo HER2). La otra mitad, con alta expresión de HER2, se agrupa con los tumores luminales B^{[68][76]}.

En la época previa al uso de las terapias dirigidas frente al HER2, el pronóstico de este subtipo era infausto, con especial apetencia por metastatizar a vísceras, presentando un curso clínico agresivo en ausencia de un tratamiento adecuado^{[49][74][75]}. Asimismo, entre el 30 y el 50% de los casos desarrollan metástasis en sistema nervioso central^[130].

Todo ello hace que el manejo del CM HER2 sea muy diferente al de los restantes subtipos moleculares. El tratamiento del CM HER2 sufrió una revolución con la entrada del trastuzumab en el armamentario terapéutico. Posteriormente, el lapatinib, un inhibidor dual de tirosin-

quinasa de HER1 y HER2 fue introducido para tratamiento de segunda línea de las enfermas con tumores HER2-positivos metastásicos. En el momento actual, un gran número de fármacos dirigidos contra HER2 se encuentran en avanzado desarrollo clínico^[131].

Basal

Quizás uno de los mayores avances en la clasificación molecular del cáncer de mama ha sido la identificación del subtipo basal. Antes de la era de los microarrays se tenía perfectamente catalogados aquellos tumores atendiendo a si eran RH positivos y/o HER2 positivos, como enfermedades distintas con pronóstico dispar; sin embargo, no se contemplaban los restantes subtipos tumorales que conocemos en la actualidad. El subtipo basal, llamado así por una cierta similitud en la expresión génica a la de las células epiteliales basales o mioepiteliales, constituye alrededor del 15% al 20% de los tumores mamarios. Se caracterizan por la baja expresión de genes luminales y el locus HER2. Desde el punto de vista de la IHQ, son negativos tanto para RE, RP como para HER2 (lo que en términos clínicos en la práctica diaria ha tomado el nombre de TN: RE-, RP-, HER2-). Sin embargo, aunque la mayoría de los tumores TN se corresponden con el subtipo basal de la clasificación de Perou, y la mayoría de los tumores basales son TN, existe un 25% de los tumores basal que no son TN^{[132][133]}.

Estos tumores se caracterizan a nivel genómico por una baja expresión de genes luminales y del locus HER2. Por el contrario, presentan alto grado nuclear, alta inestabilidad genómica y elevada expresión del EGFR y mutaciones en TP53^[134]. Además, y lo más característico de este subtipo, es la expresión de un grupo único de genes llamados grupo basal y que comprende citoqueratinas 5, 6, 14 y 17, típicas de epitelios basales o mioepiteliales^[74], además de c-Kit, vimentina, P-cadherina; fascina; caveolinas 1 y 2, y $\alpha\beta$ -cristalina. Dentro de la clasificación de los basal hay autores que discriminan dentro de este subtipo 2 subgrupos: los TN con positividad para EGFR y/o CK 5/6, que serían los auténticos basal, y los TN propiamente dichos^[132]. Sin embargo, y hasta que no se tengan nuevos datos, para simplificar la clasificación molecular, a los TN se les considera como basal molecular.

El subtipo basal en CM tiene ciertas peculiaridades que le hacen único. Una de las más interesantes es la fuerte relación entre este subtipo y los CM con BRCA1 mutado en la línea germinal. De la totalidad de los cánceres esporádicos el subtipo basal representa sólo el 15% de todos los cánceres invasivos^[78]; sin embargo el 80-90% de los CM en mujeres portadoras de la mutación de BRCA1 son basal^[126]. Aun así, la mayoría de los CM basal son esporádicos, y el gen BRCA1 y su proteína están intactos en casi todos estos tumores^[135].

Hay evidencia creciente que sugiere un vínculo entre la vía de los genes BRCA1 y los tumores mamarios basales^{[124][134]}. La mayoría de los tumores que surgen en las portadoras de la mutación BRCA1, son diagnosticados en mujeres menores de 50 años de edad y tienen características similares tanto morfológicas^[136] como fenotípicamente (definidos por IHQ^[137] o microarrays^[74]) a los basales.

Esta superposición fenotípica ha planteado la posibilidad de que la inactivación de la función de BRCA1 también pueda ser la base de la formación de tumores basales esporádicos, y que la pérdida de la función del gen BRCA1 pueda tener un papel etiológico en el desarrollo del fenotipo basal. Así, tumores basal y BRCA1 muestran un particular comportamiento en la expresión proteica del ciclo celular, expresan rara vez amplificación del gen CCND1 (gen que codifica para la proteína ciclina-D1G1/S específica)^{[138][139]}; sin embargo, ambos expresan niveles significativamente bajos de p27 y niveles de expresión génica altos para Skp2, ciclina E y caspasa-3, (al comparar con los cánceres mamarios esporádicos o tumores con mutación en BRCA2).

A pesar de carecer de mutaciones somáticas en BRCA1, los cánceres esporádicos basales muestran similares perfiles genéticos moleculares a los tumores que surgen en las pacientes portadoras de la mutación BRCA1. Esto puede ser debido en parte a la presencia de una vía de BRCA1 disfuncional en estos tumores^{[140][141]}. El gen promotor de BRCA1 está metilado en >60% de los basales fenotipos medular y metaplásico^[142]. Carcinomas ductales invasivos esporádicos con fenotipo basal expresan ID4, un regulador negativo de BRCA1, en niveles significativamente más altos que sus controles (aparejados por edad y grado nuclear para evitar potenciales factores de confusión). Este mecanismo podría explicar los bajos niveles de expresión de BRCA1 en aquellos casos de tumores esporádicos basales y morfología ductal. Es importante destacar que estudios recientes han demostrado que el silenciamiento del gen BRCA1 conduce a la regulación a la baja de los RE y la regulación positiva de genes que se consideran marcadores del subtipo basal, incluyendo CK5, CK17, y P-cadherina. Por el contrario, la reconstitución del gen BRCA1 en líneas de células mutantes RE- BRCA1 ha demostrado que conduce a la regulación positiva de los RE y regulación a la baja de CK5, CK17, y P-cadherina. En conjunto, la disfunción del BRCA1 parece ser uno de los impulsores de los CM basales y de un subgrupo de tumores TN^{[55][134]}.

Tabla 16. Principales subtipos moleculares del carcinoma mamario determinados por sus expresiones génicas así como sus implicaciones evolutivas y sus características clínicas. Tabla elaborada a partir de los artículos referenciados en el texto.

	Luminal	HER2	Basal
Patrones de expresión génica	<ul style="list-style-type: none"> Alta expresión de receptores hormonales y genes asociados (luminal A > Luminal B). 	<ul style="list-style-type: none"> Alta expresión de HER2 y otros genes en el amplicón. Baja expresión de receptores hormonales y genes asociados. 	<ul style="list-style-type: none"> Alta expresión de genes epiteliales basales y CK basales. Baja expresión de receptores hormonales y genes asociados. Baja expresión de HER2
Características clínicas	<ul style="list-style-type: none"> 70% de los cánceres invasivos de mama Receptores hormonales positivos Los luminales B suelen asociar mayor grado histológico que los A Algunos sobre-expresan HER2 (luminales B) 	<ul style="list-style-type: none"> 15% de los cánceres invasivos de mama Receptores hormonales negativos Suelen presentar alto grado tumoral y ganglios afectados 	<ul style="list-style-type: none"> 15% de los casos La mayoría son RE/RPg/HER2 negativos ("triple-negativos") Disfunción BRCA1 (línea germinal, esporádicos) Alta prevalencia en mujeres afro-americanas
Respuesta al tratamiento y pronóstico	<ul style="list-style-type: none"> Responden a terapia endocrina (en mayor medida en los A) Respuesta variable a quimioterapia (más B que A) Pronóstico más favorable para luminales A que B 	<ul style="list-style-type: none"> Responden a terapias dirigidas anti-HER2 Responden a regímenes basados en antraciclinas Generalmente pronóstico desfavorable 	<ul style="list-style-type: none"> No responden a hormonoterapia o terapias anti-HER2 Parecen ser sensibles a regímenes que contengan platinos e inhibidores de PARP. Generalmente mal pronóstico (no uniforme en todos los casos)

Claudin-low

En 2007, y gracias al trabajo de Herschkowitz^[143], se identificó un nuevo subtipo molecular gracias al análisis genómico comparativo entre genes humanos y de ratón. Este subtipo debe su nombre a que estos tumores exhiben una baja expresión de genes que median en las uniones estrechas de las células (se incluyen las Claudinas 3, 4 y 7, Ocludina, y E-cadherina) así como una alta expresión de genes mesenquimales entre los que se enumeran Vimentina, Snail1, Snail 2 y Twist1. Los tumores claudin-low son también triple negativos, y deben ser considerados otro subgrupo dentro de aquellos, junto con los basales.

En conjunto, los tumores claudin-low son el subtipo menos frecuente (con una prevalencia entre un 12-14%) y son en su mayoría de alto grado nuclear. La gran mayoría son tumores clínicamente TN (RE-, RP-, HER2-), al igual que lo son los basales. Sin embargo hay que decir que entre un 15% a un 25% de los claudin-low y un 10% de los basales son RH+. En cuanto a la evolución de las pacientes con tumores claudin-low ésta es pobre cuando se compara con los tumores luminales A. Sin embargo, no existen diferencias en cuanto a la supervivencia al compararlos con los otro subtipos de mal pronóstico (luminal B, HER2 y basal).

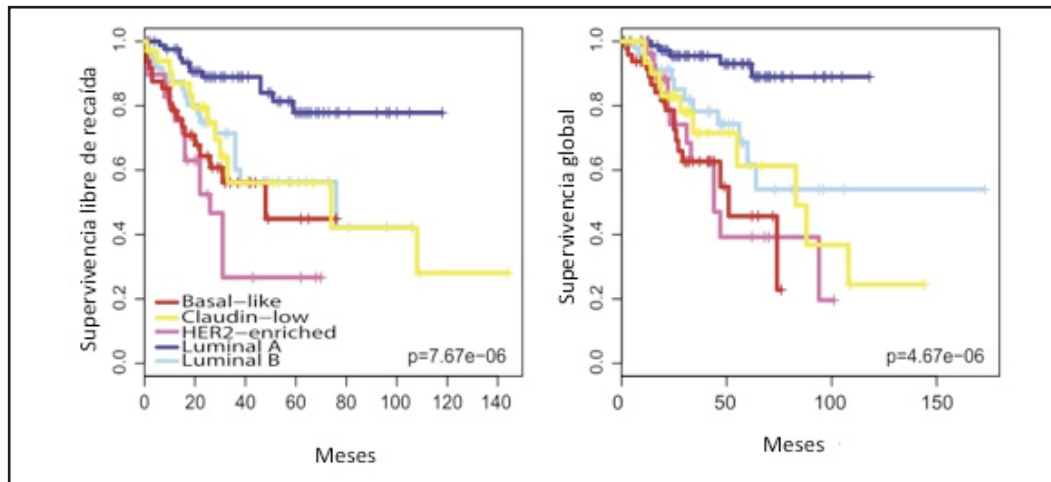


Figura 18. Análisis de Kaplan-Meier que ilustra la supervivencia libre de progresión y supervivencia global usando los datos del UNC337. Las muestras con perfil normal-like fueron excluidas. Figura modificada de Prat et al. (2010)[144].

Otra característica importante de los tumores claudin-low es que casi siempre tienen una intensa infiltración celular inmune, con propiedades comunes de las stem cell y de las células epitelio-mesenquimales de transición (EMT). Hallazgos histológicos destacables es la baja expresión de E-cadherina de este subtipo, hecho que recuerda a los carcinomas lobulillares. Generalmente son tumores de alto grado, pobre diferenciación y intensa infiltración por células inmunes en el tejido tumoral.

La falta de características típicas de células epiteliales y la alta expresión de rasgos mesenquimales es una reminiscencia de las stem cell, como así se postuló en el trabajo encabezado por Lim^[35]. Estos autores purificaron y perfilaron el patrón de expresión génica de las células madre mamarias (CD49^{high}/EpCAM⁻) gracias a técnicas de fluorescencia. Curiosamente, en este trabajo se compararon los perfiles obtenidos genómicamente con cada uno de los subtipos intrínsecos de mama y se determinó que el subtipo claudin-low era el más semejante a la expresión génica de las células madre mamarias. Asimismo, Lim identificó también mediante fluorescencia una fracción de progenitores luminales (CD49⁺/EpCAM⁻) que in vivo no eran capaces de formar ductos pero in vitro daban lugar a colonias luminales, y fue esta fracción la que más se asemejaba, genómicamente hablando, a los tumores basal. Pero es que además, en el tejido de los tumores de mujeres portadoras de la mutación del BRCA1 habían un incremento significativo en el número de estos progenitores luminales/células basales, lo que sugiere que la pérdida del BRCA1 causa un arresto en los estadios iniciales de maduración tumoral, predisponiendo a la selección de tumores claudin-low o basal, como ya hemos visto en las hipótesis del CM y sus subtipos moleculares.

Otros estudios han demostrado que los tumores claudin-low comparten características propias de las denominadas “células iniciadoras de tumores, como son los niveles altos de ALDH1, ratios de mRNA altos tanto de CD44+/CD24- como de CD29+/CD24-^[145].

Hennesy^[146] demostró que los carcinomas metaplásicos (una variante poco común y agresiva de carcinoma mamario) muestran características propias de los claudin-low, y ambos (metaplásicos y claudin-low) comparten rasgos de células EMT.

Estos resultados sugieren que los subtipos intrínsecos de CM surgen de los distintos arrestos en cada una de las etapas del desarrollo de la célula epitelial mamaria, siendo los tumores claudin-low los más primitivos en cuanto a su grado de maduración; seguidamente, los basales, arrestados en la estado de progenitor luminal. El subtipo HER2 vendría determinado por la pérdida de las características de los basales y la ganancia de rasgos luminales. Tras ellos, los luminales A/B: los de mayor grado de diferenciación^{[35][64]}.

5.5. Análisis descriptivo de las variables clínicas en ambas muestras

Se discutirán los resultados en orden a la aparición de los mismos en dicho apartado.

Así en la muestra neoadyuvante, un total de 125 pacientes fueron elegibles para nuestro estudio. La media de edad al diagnóstico fue de 53,93. La edad mínima al diagnóstico fue 27 años, y la máxima 83 años. El 54,4% de las pacientes eran postmenopáusicas. El diámetro promedio tumoral fue de 7,49 ($\pm 5,7$) cm. La distribución de los tumores atendiendo al estadio tumoral y el grado histológico se representa en los siguientes gráficos. Se observa que en nuestra población los tumores mayoritarios fueron del estadio IIB, IIIA y IIIB y de grado histológico tipo dos. En cuanto a la distribución según el tipo anatomopatológico, eran ductales infiltrantes el 83,2% y lobulillares invasivos el 11,2%. Respecto al grado de proliferación celular, el porcentaje promedio de células que sobre-expresaban Ki67 fue del 34,66% ($\pm 27,47\%$). La proporción de tumores con Ki67 $\geq 14\%$ (alto grado de proliferación celular) fue del 71,2%. En cuanto al estado de los receptores hormonales encontramos que un 64,8% de los tumores son positivos para el RE y el 52% para el RP. Por otro lado, el 34,4% de los tumores fueron HER2 positivos. Además, encontramos que un 24% de los tumores fueron TN

En la muestra adyuvante, la media de edad al diagnóstico fue de 51,195 años. En esta muestra el 46,1% de las pacientes eran postmenopáusicas. En cuanto al tipo de cirugía, a un 59,2% de las pacientes se

les practicó la mastectomía. El diámetro promedio tumoral fue de 2,7 ($\pm 1,59$) cm. La media de ganglios aislados en la cirugía fue de 16,96 ($\pm 6,28$) mientras que la media de ganglios con afectación tumoral fue de 4,27 ($\pm 4,77$). En cuanto al subtipo histológico, el ductal infiltrante fue también el diagnóstico anatómo-patológico mayoritario con 708 casos (90,08%). El lobulillar infiltrante fue el segundo en prevalencia con un 7,76%. La distribución por grado nuclear fue del 40,6% para el grado II y 38,4% para el grado III. Respecto al grado de proliferación celular, el porcentaje promedio de células que sobre-expresaban Ki67 fue del 32,45% ($\pm 23,57\%$). La proporción de tumores con Ki67 $\geq 14\%$ (alto grado de proliferación celular) fue del 68,7%. En cuanto al estado de los receptores hormonales encontramos que un 78,1% de los tumores son positivos para el RE y el 69,1% para el RP. Por otro lado, el 14,2% de los tumores fueron HER2 positivos (por FISH). Por IHQ, aquellos tumores con +3 en la positividad del HER2 fueron 80 (9,7%) y 2+, el 113 (13,7%). Además, encontramos que un 12,1% de los tumores fueron TN en esta serie.

5.5.1. Prevalencia de los subtipos intrínsecos de mama determinados por IHQ en nuestras series y en la literatura

La importancia de la subtipificación molecular en el CM ha hecho que su determinación en la práctica clínica haya logrado seducir a un gran número de adeptos. Adjetivos como “luminal” o “basal” se han convertido en un léxico médico de uso cotidiano, aunque estos términos estén referidos no tanto a los análisis de expresión génica por microarrays sino más bien a la batería de marcadores biológicos disponibles que se solicitan de rutina. Partiendo de esta tendencia clínica nace el interés por trabajar en esta línea con este trabajo y explorar la correlación entre ambas modalidades de determinación de los subtipos intrínsecos y en diferentes escenarios (adyuvante y neoadyuvante).

El subtipo intrínseco más prevalente determinado por los marcadores IHQ, para ambas muestras a estudio, fue el subtipo luminal. Para la muestra neoadyuvante, un total de 81 pacientes (un 64,8% del total) presentaban este fenotipo luminal (de las que el 20,8% se categorizan como luminal A y el 44% como luminal B). Estas cifras coinciden con lo reflejado en la literatura ya que este porcentaje de luminales oscila entre el 27% al 73,4%, según distintas series. El siguiente subtipo más común fue el TN con un 24% de las pacientes y a continuación el subtipo HER2 con un 11,2%. Si atendemos a la diferenciación entre basales y TN propiamente, por la expresión de EGFR y CK5/6, habría 17 tumores que serían clasificados como basales.

En la muestra en adyuvancia los subtipos determinados por biomarcadores se distribuyeron de la siguiente manera: luminal A 53,7%; luminal B 25,8%; TN 12,1%, HER2 5,1%.

Parece oportuno discutir en esta sección la problemática que existe en cuanto a las definiciones de TN y subtipo basal determinados por marcadores IHQ. En nuestro trabajo se ha tenido en cuenta únicamente el perfil fenotípico de TN (siendo en conjunto 4 subtipos los que serían determinados por IHQ, ya que la subcategoría de basal está actualmente en discusión). La inicial subclasificación de expresión génica de los tumores mamarios despertó el interés de poder discriminar los tumores basales dada su implicación biológica y pronóstica (alta probabilidad de recurrencias y pobre supervivencia). Aunque existe un solapamiento entre las características clínicas y moleculares de los TN y los tumores basales (alrededor de 2/3 de los TN muestran características de tumores basales por el análisis de microarrays) estas 2 categorías no son equivalentes. Algunos tumores basales expresan positividad para HER2 y RH, y por lo tanto no se categorizarían como TN por IHQ/FISH. Es por esta problemática que no existe un consenso internacional para definir el subtipo basal por IHQ (como marcadores subrogados de la expresión génica)^{[68][122][133][147]}.

La información recogida por Blows y colaboradores de 10.159 casos de carcinoma de mama operados (y en algunos casos tratadas con tratamiento adyuvante) procedentes de doce estudios diferentes (americanos y canadienses), reveló que el 78% del total de casos (7.243 casos) correspondía a carcinomas de mama de tipo luminal. De ellos, el 92% era de tipo luminal A (7.882 casos) y el 8% era de tipo luminal B (639 casos)^[132].

Otro gran estudio, con más de 4.000 mujeres operadas de CM, clasificó a 2.847 tumores como subtipos luminales (70,36% del total de tumores). De las más de 4.000 pacientes aproximadamente un 60% recibió tratamiento adyuvante al considerarse pacientes de alto riesgo de recidiva. Según la positividad del HER2 y el porcentaje de Ki-67%, siendo alto grado si $\geq 13,25\%$, se clasificaron un 59% en luminales A y un 33% en luminales B. A los tumores HER2+ se les asignó a un tercer grupo en el que quedaron representados el 18% de las muestras^[148].

Livasy^[149] estudia 245 muestras de carcinoma ductales *in situ* puros en las que la prevalencia del subgrupo luminal es alta, en torno al 84% del total (61% luminal A y 23% luminal B), seguidos del HER2 con un 16% y basal con el 8%. Es este trabajo en el que mayor es el porcentaje fenotipos luminales en la población a estudio, superando el 80%.

En la literatura se describen diferentes prevalencias para los subtipos intrínsecos dependiendo de la etnia de las pacientes, siendo las mujeres afro-americanas el grupo que mayores concentraciones de basal presentan en comparación con otros grupos étnicos (siendo todavía mayor el porcentaje si se trata de mujeres premenopáusicas, llegando

a representar hasta el 40% en algunos casos). Estas distinciones no son aplicables en nuestro estudio ya que la población a analizar es rigurosamente homogénea (población caucásica). Lo que sí que es realmente interesante es comparar los resultados de este trabajo con otros estudios a nivel nacional que abordan también este aspecto^{[150][151][152][153][154]}.

Millar^[155] estudia el papel de los subtipos intrínsecos de mama en aquellas pacientes en los que se ha optado por cirugía conservadora y radioterapia complementaria con/sin sobreimpresión con fotones sobre el lecho quirúrgico. Lo interesante de este estudio para nuestra discusión es la distribución por subtipos fenotípicos en población europea. Así, estos autores observan que los tumores luminales A representan el 79,1 % de la muestra, luminal B el 4,6%, basal 10,4% y HER2 el 2,6%.

Bosch, Del Casar y Arrechea Irigoyen son 3 autores que han estudiado los subtipos intrínsecos moleculares del cáncer de mama en población española.

En el estudio de Bosch con 816 pacientes comunicado en el Congreso de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) de 2009, son luminales el 81,2% (de los que luminales A son el 88,9% y luminales B el 11,2%); HER2 en el 4,8% y son TN el 14% de las pacientes.

Del Casar^[156] exploró en su trabajo si existía correlación biológica y clínica con los subtipos intrínsecos moleculares en población española. Para ello analizó 4 marcadores biológicos en 787 muestras tumorales: RE y RP, HER2 y EGFR. Las definiciones fueron luminal: (RE+); HER2+ (HER2+, RE-, RP-) y basal (HER2-, RE-, RP-). Además en este estudio se determinó la positividad para la mutación de EGFR dividiendo los tumores basales, según ésta, en 2 grupos según la positividad de este marcador. Así el 55,8% de los tumores eran luminales, el 10,7% eran basales con EGFR-, el 11,9% eran basal con EGFR+ y el 21,6%, HER2+.

La Tesis Doctoral de la Dra. Arrechea Irigoyen^[157] clasifica mediante IHQ a 272 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama en cinco subtipos determinados por IHQ: carcinomas tipo basal, de tipo HER2, de tipo luminal A, de tipo luminal B y normales. Encuentra que los carcinomas de mama más frecuentes en la muestra fueron los de tipo luminal A (62,5%), seguidos de los carcinomas de tipo luminal B (18%), HER2 (9,9%), basal (8,4%) y los de fenotipo normal, en último lugar (1,4%).

En el caso de la población sometida a neoadyuvancia en nuestro estudio, los porcentajes de los subtipos determinados por IHQ se invierten respecto a los porcentajes en los anteriores trabajos. Estas discrepancias entre poblaciones pueden tener varias explicaciones entre

las que se encontrarían: pequeño tamaño muestral y distribución de los diferentes fenotipos intrínsecos al azar, o bien, que la inclusión de pacientes sometidos a neoadyuvancia implica un peor pronóstico, lo cual disminuye la proporción de subtipos luminales A^{[51][152]}.

Tabla 17. Tabla en la que se recoge la distribución en subtipos intrínsecos del CM en varios estudios en los últimos años, incluyendo las 2 muestras de este trabajo (referencias bibliográficas en el texto). Los distintos subtipos descritos fueron designados por un el panel de biomarcadores IHQ utilizado también por nosotros; en esta tabla se ha preferido el término de triple-negativo a los tumores con RH-, HER2-.

	Total (N)	Luminales (A+B)	Her2	Triple-negativo	Inclasificados
Neilson (2004)	663	40%	23%	15%	22%
Carey (2006)	496	67% (51+16)	7%	20%	6,2%
Fan (2006)	295	60% (42+18)	12%	18%	9,8%
Livasy (2006)	245	84% (61+23)	16%	8%	6%
Yang (2007)	804	75% (69+6)	8%	12%	6%
Munjaj (2009)	107	49% (37+12)	29%	7,5%	15%
Millar (2009)	498	85% (79+6)	2,61%	13,2%	4,06%
Bosch (2009)	816	81% (72+9)	4,8%	14%	0%
Blows (2010)	10159	78% (71,3+6,7)	6%	16%	0%
Kim (2010)	257	55,7% (41,1+15,6)	14,8%	29,6%	0%
Presente estudio (neoadyuvancia)	125	64,8% (20,8+44)	11,2%	24%	0%
Presente estudio (adyuvancia)	825	79,5% (53,7+25,8)	5,1%	12,1%	3,3%

Comparando las características clínico-patológicas de nuestras muestras con la serie de referencia de Nielsen^[70] obtendríamos la tabla que se ilustra a continuación.

Tabla 18. Tabla comparativa en la que se recogen las características clínico-patológicas de ambas muestras en este trabajo y se comparan con la cohorte del estudio de Nielsen et al.

	Muestra neoadyuvante	Muestra adyuvante	Muestra de Nielsen
Tamaño muestral (n)	125	825	786
Edad mediana (años)	53	50	67
Estado menstrual			
Premenopáusicas	52 (41,6%)	442 (53,58%)	20 (2,54%)
Postmenopáusicas	68 (54,4%)	380 (46,06%)	752 (95,67%)
Desconocido/embarazo	5 (4%)	3 (0,36%)	14 (1,78%)
Tipo de cirugía			
Conservadora	43 (34,4%)	334 (40,48%)	306 (38,93%)
Mastectomía	79 (63,2%)	488 (59,15%)	468 (59,54%)
Desconocido	3 (2,4%)	3 (0,36%)	12 (1,53%)
Subtipo histológico			
Ductal infiltrante	104 (83,2%)	715 (86,67%)	708 (90,08%)
Lobulillar infiltrante	14 (11,2%)	73 (8,85%)	61 (7,76%)
Otros (medular, tubular, apocrino)	5 (4%)	34 (4,12%)	17 (2,16%)
Desconocido	2 (1,6%)	3 (0,36%)	0 (0%)
Grado tumoral			
G1: bien diferenciado	7 (5,6%)	110 (13,33%)	34 (4,33%)
G2: moderadamente diferenciado	62 (49,6%)	335 (40,61%)	338 (43%)
G3: pobremente diferenciado	52 (41,6%)	317 (38,42%)	370 (47,07%)
Gx: indeterminado	4 (3,2%)	63 (7,64%)	44 (5,6%)
Tamaño tumoral mediana (cm)	6	2,4	2,1
Estadio T (clínico)			
T1: < 2cm	7 (5,6%)	342 (41,45%)	331 (42,11%)
T2: 2-5 cm	43 (34,4%)	434 (52,61%)	380 (48,35%)
T3: > 5 cm	63 (50,4%)	46 (5,58%)	18 (2,29%)
T4: cualquier T y afectación pared torácica/piel	12 (9,6%)	3 (0,36%)	34 (4,33%)
Tx: indeterminado	0 (0%)	0 (0%)	23 (2,93%)
Número de ganglios positivos			
N0: ningún ganglio afecto	33 (26,4%)	0 (0%)	222 (28,24%)
N1: 1-3 ganglios	63 (50,4%)	508 (61,58%)	360 (45,8%)
N2: 4-9 ganglios	16 (12,8%)	229 (27,76%)	125 (15,9%)
N3: > 10 ganglios	9 (7,2%)	85 (10,3%)	26 (3,31%)
Nx: indeterminado	4 (3,2%)	3 (0,36%)	53 (6,74%)
Subtipos moleculares por PAM50			
Luminal A	30 (24%)	278 (33,7%)	372 (47,33%)
Luminal B	33 (26,4%)	262 (31,76%)	329 (41,86%)
HER2	18 (14,4%)	176 (21,33%)	64 (8,14%)
Basal	20 (16%)	70 (8,48%)	5 (0,63%)
Normal	24 (19,2%)	31 (3,76%)	16 (2,04%)
Indeterminado	0 (0%)	8 (0,97%)	0 (0%)

5.5.2. Distribución por subtipos intrínsecos moleculares determinados por PAM50

Mediante el análisis de expresión génica de ambas muestras gracias a la plataforma PAM50 se obtuvieron los distintos subtipos intrínsecos, base fundamental de este trabajo. Como comparativa directa disponemos del trabajo de Nielsen^[70] en el que emplea la plataforma PAM50 para discriminar entre los 5 subtipos intrínsecos moleculares. En aquel trabajo no se dispone de la determinación adicional del subtipo claudin-low, por lo que prescindiremos de este dato en la muestra neoadyuvante.

En la **muestra neoadyuvante**, el subtipo intrínseco más prevalente fue el **luminal B** con alrededor de un **27%**.

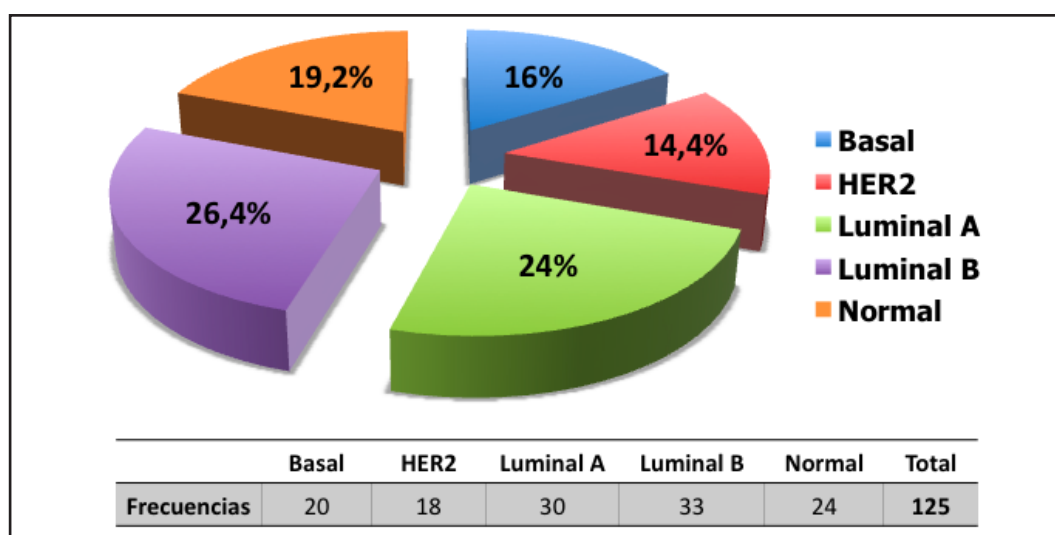


Gráfico 12. Subtipos intrínsecos moleculares de CM en la muestra neoadyuvante determinados por el método genómico. En el gráfico se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

Con respecto a la distribución de los subtipos moleculares por el método genómico en la muestra tratada en adyuvancia, aquella varía la frecuencia de cada uno de los subtipos. En este caso, el subtipo más frecuentemente encontrado es el Luminal A con 278 muestras con este diagnóstico de expresión génica (un 33,7% del total). Prácticamente el mismo porcentaje es observado para el subtipo Luminal B (32%). El subtipo minoritario es el Normal (3,8%). Nótese que en esta muestra hubo 5 muestras en las que se obtuvo un resultado indeterminado.

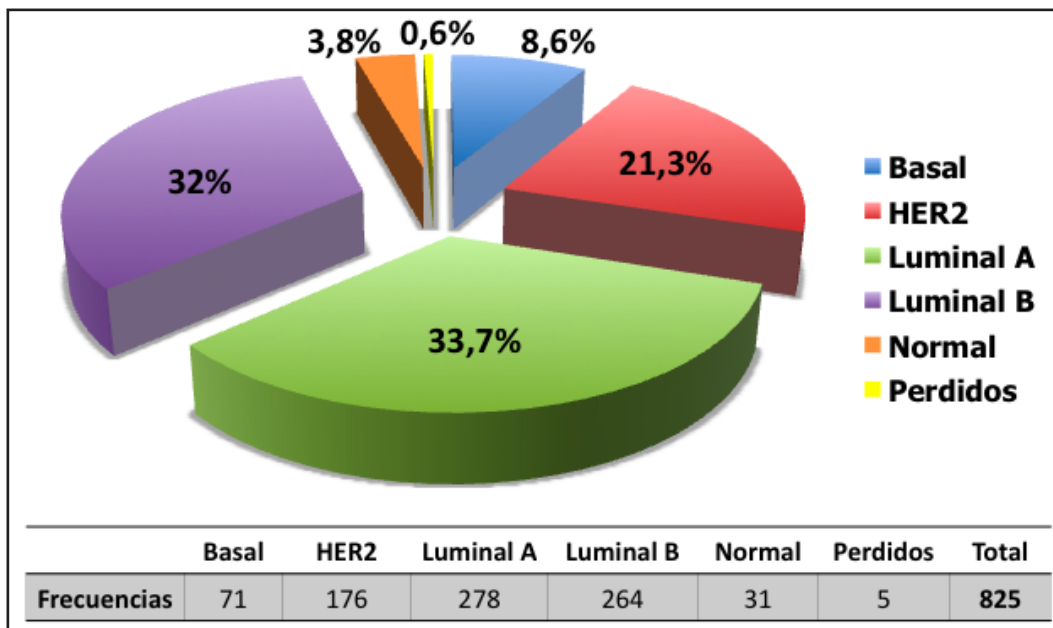


Gráfico 14. Subtipos intrínsecos moleculares de CM en la muestra adyuvante determinados por PAM50. En el gráfico se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

Como ya se ha comentado, este trabajo exploraba la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y los subtipos moleculares de expresión génica por esta plataforma. La muestra a estudio, sin embargo, diverge de ambas muestras en esta Tesis. Todas las muestras tumorales en aquel trabajo presentaban RH positivos y las pacientes fueron tratadas con hormonoterapia. No obstante, y como describen los autores, hubo aproximadamente un 10% de casos que fueron subtipos no-luminales (**Gráfico 19**).

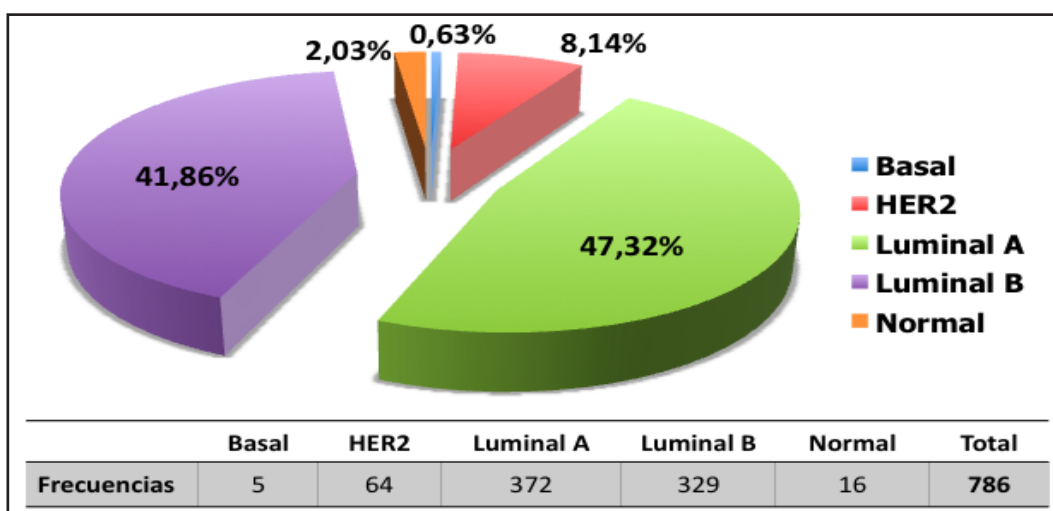


Gráfico 19. Subtipos intrínsecos moleculares de CM en la muestra de referencia (Nielsen et al) determinados por PAM50. En el gráfico se representan la frecuencia y el porcentaje para cada uno de los subgrupos.

5.6. Relación entre variables clínicas y los subtipos de expresión génica tumoral

5.6.1. Subtipos moleculares y su relación con la edad y el estado menstrual

La edad mediana de las pacientes en las poblaciones seleccionadas a estudio (en las muestras tratadas con neoadyuvancia y adyuvancia) fue de 53 y 50 años, respectivamente. En la muestra adyuvante, no se han encontrado datos concluyentes que asocien la edad de las pacientes con un subtipo intrínseco. Sin embargo, llamativo es en la población neoadyuvante, al comparar la edad por subtipos moleculares determinados por el método genómico (incluyendo el claudin-low), que los subtipos que presentan edad más avanzada fueron el luminal A (mediana de 58 años; 36-83 años como extremos de edad) y claudin-low, 61 años de mediana (38-78 años, como límites mínimo-máximo). No existen demasiados datos con los subtipos moleculares por expresión génica y la edad. Con respecto al estudio que se ha tomado como referencia, Nielsen^[70] no encontró diferencias significativas entre la edad y los diferentes subtipos y tampoco entre estos últimos y el estado menstrual. Los estudios científicos que abordan este aspecto, aunque basados en la IHQ como base para definir los subtipos, concluyen que los subtipos basales y HER2 suelen darse en pacientes más jóvenes, respecto a los luminales, sobre todo los del subtipo A^{[51][150][156]}. La literatura muestra que las pacientes afro-americanas presentan el subtipo TN a edades más precoces que el resto de poblaciones étnicas. Este dato podría justificar, en parte, el mal pronóstico que experimentan las pacientes afro-americanas con CM^[124]. No obstante, no queda del todo claro que la raza negra conlleve un peor pronóstico del CM en cuanto a subtipos intrínsecos se refiere, como así se constata en el trabajo de Awadelkarim et al^[158] en el que compara mujeres de raza negra de Sudán y población caucásica de Milán concluyendo que tiene más peso el estadio clínico al diagnóstico poniendo de relieve las implicaciones en materia de prevención y tratamiento del CM en el África negra.

Ihemelaudu^[159] estratifica en subgrupos etáricos, observando que el subtipo más prevalente en las mujeres menores de 35 años es el basal (57,1%), seguido del luminal A (25%), luminal B (14,3%) y HER2 (3,6%). Este autor, además, describe una distribución bimodal edad-específica del subtipo basal, con 2 picos en las mujeres menores de 35 años y en el subgrupo de 51 a 65 años.

Un 54,4% de las pacientes tratadas con quimioterapia primaria eran postmenopáusicas frente al 46% en el caso de las pacientes con tratamiento complementario. En la tabla que se adjunta abajo se con-

textualizan los resultados obtenidos con algunos de los trabajos más relevantes que relacionan estado menstrual y subtipos intrínsecos del CM. Como norma general a lo expresado en la literatura al respecto, los subtipos basal y HER2 son más prevalentes en las mujeres premenopáusicas. Esto es todavía más cierto cuando se analiza por subgrupos étnicos siendo mayor la proporción en pacientes afro-americanas, fundamentalmente a expensas del subtipo basal^{[51][150][156][159]}.

Un estudio curioso que merece la pena comentar en este apartado es el impulsado por Islam et al^[160]. Se trata de un estudio de casos-contróles en población japonesa afecta de CM, pre y post menopáusicas, y cuyo objetivo es evaluar la hipótesis de que ciertos factores hormonales y reproductivos podrían explicar diferencias etiológicas en cuanto a subtipos intrínsecos en el CM se refieren. Examinaron 706 casos de cáncer de mama y sus 1412 controles correspondientes con mujeres sin cáncer. Mediante IHQ se clasificó a 554 pacientes como luminales (RH positivos), 84 HER2 (RH-, HER2+) y 68 TN (RH/HER2-). Se demostró una asociación significativa entre la edad temprana de menarquia y el riesgo de enfermedad luminal. No se encontraron diferencias en los distintos subtipos y le edad del primer alumbramiento, historia de lactancia materna, edad de menopausia o la terapia hormonal sustitutiva (THS).

Tabla 19. Tabla en la que se recogen la distribución según el estado menstrual atendiendo a los subtipos intrínsecos del CM en varios estudios en los últimos años. Se incluyen además las 2 muestras de este trabajo. Los distintos subtipos descritos fueron designados por un el panel de biomarcadores IHQ.

	Estado menstrual	Total (N)	Luminal A	Luminal B	HER2	Basal
Carey (2006)	Total muestra	496	255	77	33	100
	Premenopausia	261 (53%)	118 (46%)	39 (51%)	18 (55%)	64 (64%)
	Postmenopausia	235 (47%)	137 (54%)	38 (49%)	15 (45%)	36 (36%)
Hugh (2009)	Total muestra	1350	211	810	113	192
	Premenopausia	531 (39,3%)	97 (46%)	293 (36%)	50 (44%)	83 (43%)
	Postmenopausia	819 (60,7%)	114 (54%)	517 (64%)	63 (56%)	109 (57%)
Minhao (2011)	Total muestra	102	20	23	18	41
	Premenopausia	46 (45,1%)	11 (55%)	9 (39,1%)	6 (33,3%)	20 (48,8%)
	Postmenopausia	56 (54,9%)	9 (45%)	14 (60,9%)	12 (66,7%)	21 (51,2%)
Nielsen (2010)	Total muestra	772	368	321	64	19
	Premenopausia	20 (2,6%)	10 (2,72%)	7 (2,2%)	2 (3,1%)	1 (5,3%)
	Postmenopausia	752 (97,4%)	358 (97,28%)	314 (97,8%)	62 (96,9%)	18 (94,7%)
Muestra Neoadyuvancia	Total muestra	120	29	32	17	42
	Premenopausia	52 (41,6%)	10 (34,5%)	16 (50%)	11 (64,7%)	15 (35,7%)
	Postmenopausia	68 (54,4%)	19 (65,5%)	16 (50%)	6 (35,3%)	27 (64,3%)
Muestra Adyuvancia	Total muestra	817	278	262	176	101
	Premenopausia	441 (54%)	168 (60,4%)	123 (46,9%)	95 (54%)	55 (54,5%)
	Postmenopausia	376 (46%)	110 (39,6%)	139 (53,1%)	81 (46%)	46 (45,5%)

5.6.2. Subtipos moleculares y subtipos histológicos

Diversos estudios han demostrado que dentro de los subtipos histológicos existe importante variación pronóstica, de forma que ciertos tipos como el tubular, mucinoso, medular y adenoide quístico tienen buen pronóstico mientras que otros como los carcinosarcomas, CM en anillo de sello o los carcinomas inflamatorios muestran mal pronóstico. Sin embargo, estos subtipos constituyen un porcentaje pequeño del total de CM y, de hecho, a pesar de esta diversidad en el comportamiento, el 70-80% de los tumores se clasifican como carcinomas ductales infiltrantes^{[150][161][162]}.

Nuestros resultados mostraron que en nuestras muestras en neoadyuvancia y adyuvancia, el 83,2% y el 90,08% de los tumores analizados respectivamente fueron compatibles con el diagnóstico de ductal infiltrante. En la serie neoadyuvante, el 100% de los HER2 y claudin-low son ductales infiltrantes y alrededor de un 20% de los luminales y normales son lobulillares.

El diagnóstico histopatológico de ductal infiltrante según subtipos moleculares se distribuyó de la siguiente manera en la muestra en adyuvancia: basal 62 (88,6%), HER2 163 (92,6%), luminal A 229 (82,4%), luminal B 232 (88,5%) y normal 25 (80,6%). El lobulillar infiltrante se diagnosticó con mayor frecuencia entre los luminales A (38 casos que suponen el 13,7% de los luminales A).

Hay muy pocos estudios que correlacionen los subtipos histológicos con los subtipos moleculares de expresión génica. A este respecto, sólo hemos encontrado este análisis en el artículo tomado como de referencia de Nielsen^[70]. De los 786 tumores analizados, eran ductales infiltrantes 708 de los mismos. El porcentaje que este diagnóstico supuso para cada uno de los subtipos fue el siguiente: el 88,44% de los luminales A, luminales B 91,79%, HER2 93,75%, basales 80% y normales 81,25%. Del mismo modo que en nuestras series, el subtipo intrínseco con mayor porcentaje de lobulillares invasivos fue el luminal A (32 tumores luminales fueron compatibles con este diagnóstico, un 8,6% del total).

En la literatura sí que existen más trabajos en los que exploran la relación entre los subtipos histológicos y los subtipos intrínsecos (eso sí, determinados por el panel de marcadores IHQ). Los resultados son contradictorios, ya que algunos de ellos encuentran diferencias significativas entre ambas variables mientras que en otros, no se alcanza el valor de la significación^{[132][150][156][161][162]}.

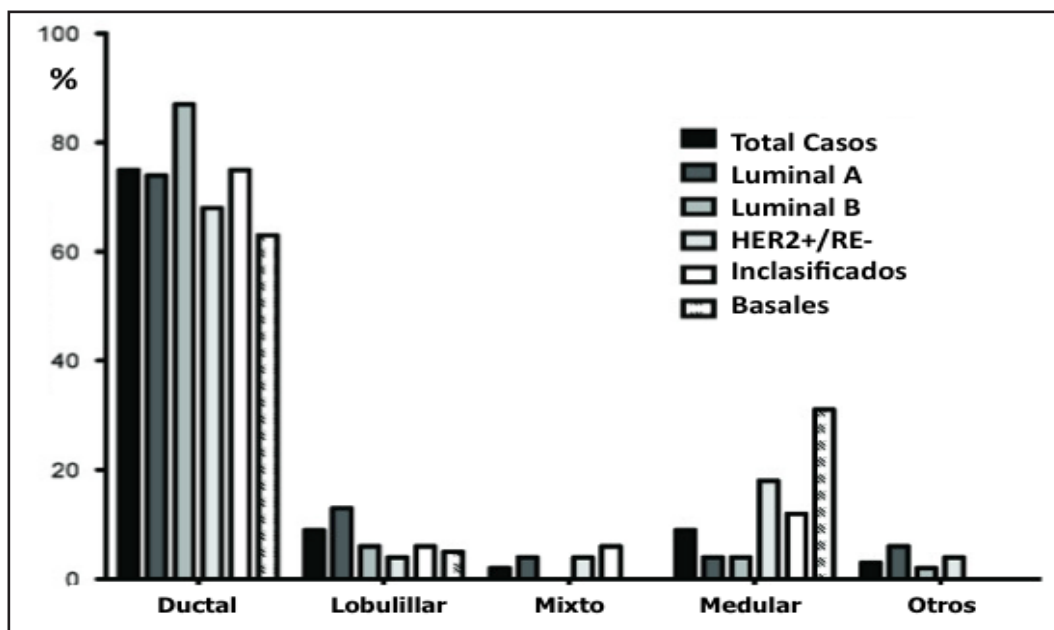


Figura 19. Distribución de los subtipos histológicos en relación con los subtipos moleculares. Modificado de *Salhia et al. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology. BMC Women's Health 2011,11:44.*

Llamativa también la coincidencia de que en nuestra muestra en neoadyuvancia hubo 2 registros de carcinoma medular entre los subtipos basales (suponiendo un 13,3% del total de los basales). Esta tendencia también se muestra en la Figura de arriba, en la que el diagnóstico de carcinoma medular muestra un pico entre los clasificados como TN.

En lo que parecen coincidir todos ellos es en el porcentaje de ductales infiltrantes en el subtipo molecular HER2 (en todos ellos mayor del 95%) y en los basales (alrededor del 80%). El porcentaje de los luminales es algo más variable, siendo un 57% de los luminales A en el trabajo de Hugh^[51] frente al 90% en el estudio de Munjal^[153]. En el trabajo de Carey^[150] (al igual que en nuestras muestras) el subtipo molecular que más lobulillares engloba es el luminal A (12%).

5.6.3. Otras variables clínico-patológicas y su relación con los subtipos intrínsecos moleculares

En relación al tamaño tumoral, nuestros datos reflejan una discordancia entre ambas muestras. Mientras que en la muestra neoadyuvante son los tumores luminales los que alcanzaron mayor tamaño, en la adyuvante, basales y HER2 fueron los de T más elevada respecto al resto de subgrupos (siendo estas diferencias estadísticamente significativas). En el trabajo de Nielsen^[70] son HER2 y basales los que presentan mayor T.

Numerosos trabajos intentan explorar si existe relación alguna entre el tamaño tumoral con los subtipos intrínsecos por biomarcadores de inmuno-tinción. Merece la pena utilizar en este apartado un esquema extraído de un artículo de revisión de Sotiriou^[163] en el que se ilustra la distribución de las distintas características clínico-patológica entre los subtipos luminal A y B, HER2 y basal (=TN), para nuestras comparaciones). Este esquema nos servirá de guía para la discusión de los siguientes apartados.

Tabla 20. Correspondencia entre la clasificación molecular y las características clínico-patológicas del CM. Datos provenientes de Sorlie et al., Hu et al., Rouzier et al., y van de Vijver et al. Tabla modificada de Sotiriou et al. *Gene-Expression Signatures in Breast Cancer*. N Engl J Med 2009;360:790-800.

	Triple-negativo (%)	Luminal A (%)	Luminal B (%)	HER2 (%)
RH positivos	12	96	97	46
HER2+ (IHQ)	10	12	20	100
Grado nuclear III	84	19	53	74
Tamaño tumor > 2cm	75	53	69	74
Ganglios positivos	40	52	65	66

Revisando la literatura al respecto y acorde con la tabla arriba representada parece que los subtipos que presentan mayores tamaños al diagnóstico son los HER2 y los basales. Centrándose en el subtipo basal como el de mayor tamaño, merece la pena comentar los trabajos liderados por Liedtke^[162] y Dent^[164]. En ambos se compara el subtipo basal con el resto de subtipos intrínsecos en relación al tamaño tumoral y ambos coinciden que este subtipo es el de mayor tamaño tumoral (aunque únicamente el último de los trabajos encuentra la significación estadística).

En relación a la afectación ganglionar, en la muestra neoadyuvante fueron el subtipo normal (y el claudin-low) los que asociaron una mayor afectación ganglionar; en la muestra adyuvante, fue el HER2 el que mayor afectación adenopática mostró y el luminal A, en el extremo opuesto, el que menor número de ganglios positivos concentraba. En la muestra de Nielsen fue el subtipo basal en el que mostró el mayor porcentaje de afectación adenopática (80%) y el subtipo que menor porcentaje fue el HER2 (29,68%). De la tabla arriba expuesta se extrae que la distribución de ganglios positivos entre los subtipos moleculares viene dada por: TN (40%), luminal A (52%), luminal B (65%) y HER2 (66%).

En nuestras muestras, el análisis del grado histológico para cada uno de los subtipos demostró que el subtipo basal era el que asociaba más frecuentemente el alto grado (G3). Para la muestra neoadyuvante un 66% de los basales eran G3 frente a un 87,1% en la muestra adyuvante. El siguiente en frecuencia fue el HER2, con un 63,2% y 54,5%, respectivamente. Analizando los tumores de bajo grado (G1), en ambas muestras fue el subtipo luminal A el que más frecuentemente asoció este diagnóstico. Nielsen describe esta correlación y obtiene los siguientes porcentajes para el alto grado: luminal A (36,29%), luminal B (54,41%), HER2 (75%), basal (60%) y normal (31,25%). Como se puede observar nuestros resultados y los suyos son bastante superponibles.

En la literatura, diferentes trabajos coinciden en apuntar en que el subtipo TN, seguido del HER2, son los tumores más indiferenciados. El luminal B estaría en una situación intermedia y el luminal A sería el subtipo más diferenciado^{[32][51][150][156][159]}.

Se postulan varias hipótesis para justificar estas diferencias en la diferenciación tumoral entre los subtipos intrínsecos moleculares en el CM. Un determinado subtipo podría surgir de la transformación de la célula madre normal o de las células progenitoras, dando lugar así a una población heterogénea dentro del tumor. Una teoría interesante que merece la pena comentar en este apartado es el de la hipótesis de las stem-cell tumorales (CSC) considera que la mayoría de las células que constituyen el tumor son diferenciadas, con potencial proliferativo limitado, mientras que otras partes (minoritarias) mantendrían las características de las células madre tumorales, con su auto-renovación y, por consiguiente, confiriendo resistencia a los tratamientos oncológicos por su naturaleza única. Esta teoría de las CSC, junto con los datos arrojados por Lim, sugieren que las CSC y los progenitores luminales son las células origen de los tumores claudín-low y basales, respectivamente (**ver Fig. 20**). Para aislar las CSC, Lim determinó los niveles de expresión de EpCAM (también se utiliza como antígeno para identificar células circulantes tumorales) junto con CK8, CK18 y CK19 que, o no se expresan en las CSC o se expresan con niveles prácticamente indetectables^{[35][165]}.

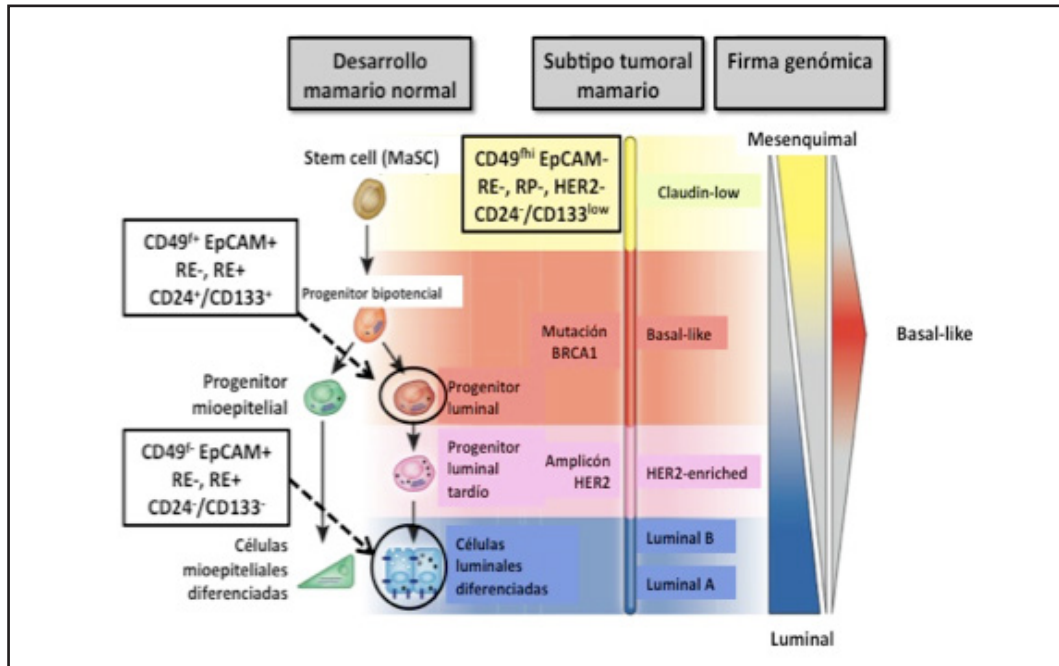


Figura 20. Modelo esquemático de la jerarquía epitelial del CM y su relación con los subtipos moleculares. Entre las subpoblaciones celulares: MaSC, las células progenitoras luminales y las células luminales maduras definidas todas ellas por la expresión diferencial de CD49f y EpCAM. Estas células pueden proceder de una determinada parada en el ciclo celular o la transformación desde un subtipo específico. Nótese la proximidad en los bloques de diferenciación entre la pérdida de BRCA1 y la amplificación de HER2 como sugerencia de la diferenciación jerárquica tumoral. Modificado de *Lim, E et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation Carriers. Nat. Med. 15,907-913(2009)* y *Prat y Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. Nat Med. 2009 Aug;15(8):842-4.*

Otra posibilidad alternativa, es que la CSC pueda ser la célula de origen de ambos subtipos moleculares; bajo esta hipótesis los tumores claudin-low derivarían de la CSC, bloqueados en el estado de célula madre; mientras que los basales derivarían de la etapa posterior, la de las células progenitoras luminales, teniendo un menor componente de células madres, y explicando así el pobre pronóstico a pesar de responder a la quimioterapia (selección de clones tipo CSC tras el tratamiento citotóxico)^[36].

Gracias al trabajo iniciado por Lim y colaboradores^[35] se han podido sentar las bases para la mejor comprensión de la heterogeneidad biológica del CM. Los datos arrojados de su investigación sugieren que la CSC, originaria de los tumores claudin-low, si evoluciona, teóricamente, daría lugar al estado de progenitor luminal. En esta fase, la célula tiene bipotencialidad, esto es, muestran características comunes tanto de las células mioepiteliales (o basales) como luminales, diferenciándose posteriormente a uno u otro de los linajes tumorales.

Hay que decir que la información disponible sobre la rama del desarrollo mioepitelial y basal es limitada y constituye un área que merece más atención e investigaciones futuras.

5.6.4. Subtipos intrínsecos y respuesta a la quimioterapia

Habiéndonos sumergido de lleno en el escenario de la neoadyuvancia es obligado comentar el papel cada vez más relevante de los subtipos intrínsecos de mama como factores predictivos de respuesta a la quimioterapia primaria así como pronósticos (con aquellos que asocian mayores tasas de RPC con según qué esquemas de quimioterapia elegidos). De las pacientes tratadas con quimioterapia primaria y analizables estadísticamente en nuestra muestra (111 mujeres) obtuvieron la RPC 16 de ellas (lo que supone un 12,8% del total). Los subtipos intrínsecos que asociaron mayores tasas de RPC fueron los HER2 y los basales, representando el 50% de todas las RPC objetivadas (4 para cada uno de estos subtipos). El único subtipo en el que no se obtuvo ninguna remisión patológica fue en el luminal A. Así, un 26,7% de los basales, un 21,1% de los HER2, un 8,8% de los luminales B, un 13,3% de los normales y un 21,4% de los claudin-low alcanzaron la RPC.

Dos estudios han analizado directamente la respuesta de la quimioterapia neoadyuvante de los subtipos intrínsecos determinados por su expresión génica. Rouzier^[161] selecciona 82 pacientes con CM primario que son tratadas con un esquema de 12 semanas de paclitaxel seguido de 4 ciclos de FAC (5-fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida) y evalúa la RPC. Los resultados que obtienen es que entre los 22 tumores basales y los 20 HER2, la tasa de RPC para ambos subtipos era del 45% mientras que para los subtipos luminales fue únicamente del 7%. Más recientemente, Parker y su equipo^[49] evalúan el poder predictivo de la clasificación molecular determinando la RPC de un cohorte de 357 pacientes tratadas con un régimen de quimioterapia basado en antraciclinas/taxanos. Nuevamente, los subtipos basal y HER2 mostraron una tasa de RPC del 43% y 36%, respectivamente. Los subtipos luminales A y B, por el contrario, alcanzaron bajas tasas de remisión (un 7% y 17%, respectivamente).

En la mayoría de trabajos en los que se ha explorado este aspecto, se han evaluado los subtipos moleculares mediante IHQ como marcador subrogado de los perfiles de expresión génica. Los datos arrojados por el estudio de Chen et al son totalmente superponibles a nuestros resultados. Estos autores analizan 102 pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante y las subdividen en 4 subtipos (Luminal A y B, HER2 y TN) atendiendo a la IHQ. Dieciséis pacientes (15,7%) obtienen la RPC, distribuyéndose según los siguientes porcentajes: luminal A (0%); luminal B (8,7%); HER2 (22,2%) y TN (24,4%)^[71].

En Carey et al^[150], 107 pacientes fueron tratadas con quimioterapia primaria con un esquema adriamicina-ciclofosfamida por 4 ciclos y un seguimiento de 39 meses de median. La tasa de RPC a la quimioterapia fue del 36% para HER2, del 27% para TN y 7% para los subtipos que expresaban RH+.

En la ASCO de 2010, H. Jinno y colaboradores^[66] comunican un trabajo con las diferentes respuestas a quimioterapia neoadyuvante según los subtipos en CM. Se seleccionaron 73 pacientes para ser tratadas con 4 ciclos del esquema XT (capecitabina 1650 mg/m² días 1-14 y docetaxel 60 mg/m² día 8^o, trisemanal), seguido FEC x 4 (fluorouracilo 500 mg/m², epirrubicina 90 mg/m², ciclofosfamida 500 mg/m² día 1^o, también cada 3 semanas). Estos autores reportan tasas de RPC del 15,1% (33,3% de las mismas correspondientes a basal y 30% al subtipo HER2). El subtipo que menos RPC asocia sigue coincidiendo con el Luminal A (4,1%).

Sin embargo, existen otros trabajos en que los porcentajes de RPC se distribuyen de manera diferente. Es el caso de un estudio llevado a cabo en el seno del Instituto Valenciano de Oncología (IVO) en el que se analizaron 271 enfermas de CM tratadas con quimioterapia de inducción (63% de las mismas con antraciclinas o taxanos). Estas pacientes fueron divididas en subtipos intrínsecos considerando los RH y HER2 por IHQ (obteniendo 4 subgrupos; luminal A y B, HER2 y basales). Las tasas de RPC en este trabajo para cada subtipo son: luminal A (8,9%); luminal B (27,3%); basal (29,3%) y HER2 (24%)^[166].

En lo que sí que coinciden éstos y otros muchos trabajos es en concluir que los subtipos intrínsecos más quimiosensibles (y por tanto, los que mayores tasas de RPC obtienen con la quimioterapia preoperatoria), son los basales y los HER2 (en torno al 25%), con respecto a los luminales. Se observa que las pacientes que obtienen la RPC con el tratamiento tienen un pronóstico más favorable, independientemente del subtipo intrínseco. Paradójicamente, son los basales y HER2 los que en su conjunto asocian peores supervivencias y mayores tasas de recaídas tempranas (en aquellas pacientes con enfermedad residual tras neoadyuvancia)^{[68][167][168]}.

Analizamos ahora los esquemas de tratamiento recibidos en aquellas 16 pacientes que obtuvieron la RPC con la quimioterapia neoadyuvante (12,8%). De los 4 basales con RPC, 3 fueron tratadas con regímenes que contenían adriamicina. En el caso de los HER2, de las 4 RPC, además de la terapia antidiana en todas ellas, 2 se obtuvieron con taxanos. El resto de subtipos, mayoritariamente fueron tratados con esquemas que contenían antraciclinas. Estos datos coinciden con lo expresado en la literatura acerca de la quimiosensibilidad según

los subtipos moleculares; así Rouzier et al^[161] recomiendan el uso de taxanos o doxorubicina como tratamiento de elección preoperatorio en pacientes con fenotipo basal o HER2.

Existe un interés creciente en encontrar diferentes marcadores predictivos con el fin de poder seleccionar aquel tratamiento óptimo según el subtipo molecular. Se hipotetizan diferentes mecanismos moleculares responsables de la respuesta y sensibilidad a los distintos regímenes de tratamiento dentro de cada uno de los subtipos intrínsecos del CM^[109].

Ejemplos encaminados a estos avances terapéuticos se encuentran: el valor de la topoisomerasa II α (TOP2A) o la amplificación del HER2 y el mayor beneficio de las antraciclinas^[169] o las mutaciones en BRCA1 (tanto somáticas como de la línea germinal) y p53, esta última pudiendo conferir resistencia a antraciclinas en el subtipo luminal o quimiosensibilidad en los basales según apuntan otros estudios^[170]^[171]. Es la mutación en BRCA1 la que parece conferir también especial sensibilidad a las sales de platino, tal y como apuntan los estudios de Gronwald y Garber^[172]^[173], con tasas de RPC tan sorprendentes como de hasta el 72% con cisplatino-irinotecán.

Se cree que el subtipo TN asocia mayores tasas de sobre-expresión de la TOP2A y, por tanto, se beneficiaría en mayor medida del tratamiento con taxanos. Así entre las combinaciones propuestas en este subtipo se encuentra el carboplatino-docetaxel (con RPC en torno al 45%)^[52]^[174].

conclusiones

TESIS DOCTORAL

conclusiones

1. El grado de correlación entre la clasificación en subtipos intrínsecos mediante IHQ con la verdadera clasificación genómica expresado mediante el índice kappa fue de 0,34 y 0,37 para las muestras neoadyuvante y adyuvante, respectivamente. Esta fuerza de concordancia es tan sólo aceptable en términos estadísticos.

2. El porcentaje de discrepancias entre ambos métodos clasificadores fue mayor al designar los subtipos luminales B y basales en la muestra neoadyuvante (50 y 54,5%) y HER2 y luminal B en la adyuvante (82,1 y 58,5%, respectivamente).

3. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la equiparación de la clasificación en subtipos intrínsecos del carcinoma de mama por IHQ a la expresión génica tumoral es sólo aproximada; su asunción puede repercutir en una inadecuada elección de tratamiento con impacto pronóstico en las pacientes.

summary

TESIS DOCTORAL

sum

ma

ry

1. BACKGROUND

Breast cancer is the most common cause of cancer death in women worldwide, estimated to be responsible for around 458,500 female deaths in 2008 or nearly one in seven (around 14%) of all cancer deaths in women. In Spain, roughly 6,000 patients die from breast cancer annually. There has been a slight increase in the incidence of breast cancer over the past few years. This may be the result of better screening or an increase in longevity. Over this same time period there has been a decline in the mortality rate, but there is still a great need to improve upon the ability to accurately predict patient outcomes and to treat patients more effectively.

In current routine clinical management, decision making about adjuvant therapy attempts to weigh the risk of recurrence against the potential benefit and side effects of treatment. Classic clinical and pathologic features such as patient age, tumor size, nodal status, tumor grade, margin status, and ER, PR and HER2 status are used to determine a patient's risk for recurrence and subsequently her treatment options. Guidelines have been developed, including the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines, the St. Gallen Expert Opinion criteria, and the computer-based algorithm Adjuvant! Online. However, these types of risk estimations remain inexact for many patients.

Within the last decade, the advent of high-throughput platforms for analysis of gene expression, such as microarrays, has permitted simultaneous measurement of thousands of genes to create a molecular portrait of tumors. The seminal class-discovery studies undertaken by Perou and colleagues revealed that ER-positive and ER-negative breast cancers are fundamentally distinct diseases in molecular terms. This research group demonstrated that the way an individual breast cancer behaved was associated with different genetic background. From the genes in the tissue samples they selected a subset of 456 genes, which they named the "intrinsic" gene subset. This subset contained genes that were significantly different among different breast cancers. Using this subset, they were then able to identify 5 very different molecular subtypes of breast cancer: luminal A, luminal B, basal-like, HER2-enriched and normal breast-like variant. These five molecular subtypes have been confirmed in independent data sets and, furthermore, they differ markedly in prognosis and in the therapeutic targets.

Gene signatures may also complement clinical and pathological factors to predict prognosis and response to therapy in patients with breast cancer. A number of prognostic gene signatures are commercially

available at this moment. Oncotype DX, PAM50, and MammaPrint are multigene tests that are being used clinically for early-stage breast cancer to predict recurrence risk and guide adjuvant chemotherapy decisions. These tests have been validated in multiple retrospective studies, and prospective clinical trials are in progress.

At present, the molecular classification of breast cancer is considered the gold standard for the proper management of breast cancer patients. However, the generalization of molecular assay methodology into daily practice is currently limited, in part due to high costs, low availability and the complex technology required. An alternative approach to profiling breast cancer patients in terms of prognosis has been an attempt to directly translate gene expression data into IHC based markers for clinical testing. At present there is no consensus on which biomarkers should be used, especially in basal-like phenotypes, or about the required cellular staining percentage or intensity.

2. HYPOTHESES AND RESEARCH OBJECTIVES

Based on this dilemma, this study explores firstly whether the molecular subtypes provided by gene-platforms can be replaced by the IHC and secondly, what level of agreement exists between both approaches.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Samples and clinical data

Two prospectively maintained data sets of breast cancer patients from two independent studies in different settings - adjuvant and neoadjuvant treatment - were examined:

- The neoadjuvant cohort consisted of 125 tumor samples from women aged between 18 and 79 years with clinical stage IIB, IIIA or IIIB breast cancer not amenable to breast preserving surgery. Core biopsies of the tumor were obtained following the patient's informed consent for participation in the trial. Eligible patients were then randomly assigned to receive four cycles of either doxorubicin (75 mg/m² body-surface area) or docetaxel (100 mg/m² body-surface area) every 3 weeks followed by surgery.
- The adjuvant cohort consisted of 825 tumor samples from the GEICAM/9906 phase III clinical trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by paclitaxel. In this trial, the enrolled women presented with locally advanced primary invasive breast cancer.

Clinical-pathological information associated with the samples is based on the College of American Pathology (CAP) and American Joint Committee on Cancer (AJCC) standards at the time of collection. All samples were scored at a single site by IHC for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Her2/neu (HER2) protein expression. Equivocal HER2 cases were confirmed by chromogenic in situ hybridization (CISH).

3.2. Definition of breast cancer subtypes

To classify the “intrinsic” molecular subtypes of breast cancer a minimal gene set as described by Parker (2009) was used for the adjuvant cohort, while the PAM50 RT-qPCR assay was used for the neoadjuvant cohort.

Tumors were also classified into molecular intrinsic subtypes based on an immune panel of four IHC/FISH biomarkers: Luminal A: ER+ and/or PR+, HER2-, KI67<13%; Luminal B: ER+ and/or PR+, and either HER2+ or KI67≥14%; HER2: ER- and PR-, HER2+; Triple-negative: ER-, PR-, and HER2-.

3.3. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Analysis chi-square Pearson was used to investigate the association between categorical variables. A *p-value* of less than 0.05 ($p<0.05$) was considered as statistically significant. Concordance between IHC and molecular subtyping was assessed by the percentage of concordance and by the kappa statistics test. The kappa (K) statistic can be considered as the rate of non-chance agreement. K can vary from 1 (maximal agreement rate) to 0.

4. RESULTS

4.1. Patients characteristics

A total of 125 patients were included in the neoadjuvant cohort; the median age was 53.9 years (range, 27-83 years) and the majority of patients were postmenopausal (54.4%) and had ductal carcinomas (83.2%). Seven carcinomas were grade 1 (5.6%), 62 were grade 2 (49.6%) and 52 were grade 3 (41.6%). Forty-four patients (35.2%) were diagnosed with stage disease and 81 patients (64.8%) were diagnosed with stage disease. The positive rate of ER, PR and HER2 was 64.8%, 52% and 34.4% respectively. With a cut-off value of ≥14% positively stained tumor cells for Ki67, most of the tumors (71.2%) were classified as having a high level of Ki67 proliferation. Sixteen patients (12.8%) achieved a pCR.

Final analysis included 825 invasive breast cancer subjects identified in the adjuvant study. The mean age of all subjects was 51.2 years and 46.1% were postmenopausal. The majority of patients were T2 (52.6%) or T1 (41.5%), and 61.6% of patients were N1. Mastectomy was indicated in 488 patients whereas breast-conserving therapy was indicated in the remaining 40,8% of women. Invasive ductal carcinoma, not otherwise specified (NOS), was the most common histological diagnosis having been made in 90.08% (708/825) of cases. One hundred and nine carcinomas were grade 1 (13.3%), 335 were grade 2 (40.6%) and 317 were grade 3 (38.4%). Most tumors, 78.1% (644/825) were estrogen receptor positive, while 21% (173/825) were estrogen receptor negative. The estrogen receptor status was unknown in 1% of cases (8/825). Slightly fewer tumors, 69.1% (570/825) were progesterone receptor positive, while 29.8% (246/825) were progesterone receptor negative. Progesterone receptor status was unknown in 1.1% of tumors (9/825). 84.4% of tumors were HER2 negative while 14.2% stained positive and the staining characteristics of the remaining 1.5% were not known. With a cut-off value of $\geq 14\%$ positively stained tumor cells for Ki67, most of the tumors (68.7%) were classified as having a high level of Ki67 proliferation.

4.2. IHC and molecular subtypes

Out of 125 subjects in the neoadjuvant cohort, 26 patients (20.8%) were luminal A, 55 (44%) were luminal B, 14 (11.2%) were HER2 subtype and 30 (24%) were triple-negative by IHC.

According to the standard clinical molecular markers the majority of the tumors in the adjuvant cohort - 443 patients (53.7%) - were luminal type A, 213 (25.8%) were luminal type B, 100 (12.1%) were triple-negative and the remaining 5.1% were HER2 subtype.

The distribution of molecular subtypes in the neoadjuvant set was comprised of 30 luminal A, 33 luminal B, 18 HER2-enriched, 20 basal-like and 24 normal-like subtypes. In the adjuvant cohort the subtypes were distributed as follows: 278 luminal A, 264 luminal B, 176 HER2-enriched, 71 basal-like and 31 normal-like.

4.3. Concordance between gene-expression method and IHC markers panel

Only fair agreement between both methods of classification was recorded, not only in neoadjuvant but also in adjuvant settings (kappa=0.34 and 0.37, respectively). In the neoadjuvant study, luminal A intrinsic subtype showed the highest rate of agreement between PAM50-IHC (57.7%) followed by HER2 subtype (57.1%). Of the five molecular subtypes, only luminal A cancers consistently showed almost-perfect agree-

ement (86.5%) in adjuvant setting. Basal-like tumors showed 79.4% of agreement and HER2-enriched was the subtype which accumulated the most discrepancies (in 82.1% of cases).

5. CONCLUSION

According to the results obtained in this study, the comparison of the intrinsic subtype classification of breast carcinoma by IHC to tumor gene-expression is merely approximate. Assumptions of their equivalence may result in inappropriate choices of treatment or worse prognoses for patients.

bibliografía

TESIS DOCTORAL

bib

liog

rafía

- [1] J. Ferlay, H.-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin, "GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10," *International Agency for Research on Cancer*, 2010. [Online]. Available: <http://globocan.iarc.fr>.
- [2] "Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2006," *Instituto Nacional de Estadística*, p. 4, 2008.
- [3] M. Pollán, M. J. García-Mendizabal, B. Pérez-Gómez, N. Aragonés, R. Pastor, R. Ramis, P. Fernández, J. García-Pérez, E. Boldo, and S. Pérdomo, "SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA EN ESPAÑA," *Mortality*, vol. 4, pp. 231–248, 2007.
- [4] M. P. Coleman, "EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century," *Annals of Oncology*, vol. 14, no. 90005, p. 128v–149, 2003.
- [5] F. Levi, C. Bosetti, F. Lucchini, E. Negri, and C. La Vecchia, "Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe.," *European journal of cancer prevention the official journal of the European Cancer Prevention Organisation ECP*, vol. 14, no. 6, pp. 497–502, 2005.
- [6] M. Pollán, R. Ramis, N. Aragonés, B. Pérez-Gómez, D. Gómez, V. Lope, J. García-Pérez, J. M. Carrasco, M. J. García-Mendizabal, and G. López-Abente, "Municipal distribution of breast cancer mortality among women in Spain," *BMC Cancer*, vol. 7, p. 78, 2007.
- [7] B. Fisher, J. Dignam, E. Tan-Chiu, S. Anderson, E. R. Fisher, J. L. Wittliff, and N. Wolmark, "Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes.," *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 93, no. 2, pp. 112–120, 2001.
- [8] C. L. Carter, C. Allen, and D. E. Henson, "Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases.," *Cancer*, vol. 63, no. 1, pp. 181–187, 1989.
- [9] G. C. Harris, H. E. Denley, S. E. Pinder, A. H. S. Lee, I. O. Ellis, C. W. Elston, and A. Evans, "Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma.," *The American journal of surgical pathology*, vol. 27, no. 1, pp. 11–15, 2003.
- [10] A. Urruticoechea, I. E. Smith, and M. Dowsett, "Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 28, pp. 7212–7220, 2005.
- [11] R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin, M. M. Hayes, and K. A. Gelmon, "Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential.," *The lancet oncology*, vol. 11, no. 2, pp. 174–183, 2010.
- [12] R. Stuart-Harris, C. Caldas, S. E. Pinder, and P. Pharoah, "Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients.," *Breast Edinburgh Scotland*, vol. 17, no. 4, pp. 323–334, 2008.
- [13] F. Genta, C. Desanctis, B. Ghiringhello, G. Botta, and P. Sismondi, "Peritumoral blood and lymphatic vessel invasion as a prognostic indicator in stage-I breast-carcinoma.," *International Journal of Oncology*, vol. 4, no. 1, pp. 163–167, 1994.

- [14] B. Fisher, M. Bauer, D. L. Wickerham, C. K. Redmond, E. R. Fisher, A. B. Cruz, R. Foster, B. Gardner, H. Lerner, and R. Margolese, "Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update.," 1983.
- [15] R. A. Saez, W. L. McGuire, and G. M. Clark, "Prognostic factors in breast cancer.," *Seminars in Surgical Oncology*, vol. 3, no. 2, pp. 102–110, 1989.
- [16] H. E. Karim-Kos, E. De Vries, I. Soerjomataram, V. Lemmens, S. Siesling, and J. W. Coebergh, "Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s," *European Journal of Cancer*, vol. 44, no. 10, pp. 1345–1389, 2008.
- [17] R. Schmidt-Ullrich, D. E. Wazer, O. Tercilla, H. Safaii, D. J. Marchant, T. J. Smith, M. A. Homer, and N. J. Robert, "Tumor margin assessment as a guide to optimal conservation surgery and irradiation in early stage breast carcinoma.," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, vol. 17, no. 4, pp. 733–738, 1989.
- [18] M. Martín, F. González Palacios, J. Cortés, J. De La Haba, and J. Schneider, "Prognostic and predictive factors and genetic analysis of early breast cancer.," *Clinical translational oncology official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, vol. 35, no. 3, pp. 634–642, 2010.
- [19] C. K. Osborne, "Steroid hormone receptors in breast cancer management," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 51, no. 3, pp. 227–238, 1998.
- [20] D. A. Berry, C. Cirrincione, I. C. Henderson, M. L. Citron, D. R. Budman, L. J. Goldstein, S. Martino, E. A. Perez, H. B. Muss, L. Norton, C. Hudis, and E. P. Winer, "Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer.," *Jama The Journal Of The American Medical Association*, vol. 295, no. 14, pp. 1658–1667, 2006.
- [21] D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, and W. L. McGuire, "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.," *Science*, vol. 235, no. 4785, pp. 177–182, 1987.
- [22] J. Ross and J. Fletcher, "The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy.," *The oncologist*, vol. 3, no. 4, pp. 237–252, 1998.
- [23] A. Goldhirsch, W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thürlimann, and H. J. Senn, "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009," *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*, vol. 22, no. 8, pp. 1736–1747, 2011.
- [24] G. D'Eredita', C. Giardina, M. Martellotta, T. Natale, and F. Ferrarese, "Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution," *EurJCancer*, vol. 37, no. 0959–8049 (Print) LA - eng PT - Journal Article SB - IM, pp. 591–596, 2001.

- [25] R. W. Carlson, D. C. Allred, B. O. Anderson, H. J. Burstein, W. B. Carter, S. B. Edge, J. K. Erban, W. B. Farrar, A. Forero, S. H. Giordano, L. J. Goldstein, W. J. Gradishar, D. F. Hayes, C. A. Hudis, B.-M. Ljung, D. A. Mankoff, P. K. Marcom, I. A. Mayer, B. McCormick, L. J. Pierce, E. C. Reed, J. Sachdev, M. Lou Smith, G. Somlo, J. H. Ward, A. C. Wolff, and R. Zellars, "Invasive breast cancer.," *Journal of the National Comprehensive Cancer Network JNCCN*, vol. 9, no. 2, pp. 136–222, 2011.
- [26] P. M. Ravdin, L. A. Siminoff, G. J. Davis, M. B. Mercer, J. Hewlett, N. Gerson, and H. L. Parker, "Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 19, no. 4, pp. 980–991, 2001.
- [27] I. A. Olivotto, C. D. Bajdik, P. M. Ravdin, C. H. Speers, A. J. Coldman, B. D. Norris, G. J. Davis, S. K. Chia, and K. A. Gelmon, "Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 12, pp. 2716–2725, 2005.
- [28] L. W. Engel, "The Human Genome Project. History, goals, and progress to date.," *Archives of pathology laboratory medicine*, vol. 117, no. 5, pp. 459–465, 1993.
- [29] Z. G. Goldsmith and N. Dhanasekaran, "The microrevolution: applications and impacts of microarray technology on molecular biology and medicine (review).," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 13, no. 4, pp. 483–495, 2004.
- [30] D. P. Harkin, "Uncovering functionally relevant signaling pathways using microarray-based expression profiling.," *The oncologist*, vol. 5, no. 6, pp. 501–507, 2000.
- [31] K. Polyak and G. J. Riggins, "Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 19, no. 11, pp. 2948–2958, 2001.
- [32] C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. Van De Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown, and D. Botstein, "Molecular portraits of human breast tumours.," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, 2000.
- [33] P. Tang, J. Wang, and P. Bourne, "Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same?," *Human Pathology*, vol. 39, no. 4, pp. 506–513, 2008.
- [34] T. Sørlie, Y. Wang, C. Xiao, H. Johnsen, B. Naume, R. R. Samaha, and A.-L. Børresen-Dale, "Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms," *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1471–2164 [Electronic] LA - eng PT - *Journal Article RN - 0* (Tumor Markers, Biological) SB - IM, p. 127, 2006.
- [35] E. Lim, F. Vaillant, D. Wu, N. C. Forrest, B. Pal, A. H. Hart, M.-L. Asselin-Labat, D. E. Gyorki, T. Ward, A. Partanen, F. Feleppa, L. I. Huschtscha, H. J. Thorne, S. B. Fox, M. Yan, J. D. French, M. A. Brown, G. K. Smyth, J. E. Visvader, and G. J. Lindeman, "Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers.," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 907–913, 2009.

- [36] H. Nakshatri, E. F. Srouf, and S. Badve, "Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on," *Current stem cell research therapy*, vol. 4, pp. 50–60, 2009.
- [37] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 7, pp. 3983–3988, 2003.
- [38] M. Shipitsin, L. L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, J. Yao, T. Nikolskaya, T. Serebryiskaya, R. Beroukhim, M. Hu, M. K. Halushka, S. Sukumar, L. M. Parker, K. S. Anderson, L. N. Harris, J. E. Garber, A. L. Richardson, S. J. Schnitt, Y. Nikolsky, R. S. Gelman, and K. Polyak, "Molecular definition of breast tumor heterogeneity," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 259–273, 2007.
- [39] J. C. Miecznikowski, D. Wang, S. Liu, L. Sucheston, and D. Gold, "Comparative survival analysis of breast cancer microarray studies identifies important prognostic genetic pathways," *BMC Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 573, 2010.
- [40] E. A. Raetz and P. J. Moos, "Impact of microarray technology in clinical oncology," *Cancer Investigation*, vol. 22, no. 2, pp. 312–320, 2004.
- [41] Nci, "TCGA PORTAL," *Access*, 2009.
- [42] S. Paik, S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F. L. Baehner, M. G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E. R. Fisher, D. L. Wickerham, J. Bryant, and N. Wolmark, "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer," 2004.
- [43] M. A. Cobleigh, B. Tabesh, P. Bitterman, J. Baker, M. Cronin, M.-L. Liu, R. Borchik, J.-M. Mosquera, M. G. Walker, and S. Shak, "Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 24 Pt 1, pp. 8623–8631, 2005.
- [44] J. Esteban, J. Baker, M. Cronin, M.-L. Liu, M. G. Llamas, M. G. Walker, R. Mena, and S. Shak, "Tumor gene expression and prognosis in breast cancer: Multi-gene RT-PCR assay of paraffin-embedded tissue," in *Prog Proc Am Soc Clin Oncol*, 2003, vol. 22, pp. 850–850.
- [45] L. J. Van 't Veer, H. Dai, M. J. Van De Vijver, Y. D. He, A. A. M. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. Van Der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven, C. Roberts, P. S. Linsley, R. Bernards, and S. H. Friend, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature*, vol. 415, no. 6871, pp. 530–6, 2002.
- [46] M. J. Van De Vijver, Y. D. He, L. J. Van't Veer, H. Dai, A. A. M. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen, A. Glas, L. Delahaye, T. Van Der Velde, H. Bartelink, S. Rodenhuis, E. T. Rutgers, S. H. Friend, and R. Bernards, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 25, pp. 1999–2009, 2002.
- [47] J. A. Zujewski and L. Kamin, "Trial assessing individualized options for treatment for breast cancer: the TAILORx trial," *Future oncology London England*, vol. 4, no. 5, pp. 603–610, 2008.

- [48] F. Cardoso, L. Van't Veer, E. Rutgers, S. Loi, S. Mook, and M. J. Piccart-Gebhart, "Clinical application of the 70-gene profile: the MIN-DACT trial.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 5, pp. 729–735, 2008.
- [49] J. S. Parker, M. Mullins, M. C. U. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J. F. Quackenbush, I. J. Stijleman, J. Palazzo, J. S. Marron, A. B. Nobel, E. Mardis, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, C. M. Perou, and P. S. Bernard, "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 8, pp. 1160–1167, 2009.
- [50] M. C. U. Cheang, S. K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider, M. Watson, S. Davies, P. S. Bernard, J. S. Parker, C. M. Perou, M. J. Ellis, and T. O. Nielsen, "Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer," *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 10, pp. 736–750, 2009.
- [51] J. Hugh, J. Hanson, M. C. U. Cheang, T. O. Nielsen, C. M. Perou, C. Dumontet, J. Reed, M. Krajewska, I. Treilleux, M. Rupin, E. Magherini, J. Mackey, M. Martin, and C. Vogel, "Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 8, pp. 1168–1176, 2009.
- [52] M. Martin, A. Romero, M. C. U. Cheang, J. A. López García-Asenjo, J. A. García-Saenz, B. Oliva, J. M. Román, X. He, A. Casado, J. De La Torre, V. Furio, J. Puente, T. Caldés, J. A. Vidart, S. Lopez-Tarruella, E. Diaz-Rubio, and C. M. Perou, "Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer.," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 128, no. 1, pp. 127–136, 2011.
- [53] M. Martín, A. Rodríguez-Lescure, A. Ruiz, E. Alba, L. Calvo, M. Ruiz-Borrego, A. Santaballa, C. A. Rodríguez, C. Crespo, M. Abad, S. Domínguez, J. Florián, C. Llorca, M. Méndez, M. Godes, R. Cubedo, A. Murias, N. Batista, M. J. García, R. Caballero, and E. De Alava, "Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer.," 2010.
- [54] *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal*, vol. 298. 1999, p. 43088.
- [55] S. J. Schnitt, "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy.," *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, vol. 23 Suppl 2, no. S2, pp. S60–S64, 2010.
- [56] C. W. Elston and I. O. Ellis, "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*, vol. 19, no. 5, pp. 403–410, 1991.
- [57] S. E. Singletary and F. L. Greene, "Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification.," *Seminars in Surgical Oncology*, vol. 21, no. 1, pp. 53–59, 2003.
- [58] M. E. H. Hammond, D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerthy, S. Badve, P. L. Fitzgibbons, G. Francis, N. S. Goldstein, M. Hayes, D. G. Hicks, S. Lester, R. Love, P. B. Mangu, L. McShane, K. Miller,

- C. K. Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano, J. N. Schwartz, F. C. G. Sweep, S. Taube, E. E. Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R. B. Williams, J. L. Wittliff, and A. C. Wolff, "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 16, pp. 2784–2795, 2010.
- [59] K. Feeney and G. Morris, "Hormonal Therapy of Breast Cancer: Introduction," *Seminars in Oncology*, vol. 33, no. 6, pp. 629–630, 2006.
- [60] J. Espinós, C. Reyna, S. De La Cruz, C. Oiler, A. Hernández, O. Fernández Hidalgo, M. Santisteban, and J. García Foncillas, "Hormonal therapy in breast cancer," *Revista De Medicina De La Universidad De Navarra*, vol. 52, no. 1, pp. 5–7, 1994.
- [61] J. C. L and L. V. D. E. L. P, "Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica : Coeficiente de Kappa," *Doctor*, vol. 79, no. 1, pp. 54–58, 2008.
- [62] A. López, D. U. Galparsoro, and P. Fernández, "Medidas de concordancia : el índice de Kappa," *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo A Coruña España*, pp. 2–6, 2001.
- [63] J. R. Landis and G. G. Koch, "The measurement of observer agreement for categorical data," *Biometrics*, vol. 33, no. 1, pp. 159–174, 1977.
- [64] A. Prat and C. M. Perou, "Deconstructing the molecular portraits of breast cancer," *Molecular oncology*, vol. 5, no. 1, pp. 5–23, 2011.
- [65] J. De Ronde, L. Wessels, and J. Wesseling, "Molecular subtyping of breast cancer: ready to use?," *The lancet oncology*, vol. 11, no. 4, pp. 306–7, 2010.
- [66] H. Jinno, S. Matsuda, T. Hayashida, M. Takahashi, M. Sakata, T. Ikeda, M. Mukai, and Y. Kitagawa, "Differential response from neoadjuvant chemotherapy across breast cancer subtypes," *Journal of Clinical Oncology Conference*, vol. 28, 2010.
- [67] S. P. Bagaria, P. S. Ray, J. Wang, L. Kropcho, A. Chung, M. S. Sim, J. M. Shamonki, S. Martino, X. Cui, and A. E. Giuliano, "Prognostic Value of Basal Phenotype in HER2-overexpressing Breast Cancer," *Annals of Surgical Oncology*, 2011.
- [68] L. A. Carey, E. C. Dees, L. Sawyer, L. Gatti, D. T. Moore, F. Collichio, D. W. Ollila, C. I. Sartor, M. L. Graham, and C. M. Perou, "The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 8, pp. 2329–2334, 2007.
- [69] J. M. Rosen and C. T. Jordan, "The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm," *Science*, vol. 324, no. 5935, pp. 1670–1673, 2009.
- [70] T. O. Nielsen, J. S. Parker, S. Leung, D. Voduc, M. Ebbert, T. Vickery, S. R. Davies, J. Snider, I. J. Stijleman, J. Reed, M. C. U. Cheang, E. R. Mardis, C. M. Perou, P. S. Bernard, and M. J. Ellis, "A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 21, pp. 5222–5232, 2010.

- [71] X. S. Chen, J. Y. Wu, O. Huang, C. M. Chen, J. Wu, J. S. Lu, Z. M. Shao, Z. Z. Shen, and K. W. Shen, "Molecular subtype can predict the response and outcome of Chinese locally advanced breast cancer patients treated with preoperative therapy.," *Oncology Reports*, vol. 19, no. 5, pp. 1149–1153, 2010.
- [72] A. Prat, M. J. Ellis, and C. M. Perou, "Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists.," *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 9, no. 1, pp. 48–57, 2011.
- [73] B. Weigelt, A. Mackay, R. A'hern, R. Natrajan, D. S. P. Tan, M. Dowsett, A. Ashworth, and J. S. Reis-Filho, "Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis.," *The lancet oncology*, vol. 11, no. 4, pp. 339–349, 2010.
- [74] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lonning, P. O. Brown, A. L. Borresen-Dale, and D. Botstein, "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 14, pp. 8418–8423, 2003.
- [75] Z. Hu, C. Fan, D. S. Oh, J. Marron, X. He, B. F. Qaqish, C. Livasy, L. A. Carey, E. Reynolds, L. Dressler, A. Nobel, J. Parker, M. G. Ewend, L. R. Sawyer, J. Wu, Y. Liu, R. Nanda, M. Tretiakova, A. R. Orrico, D. Dreher, J. P. Palazzo, L. Perreard, E. Nelson, M. Mone, H. Hansen, M. Mullins, J. F. Quackenbush, M. J. Ellis, O. I. Olopade, P. S. Bernard, and C. M. Perou, "The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms," *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1, p. 96, 2006.
- [76] Y. Wang, J. G. M. Klijn, Y. Zhang, A. M. Sieuwerts, M. P. Look, F. Yang, D. Talantov, M. Timmermans, M. E. Meijer-Van Gelder, J. Yu, T. Jatkoe, E. M. J. J. Berns, D. Atkins, and J. A. Foekens, "Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer.," *Lancet*, vol. 365, no. 9460, pp. 671–679, 2005.
- [77] C. Desmedt, F. Piette, S. Loi, Y. Wang, F. Lallemand, B. Haibe-Kains, G. Viale, M. Delorenzi, Y. Zhang, M. S. d'Assignies, J. Bergh, R. Lide-reau, P. Ellis, A. L. Harris, J. G. M. Klijn, J. A. Foekens, F. Cardoso, M. J. Piccart, M. Buyse, and C. Sotiriou, "Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series.," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 11, pp. 3207–3214, 2007.
- [78] T. O. Nielsen, F. D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan, L. Dressler, L. A. Akslen, J. Ragaz, A. M. Gown, C. B. Gilks, M. Van De Rijn, and C. M. Perou, "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 16, pp. 5367–5374, 2004.
- [79] C. A. Livasy, G. Karaca, R. Nanda, M. S. Tretiakova, O. I. Olopade, D. T. Moore, and C. M. Perou, "Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.," *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, vol. 19, no. 2, pp. 264–271, 2006.

- [80] D. M. Abd El-Rehim, G. Ball, S. E. Pinder, E. Rakha, C. Paish, J. F. R. Robertson, D. Macmillan, R. W. Blamey, and I. O. Ellis, "High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses.," *International journal of cancer Journal internationale du cancer*, vol. 116, no. 3, pp. 340–350, 2005.
- [81] D. Dunkler, S. Michiels, and M. Schemper, "Gene expression profiling: does it add predictive accuracy to clinical characteristics in cancer prognosis?," *European Journal of Cancer*, vol. 43, no. 4, pp. 745–751, 2007.
- [82] M. Dowsett, J. Cuzick, C. Wale, J. Forbes, E. Mallon, J. Salter, E. Quinn, A. Dunbier, M. Baum, A. Buzdar, A. Howell, R. Bugarini, F. Baehner, and S. Shak, "Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 11, pp. 1829–1834, 2010.
- [83] R. R. L. Bastien, A. Rodra-guez-Lescure, M. T. W. Ebbert, A. Prat, B. Munarriz, L. Rowe, P. Miller, M. Ruiz-Borrego, D. Anderson, B. Lyons, I. Alvarez, T. Dowell, D. Wall, M. A. Segui, L. Barley, K. M. Boucher, E. Alba, L. Pappas, C. A. Davis, I. Aranda, C. Fauron, I. J. Stijleman, J. Palacios, A. Antan, E. Carrasco, R. Caballero, M. J. Ellis, T. O. Nielsen, C. M. Perou, M. Astill, P. S. Bernard, and M. Martí-n, "PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-qPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers," *BMC Medical Genomics*. p. 44, 2012.
- [84] S. K. Chia, V. Bramwell-Wesley, D. Tu, L. Shepherd, S. Jiang, T. Vickery, E. Mardis, S. Leung, K. Ung, K. I. Pritchard, J. Parker, P. S. Bernard, C. M. Perou, M. J. Ellis, and T. O. Nielsen, "A 50 Gene Intrinsic Subtype Classifier for Prognosis and Prediction of Benefit from Adjuvant Tamoxifen.," *Clinical Cancer Research*, pp. 4465–4472, 2012.
- [85] V. H. C. Bramwell, K. I. Pritchard, D. Tu, K. Tonkin, H. Vachhrajani, T. A. Vandenberg, J. Robert, A. Arnold, S. E. O'Reilly, B. Graham, and L. Shepherd, "A randomized placebo-controlled study of tamoxifen after adjuvant chemotherapy in premenopausal women with early breast cancer (National Cancer Institute of Canada—Clinical Trials Group Trial, MA.12)," *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*, vol. 21, no. 2, pp. 283–290, 2010.
- [86] A. Prat, J. S. Parker, C. Fan, M. C. U. Cheang, L. D. Miller, J. Bergh, S. K. Chia, P. S. Bernard, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, L. A. Carey, and C. M. Perou, "Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen.," *Annals of Oncology*, 2012.
- [87] P. Tang, K. A. Skinner, and D. G. Hicks, "Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready?," *Diagnostic molecular pathology the American journal of surgical pathology part B*, vol. 18, no. 3, pp. 125–132, 2009.
- [88] A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred, R. J. Cote, M. Dowsett, P. L. Fitzgibbons, W. M. Hanna, A. Lan-

- ger, L. M. McShane, S. Paik, M. D. Pegram, E. A. Perez, M. F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S. E. Taube, R. Tubbs, G. H. Vance, M. Van De Vijver, T. M. Wheeler, and D. F. Hayes, "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.," *Archives of pathology laboratory medicine*, vol. 131, no. 1, pp. 18–43, 2007.
- [89] A. Rhodes, B. Jasani, A. J. Balaton, D. M. Barnes, and K. D. Miller, "Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening.," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 53, no. 9, pp. 688–696, 2000.
- [90] A. Rhodes, B. Jasani, D. M. Barnes, L. G. Bobrow, and K. D. Miller, "Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems.," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 53, no. 2, pp. 125–130, 2000.
- [91] A. M. Gown, "Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer.," *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, vol. 21 Suppl 2, no. Suppl 2, pp. S8–S15, 2008.
- [92] M. A. Owens, B. C. Horten, and M. M. Da Silva, "HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues.," *Clinical Breast Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 63–69, 2004.
- [93] H. Yaziji, L. C. Goldstein, T. S. Barry, R. Werling, H. Hwang, G. K. Ellis, J. R. Gralow, R. B. Livingston, and A. M. Gown, "HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods.," *Jama The Journal Of The American Medical Association*, vol. 291, no. 16, pp. 1972–1977, 2004.
- [94] J. M. Harvey, G. M. Clark, C. K. Osborne, and D. C. Allred, "Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 5, pp. 1474–1481, 1999.
- [95] M. Dowsett, J. Cuzick, C. Wale, T. Howell, J. Houghton, and M. Baum, "Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 30, pp. 7512–7517, 2005.
- [96] M. Confortini, F. Carozzi, L. Bozzola, G. Miccinesi, F. Mirri, M. Mottolese, D. Noferini, R. Nizzoli, G. Tinacci, A. Vocaturo, M. Zappa, and C. Maddau, "Interlaboratory reproducibility of the immunocytochemical assessment of oestrogen and progesterone receptors and proliferative activity in fine needle aspiration of breast cancer.," *Cytopathology official journal of the British Society for Clinical Cytology*, vol. 13, no. 2, pp. 92–100, 2002.

- [97] D. C. Allred, S. J. Anderson, S. Paik, D. L. Wickerham, I. D. Nagtegaal, S. M. Swain, E. P. Mamounas, T. B. Julian, C. E. Geyer, J. P. Costantino, S. R. Land, and N. Wolmark, "Adjuvant Tamoxifen Reduces Subsequent Breast Cancer in Women With Estrogen Receptor-Positive Ductal Carcinoma in Situ: A Study Based on NSABP Protocol B-24.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 12, pp. 1268–73, 2012.
- [98] M. C. U. Cheang, D. O. Treaba, C. H. Speers, I. A. Olivotto, C. D. Bajdik, S. K. Chia, L. C. Goldstein, K. A. Gelmon, D. Huntsman, C. B. Gilks, T. O. Nielsen, and A. M. Gown, "Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 36, pp. 5637–5644, 2006.
- [99] N. S. Goldstein, M. Ferkowicz, E. Odish, A. Mani, and F. Hastah, "Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma.," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 120, no. 1, pp. 86–92, 2003.
- [100] M. J. Piccart-Gebhart, M. Procter, B. Leyland-Jones, A. Goldhirsch, M. Untch, I. Smith, L. Gianni, J. Baselga, R. Bell, C. Jackisch, D. Cameron, M. Dowsett, C. H. Barrios, G. Steger, C. S. Huang, M. Anderson, M. Inbar, M. Lichinitser, I. Lang, U. Nitz, H. Iwata, C. Thomssen, C. Lohrisch, T. M. Suter, J. Ruschoff, T. Suto, V. Greatorex, C. Ward, C. Straehle, E. McFadden, M. S. Dolci, and R. D. Gelber, "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 16, pp. 1659–1672, 2005.
- [101] E. H. Romond, E. A. Perez, J. Bryant, V. J. Suman, C. E. Geyer, N. E. Davidson, E. Tan-Chiu, S. Martino, S. Paik, P. A. Kaufman, S. M. Swain, T. M. Pisansky, L. Fehrenbacher, L. A. Kutteh, V. G. Vogel, D. W. Visscher, G. Yothers, R. B. Jenkins, A. M. Brown, S. R. Dakhil, E. P. Mamounas, W. L. Lingle, P. M. Klein, J. N. Ingle, and N. Wolmark, "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.," *Massachusetts Medical Society*, 2005.
- [102] M. F. Press, G. Hung, W. Godolphin, and D. J. Slamon, "Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression.," *Cancer Research*, vol. 54, no. 10, pp. 2771–2777, 1994.
- [103] H. Yamauchi, V. Stearns, and D. F. Hayes, "When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 19, no. 8, pp. 2334–2356, 2001.
- [104] F. Penault-Llorca, J. Adelaide, G. Houvenaeghel, J. Hassoun, D. Birnbaum, and J. Jacquemier, "Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation.," *The Journal of pathology*, vol. 173, no. 1, pp. 65–75, 1994.
- [105] S. Paik, J. Bryant, E. Tan-Chiu, E. Romond, W. Hiller, K. Park, A. Brown, G. Yothers, S. Anderson, R. Smith, D. L. Wickerham, and N. Wolmark, "Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience.," *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 94, no. 11, pp. 852–854, 2002.

- [106] P. C. Roche, V. J. Suman, R. B. Jenkins, N. E. Davidson, S. Martino, P. A. Kaufman, F. K. Addo, B. Murphy, J. N. Ingle, and E. A. Perez, "Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831.," *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 94, no. 11, pp. 855–857, 2002.
- [107] J. Todd, C. Dowle, M. Williams, C. Elston, I. Ellis, C. Hinton, R. Blamey, and J. Haybittle, "Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer," *Br J Cancer*, vol. 56, no. 4, pp. 489–492, 1987.
- [108] E. J. T. Rutgers, J. W. R. Nortier, M. K. Tuut, G. Van Tienhoven, H. Struikmans, M. Bontenbal, M. F. Von Meyenfeldt, G. Vreugdenhil, T. Benraadt, B. Garssen, and J. L. Peterse, "Dutch Institute for Healthcare Improvement guideline, 'Treatment of breast cancer'," *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, vol. 146, no. 45, pp. 2144–2151, 2002.
- [109] L. Pusztai, M. Ayers, J. Stec, E. Clark, K. Hess, D. Stivers, A. Damokosh, N. Sneige, T. A. Buchholz, F. J. Esteva, B. Arun, M. Cristofanilli, D. Booser, M. Rosales, V. Valero, C. Adams, G. N. Hortobagyi, and W. F. Symmans, "Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors.," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 7, pp. 2406–2415, 2003.
- [110] S. A. Eccles and D. R. Welch, "Metastasis : recent discoveries and novel treatment strategies," *Cancer Research*, vol. 369, no. 9574, pp. 1742–1757, 2008.
- [111] M. Buyse, S. Loi, L. Van't Veer, G. Viale, M. Delorenzi, A. M. Glas, M. S. D'Assignies, J. Bergh, R. Lidereau, P. Ellis, A. Harris, J. Bogaerts, P. Therasse, A. Floore, M. Amakrane, F. Piette, E. Rutgers, C. Sotiropoulos, F. Cardoso, and M. J. Piccart, "Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer.," *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 98, no. 17, pp. 1183–1192, 2006.
- [112] S. Mook, M. K. Schmidt, G. Viale, G. Pruneri, I. Eekhout, A. Floore, A. M. Glas, J. Bogaerts, F. Cardoso, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, and L. J. Van't Veer, "The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study.," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 116, no. 2, pp. 295–302, 2009.
- [113] L. A. Habel, S. Shak, M. K. Jacobs, A. Capra, C. Alexander, M. Pho, J. Baker, M. Walker, D. Watson, J. Hackett, N. T. Blick, D. Greenberg, L. Fehrenbacher, B. Langholz, and C. P. Quesenberry, "A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients," *Breast Cancer Research*, vol. 8, no. 3, p. R25, 2006.
- [114] F. J. Esteva, A. A. Sahin, M. Cristofanilli, K. Coombes, S.-J. Lee, J. Baker, M. Cronin, M. Walker, D. Watson, S. Shak, and G. N. Hortobagyi, "Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy.," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 9, pp. 3315–3319, 2005.

- [115] E. P. Mamounas, G. Tang, B. Fisher, S. Paik, S. Shak, J. P. Costantino, D. Watson, C. E. Geyer, D. L. Wickerham, and N. Wolmark, "Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 10, pp. 1677–1683, 2010.
- [116] G. Tang, J. Cuzick, J. P. Costantino, M. Dowsett, J. F. Forbes, M. Crager, E. P. Mamounas, S. Shak, and N. Wolmark, "Risk of Recurrence and Chemotherapy Benefit for Patients With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Recurrence Score Alone and Integrated With Pathologic and Clinical Factors.," *Journal of Clinical Oncology*, 2011.
- [117] M. Ellis and Et Al., "A Randomized Neoadjuvant Comparison between Letrozole (LET), Anastrozole (ANA) and Exemestane (EXE) for Postmenopausal Women with ER Rich Stage 2/3 Breast Cancer: Biomarker Outcomes and the Predictive Value of the Baseline PAM50 Based Intrinsic Subtype," *Presented at the 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium*, p. Abstract S1–2, 2010.
- [118] M. T. W. Ebbert, R. R. L. Bastien, K. M. Boucher, M. Martin, E. Carrasco, R. Caballero, I. J. Stijleman, P. S. Bernard, and J. C. Facelli, "Characterization of uncertainty in the classification of multivariate assays: application to PAM50 centroid-based genomic predictors for breast cancer treatment plans.," *Journal of clinical bioinformatics*, vol. 1, no. 1, p. 37, 2011.
- [119] C. Sotiriou, S.-Y. Neo, L. M. McShane, E. L. Korn, P. M. Long, A. Jazaeri, P. Martiat, S. B. Fox, A. L. Harris, and E. T. Liu, "Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 18, pp. 10393–10398, 2003.
- [120] A. V Kapp, S. S. Jeffrey, A. Langerød, A.-L. Børresen-Dale, W. Han, D.-Y. Noh, I. R. Bukholm, M. Nicolau, P. O. Brown, and R. Tibshirani, "Discovery and validation of breast cancer subtypes," *BMC Genomics*, vol. 7, no. 2000, p. 231, 2006.
- [121] B. Naume, X. Zhao, M. Synnestvedt, E. Borgen, H. G. Russnes, O. C. Lingjaerde, M. Strømberg, G. Wiedswang, G. Kvalheim, R. Kåresen, J. M. Nesland, A.-L. Børresen-Dale, and T. Sørli, "Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer.," *Molecular oncology*, vol. 1, no. 2, pp. 160–171, 2007.
- [122] C. Fan, D. S. Oh, L. Wessels, B. Weigelt, D. S. A. Nuyten, A. B. Nobel, L. J. Van't Veer, and C. M. Perou, "Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer.," *The New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 6, pp. 560–569, 2006.
- [123] S. Loi, B. Haibe-Kains, C. Desmedt, F. Lallemand, A. M. Tutt, C. Gillet, P. Ellis, A. Harris, J. Bergh, J. A. Foekens, J. G. M. Klijn, D. Larsimont, M. Buyse, G. Bontempi, M. Delorenzi, M. J. Piccart, and C. Sotiriou, "Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no. 10, pp. 1239–1246, 2007.

- [124] W. D. Foulkes, J.-S. Brunet, I. M. Stefansson, O. Straume, P. O. Chappuis, L. R. Bégin, N. Hamel, J. R. Goffin, N. Wong, M. Trudel, L. Kapusta, P. Porter, and L. A. Akslen, "The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer.," *Cancer Research*, vol. 64, no. 3, pp. 830–835, 2004.
- [125] C. Sotiriou, L. Pusztai, T. New, and B. Feb, "Gene-Expression Signatures in Breast Cancer Molecular Origins of Cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 8, p. 790, 2009.
- [126] W. D. Foulkes, I. M. Stefansson, O. Straume, P. O. Chappuis, L. R. Be, N. Hamel, J. R. Goffin, N. Wong, M. Trudel, L. Kapusta, P. Porter, L. A. Akslen, E. Donato, and L. Kapusata, "Advances in Brief The Prognostic Implication of the Basal-Like (Cyclin E high / p27 low / p53 / BRCA1-Related Breast Cancer," *Cancer Research*, vol. 64, no. 5, pp. 830 – 835, 2004.
- [127] C. Sotiriou and L. Pusztai, "106544^^MOLECULAR ORIGINS OF CANCER Gene-Expression Signatures in Breast Cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 8, p. 790, 2009.
- [128] R. Bhargava, S. Beriwal, D. J. Dabbs, U. Ozbek, A. Soran, R. R. Johnson, A. M. Brufsky, B. C. Lembersky, and G. M. Ahrendt, "Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases.," *Cancer*, vol. 116, no. 6, pp. 1431–1439, 2010.
- [129] G. Tang, S. Shak, S. Paik, S. J. Anderson, J. P. Costantino, C. E. Geyer, E. P. Mamounas, D. L. Wickerham, and N. Wolmark, "Comparison of the prognostic and predictive utilities of the 21-gene Recurrence Score assay and Adjuvant! for women with node-negative, ER-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20.," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 127, no. 1, pp. 133–142, 2011.
- [130] B. Leyland-Jones, "Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and central nervous system metastases.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 31, pp. 5278–5286, 2009.
- [131] M. J. Piccart-Gebhart, "Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn.," *European Journal of Cancer*, vol. 42, no. 12, pp. 1715–1719, 2006.
- [132] F. M. Blows, K. E. Driver, M. K. Schmidt, A. Broeks, F. E. Van Leeuwen, J. Wesseling, M. C. Cheang, K. Gelmon, T. O. Nielsen, C. Blomqvist, P. Heikkilä, T. Heikkinen, H. Nevanlinna, L. A. Akslen, L. R. Bégin, W. D. Foulkes, F. J. Couch, X. Wang, V. Cafourek, J. E. Olson, L. Baglietto, G. G. Giles, G. Severi, C. A. McLean, M. C. Southey, E. Rakha, A. R. Green, I. O. Ellis, M. E. Sherman, J. Lissowska, W. F. Anderson, A. Cox, S. S. Cross, M. W. R. Reed, E. Provenzano, S.-J. Dawson, A. M. Dunning, M. Humphreys, D. F. Easton, M. García-Closas, C. Caldas, P. D. Pharoah, and D. Huntsman, "Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies," *PLoS Medicine*, vol. 7, no. 5, p. 12, 2010.

- [133] C. M. Perou, "Molecular stratification of triple-negative breast cancers.," *The oncologist*, vol. 15 Suppl 5, no. suppl 5, pp. 61–70, 2010.
- [134] N. C. Turner and J. S. Reis-Filho, "Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype.," *Oncogene*, vol. 25, no. 43, pp. 5846–5853, 2006.
- [135] A. L. Richardson, Z. C. Wang, A. De Nicolo, X. Lu, M. Brown, A. Miron, X. Liao, J. D. Iglehart, D. M. Livingston, and S. Ganesan, "X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer.," *Cancer Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 121–132, 2006.
- [136] S. A. Vaziri, L. M. Krumroy, P. Elson, G. T. Budd, G. Darlington, J. Myles, R. R. Tubbs, and G. Casey, "Breast tumor immunophenotype of BRCA1-mutation carriers is influenced by age at diagnosis.," *Clinical Cancer Research*, vol. 7, no. 7, pp. 1937–1945, 2001.
- [137] W. D. Foulkes, "Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer," *CancerSpectrum Knowledge Environment*, vol. 95, no. 19, pp. 1482–1485, 2003.
- [138] J. S. Reis-Filho, K. Savage, M. B. K. Lambros, M. James, D. Steele, R. L. Jones, and M. Dowsett, "Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis.," *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, vol. 19, no. 7, pp. 999–1009, 2006.
- [139] S. A. J. Vaziri, R. R. Tubbs, G. Darlington, and G. Casey, "Absence of CCND1 gene amplification in breast tumours of BRCA1 mutation carriers," *Molecular pathology MP*, vol. 54, no. 4, pp. 259–263, 2001.
- [140] E. H. Van Beers, T. Van Welsem, L. F. A. Wessels, Y. Li, R. A. Oldenburg, P. Devilee, C. J. Cornelisse, S. Verhoef, F. B. L. Hogervorst, L. J. Van't Veer, and P. M. Nederlof, "Comparative genomic hybridization profiles in human BRCA1 and BRCA2 breast tumors highlight differential sets of genomic aberrations.," *Cancer Research*, vol. 65, no. 3, pp. 822–827, 2005.
- [141] L. F. A. Wessels, T. Van Welsem, A. A. M. Hart, L. J. Van't Veer, M. J. T. Reinders, and P. M. Nederlof, "Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors.," *Cancer Research*, vol. 62, no. 23, pp. 7110–7117, 2002.
- [142] M. Esteller, J. M. Silva, G. Dominguez, F. Bonilla, X. Matias-Guiu, E. Lerma, E. Bussaglia, J. Prat, I. C. Harkes, E. A. Repasky, E. Gabrielson, M. Schutte, S. B. Baylin, and J. G. Herman, "Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.," *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 92, no. 7, pp. 564–569, 2000.
- [143] J. I. Herschkowitz, K. Simin, V. J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K. E. Rasmussen, L. P. Jones, S. Assefnia, S. Chandrasekharan, M. G. Backlund, Y. Yin, A. I. Khramtsov, R. Bastein, J. Quackenbush, R. I. Glazer, P. H. Brown, J. E. Green, L. Kopelovich, P. A. Furth, J. P. Palazzo, O. I. Olopade, P. S. Bernard, G. A. Churchill, T. Van Dyke, and C. M. Perou, "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors," *Genome Biology*, vol. 8, no. 5, p. R76, 2007.

- [144] A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He, and C. M. Perou, "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer," *Breast cancer research BCR*, vol. 12, no. 5, p. R68, 2010.
- [145] C. J. Creighton, X. Li, M. Landis, J. M. Dixon, V. M. Neumeister, A. Sjolund, D. L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J. I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M. C. Gutierrez, L. Renshaw, A. A. Larionov, D. Faratian, S. G. Hilsenbeck, C. M. Perou, M. T. Lewis, J. M. Rosen, and J. C. Chang, "Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 33, pp. 13820–13825, 2009.
- [146] B. T. Hennessy, A.-M. Gonzalez-Angulo, K. Stemke-Hale, M. Z. Gilcrease, S. Krishnamurthy, J.-S. Lee, J. Fridlyand, A. Sahin, R. Agarwal, C. Joy, W. Liu, D. Stivers, K. Baggerly, M. Carey, A. Lluch, C. Monteagudo, X. He, V. Weigman, C. Fan, J. Palazzo, G. N. Hortobagyi, L. K. Nolden, N. J. Wang, V. Valero, J. W. Gray, C. M. Perou, and G. B. Mills, "Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics.," *Cancer Research*, vol. 69, no. 10, pp. 4116–4124, 2009.
- [147] M. A. Lavasani and F. Moinfar, "Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on 'basal-like' carcinoma: A critical review.," *Journal of biophotonics*, vol. 5, no. 4, pp. 345–66, 2012.
- [148] M. C. U. Cheang, M. Van De Rijn, and T. O. Nielsen, "Gene expression profiling of breast cancer.," *Annual Review of Pathology*, vol. 3, pp. 67–97, 2008.
- [149] C. A. Livasy, C. M. Perou, G. Karaca, D. W. Cowan, D. Maia, S. Jackson, C.-K. Tse, S. Nyante, and R. C. Millikan, "Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ.," *Human Pathology*, vol. 38, no. 2, pp. 197–204, 2007.
- [150] L. A. Carey, C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. U. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp, and R. C. Millikan, "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.," *Jama The Journal Of The American Medical Association*, vol. 295, no. 21, pp. 2492–2502, 2006.
- [151] K. M. O'Brien, S. R. Cole, C.-K. Tse, C. M. Perou, L. A. Carey, W. D. Foulkes, L. G. Dressler, J. Geradts, and R. C. Millikan, "Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study.," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 24, pp. 6100–6110, 2010.
- [152] X. R. Yang, M. E. Sherman, D. L. Rimm, J. Lissowska, L. A. Brinton, B. Peplonska, S. M. Hewitt, W. F. Anderson, N. Szeszenia-Dabrowska, A. Bardin-Mikolajczak, W. Zatonski, R. Cartun, D. Mandich, G. Rymkiewicz, M. Ligaj, S. Lukaszek, R. Kordek, and M. García-Closas, "Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study.," *Cancer epidemiology biomarkers prevention a publication of the American Association for Cancer Research cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 16, no. 3, pp. 439–443, 2007.

- [153] K. Munjal, A. Ambaye, M. F. Evans, J. Mitchell, S. Nandedkar, and K. Cooper, "Immunohistochemical analysis of ER, PR, Her2 and CK5/6 in infiltrative breast carcinomas in Indian patients.," *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP*, vol. 10, no. 5, pp. 773–778, 2009.
- [154] C. Kim and S. Paik, "Gene-expression-based prognostic assays for breast cancer.," *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 7, no. 6, pp. 340–347, 2010.
- [155] E. K. A. Millar, P. H. Graham, S. A. O'Toole, C. M. McNeil, L. Browne, A. L. Morey, S. Eggleton, J. Beretov, C. Theocharous, A. Capp, E. Nasser, J. H. Kearsley, G. Delaney, G. Papadatos, C. Fox, and R. L. Sutherland, "Prediction of local recurrence, distant metastases, and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 28, pp. 4701–4708, 2009.
- [156] J. M. Del Casar, A. Martín, C. García, M. D. Corte, A. Alvarez, S. Junquera, L. O. González, M. Bongera, J. L. García-Muñiz, M. T. Allende, and F. Vizoso, "Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis.," *European Journal Of Obstetrics Gynecology And Reproductive Biology*, vol. 141, no. 2, pp. 147–152, 2008.
- [157] A. Córdoba, M. Ederra, I. Ariceta, M. L. Gómez, M. A. Arrechea, P. De Llano, and J. M. Martínez-Peñuela, "Modulation of biomarkers expression (OR, PR and C-erbB2) in breast cancer following neoadjuvant treatment," *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, vol. 29, no. 3, pp. 349–356, 2006.
- [158] K. D. Awadelkarim, C. Arizzi, E. O. M. Elamin, H. M. A. Hamad, P. De Blasio, S. O. Mekki, I. Osman, I. Biunno, N. E. Elwali, R. Mariani-Costantini, and M. C. Barberis, "Pathological, clinical and prognostic characteristics of breast cancer in Central Sudan versus Northern Italy: implications for breast cancer in Africa.," *Histopathology*, vol. 52, no. 4, pp. 445–456, 2008.
- [159] C. U. Ihemelandu, L. D. Leffall, R. L. Dewitty, T. J. Naab, H. M. Mezgebe, K. H. Makambi, L. Adams-Campbell, and W. A. Frederick, "Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival.," *The Journal of surgical research*, vol. 143, no. 1, pp. 109–118, 2007.
- [160] T. Islam, K. Matsuo, H. Ito, S. Hosono, M. Watanabe, H. Iwata, K. Tajima, and H. Tanaka, "Reproductive and hormonal risk factors for luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer in Japanese women.," *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*, 2012.
- [161] R. Rouzier, C. M. Perou, W. F. Symmans, N. Ibrahim, M. Cristofanilli, K. Anderson, K. R. Hess, J. Stec, M. Ayers, P. Wagner, P. Morandi, C. Fan, I. Rabiul, J. S. Ross, G. N. Hortobagyi, and L. Pusztai, "Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy Preoperative Chemotherapy," *Clinical Cancer Research*, pp. 5678–5685, 2005.

- [162] C. Liedtke, C. Mazouni, K. R. Hess, F. André, A. Tordai, J. A. Mejia, W. F. Symmans, A. M. Gonzalez-Angulo, B. Hennesy, M. Green, M. Cristofanilli, G. N. Hortobagyi, and L. Pusztai, "Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 8, pp. 1275–1281, 2008.
- [163] C. Sotiriou and L. Pusztai, "Gene-Expression Signatures in Breast Cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 8, pp. 790–800, 2009.
- [164] R. Dent, M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, and S. A. Narod, "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 15 Pt 1, pp. 4429–4434, 2007.
- [165] A. Prat and C. M. Perou, "Mammary development meets cancer genomics.," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 842–844, 2009.
- [166] A. L. Guerrero-Zotano, M. Garcia-Casado, A. Fernandez-Serra, J. Lopez-Guerrero, J. Gavila, M. Climent, A. Ruiz, and V. Guillem, "Monitoring cytokeratin19 (KRT19 KRT19) levels as] response of circulating tumor cells (CTC) to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer (BC)," *Cancer Research*, vol. 69, no. 2, 2009.
- [167] R. Rouzier, L. Pusztai, S. Delaloge, A. M. Gonzalez-Angulo, F. Andre, K. R. Hess, A. U. Buzdar, J.-R. Garbay, M. Spielmann, M.-C. Mathieu, W. F. Symmans, P. Wagner, D. Atallah, V. Valero, D. A. Berry, and G. N. Hortobagyi, "Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 33, pp. 8331–8339, 2005.
- [168] J. A. Vargo, S. Beriwal, G. M. Ahrendt, A. Soran, R. R. Johnson, K. McGuire, and R. Bhargava, "Molecular class as a predictor of loco-regional and distant recurrence in the neoadjuvant setting for breast cancer.," *Oncology*, vol. 80, no. 5–6, pp. 341–349, 2011.
- [169] T. Petit, M. Wilt, M. Velten, R. Millon, J.-F. Rodier, C. Borel, R. Mors, P. Haegelé, M. Eber, and J.-P. Ghnassia, "Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy.," *European Journal of Cancer*, vol. 40, no. 2, pp. 205–211, 2004.
- [170] D. P. Silver, A. L. Richardson, A. C. Eklund, Z. C. Wang, Z. Szallasi, Q. Li, N. Juul, C.-O. Leong, D. Calogrias, A. Buraimoh, A. Fatima, R. S. Gelman, P. D. Ryan, N. M. Tung, A. De Nicolo, S. Ganesan, A. Miron, C. Colin, D. C. Sgroi, L. W. Ellisen, E. P. Winer, and J. E. Garber, "Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 7, pp. 1145–1153, 2010.
- [171] T. Byrski, J. Gronwald, T. Huzarski, E. Grzybowska, M. Budryk, M. Stawicka, T. Mierzwa, M. Szwiec, R. Wisniowski, M. Siolek, R. Dent, J. Lubinski, and S. Narod, "Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy.," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 3, pp. 375–379, 2010.

- [172] T. Byrski, J. Gronwald, T. Huzarski, R. Dent, D. Zuziak, R. Wiśniowski, E. Marczyk, P. Blecharz, O. Szurek, C. Cybulski, T. Dębniak, B. Górski, J. Lubiński, and S. Narod, "Neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 9, no. Suppl 2, p. A4, 2011.
- [173] P. Bertheau, F. Plassa, M. Espié, E. Turpin, A. De Roquancourt, M. Marty, F. Lerebours, Y. Beuzard, A. Janin, and H. De Thé, "Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy," *Lancet*, vol. 360, no. 9336, pp. 852–854, 2002.
- [174] M. O. Meyers, N. Klauber-Demore, D. W. Ollila, K. D. Amos, D. T. Moore, A. A. Drobish, E. M. Burrows, E. C. Dees, and L. A. Carey, "Molecular subtypes and tumor response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 79, no. 5–6, pp. 324–330, 2010.

índice de tablas y figuras

TESIS DOCTORAL

índice de tablas y figuras

Índice de Tablas

Tabla 1.	Comparativa de ambas muestras a estudio	31
Tabla 2.	Subtipos moleculares determinados por panel IHQ	34
Tabla 3.	Fuerza de correlación (índice Kappa) según Landis y Koch	47
Tabla 4.	Distribución de los tumores según RE, RP y HER2 (neoadyuvancia)	59
Tabla 5.	Distribución de la muestra adyuvante según tamaño tumoral	61
Tabla 6.	Distribución de la muestra adyuvante según número de ganglios	61
Tabla 7.	Distribución de los tumores según RH, HER2 y Ki67% (adyuvancia)	63
Tabla 8.	Correlación entre subtipo histológico y molecular (neoadyuvancia)	67
Tabla 9.	Correlación entre grado nuclear y subtipo molecular (neoadyuvancia)	68
Tabla 10.	Correlación entre T y subtipos moleculares (adyuvancia)	71
Tabla 11.	Correlación entre grado nuclear y subtipo molecular (adyuvancia)	72
Tabla 12.	Estado de los RH y HER2 en la cohorte de Nielsen	80
Tabla 13.	Reproducibilidad de los biomarcadores en uso en CM	82
Tabla 14.	Comparativa entre las plataformas pronósticas en CM	92
Tabla 15.	Comparativa entre las plataformas pronósticas disponibles en CM	102
Tabla 16.	Subtipos moleculares: implicaciones evolutivas y clínicas	108
Tabla 17.	Distribución de los subtipos intrínsecos en la literatura	114
Tabla 18.	Características clínico-patológicas de las cohortes y de Nielsen	115
Tabla 19.	Correlación estado menstrual con subtipos intrínsecos en la literatura	119
Tabla 20.	Correlación características clínico-patológicas y moleculares (Sotiriu)	122

Índice de Gráficos

Gráfico 1.	Correlación entre subtipos intrínsecos determinados por IHQ y por método genómico (neoadyuvancia)	52
Gráfico 2.	Correlación entre subtipos intrínsecos determinados por IHQ y por método genómico en muestra neoadyuvante (incluye claudin-low)	53
Gráfico 3.	Porcentaje de concordancia entre ambos métodos (neoadyuvancia)	54
Gráfico 4.	Correlación entre subtipos intrínsecos determinados por IHQ y por PAM50 (adyuvancia)	55
Gráfico 5.	Porcentaje de concordancia entre ambos métodos (adyuvancia)	56
Gráfico 6.	Estadio clínico tumoral en la muestra neoadyuvante (AJCC staging)	57
Gráfico 7.	Distribución tumoral en función grado histológico (neoadyuvancia)	58
Gráfico 8.	Distribución tumoral en función subtipo histológico (neoadyuvancia)	58
Gráfico 9.	Subtipos intrínsecos por panel IHQ (neoadyuvancia)	60
Gráfico 10.	Distribución tumoral en función grado histológico (adyuvancia)	61
Gráfico 11.	Subtipos intrínsecos por panel IHQ (adyuvancia)	64
Gráfico 12.	Subtipos intrínsecos por método genómico (neoadyuvancia)	65
Gráfico 13.	Subtipos intrínsecos por método genómico en neoadyuvancia (incluyendo claudin-law)	65
Gráfico 14.	Subtipos intrínsecos por PAM50 (adyuvancia)	66
Gráfico 15.	RPC según subtipos intrínsecos determinados por método genómico y método IHQ	69
Gráfico 16.	Correlación entre subtipos intrínsecos determinados por IHQ y por método genómico (neoadyuvancia)	78
Gráfico 17.	Correlación entre subtipos intrínsecos determinados por IHQ y por PAM50 (adyuvancia)	79

Gráfico 18.	Correlación entre subtipos intrínsecos determinados por IHQ y por PAM50 según la cohorte de Huang et al.	81
Gráfico 12.	Subtipos intrínsecos por método genómico (neoadyuvancia)	116
Gráfico 14.	Subtipos intrínsecos por PAM50 (adyuvancia)	117
Gráfico 19.	Subtipos intrínsecos por PAM50 en la muestra de Nielsen	117

Índice de Figuras

Figura 1.	Relación entre los subtipos moleculares de CM y las CSC	17
Figura 2.	Protocolo del estudio de la muestra neoadyuvante	27
Figura 3.	Protocolo del estudio de la muestra adyuvante	28
Figura 4.	Esquema de la recogida de las muestras de tejido a estudio y su procesamiento posterior	30
Figura 5.	Ilustración de un panel de tinciones por IHQ	33
Figura 6.	Representación esquemática de la síntesis de la primera hebra de ADNc	37
Figura 7.	Esquema general de trabajo con microarrays de ADN	38
Figura 8.	Lavado de los microarrays (soluciones de lavado)	39
Figura 9.	Escáner GenePix y esquema de microarray de oligonucleótidos	41
Figura 10.	Software GenePix Pro 5.1	42
Figura 11.	Grado de correlación de los subtipos intrínsecos según 3 plataformas génicas validadas	83
Figura 12.	Proceso de creación de una plataforma génica con utilidad pronóstica o predictiva	93
Figura 13.	Distinción entre tumores de buen y mal pronóstico por su expresión génica	95
Figura 14.	Kaplan-Meier de la SLM según firmas predictivas de riesgo	96
Figura 15.	Oncotype DX Gene Recurrence Score Assay	97
Figura 16.	Kaplan-Meier de la SLP según Oncotype Dx	98
Figura 17.	Set de genes que conforman la plataforma PAM50	100
Figura 18.	SLP y SG según los subtipos intrínsecos moleculares	109
Figura 19.	Distribución de los subtipos histológicos en relación con los subtipos moleculares	121
Figura 20.	Modelo esquemático de la jerarquía epitelial del CM y su relación con los subtipos moleculares	124

índice analítico

TESIS DOCTORAL

índice ana lí tico

Cáncer de mama (CM): 15, 16, 17, 18, 23, 27, 28, 29, 34, 47, 60, 64, 65, 66, 77, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 88, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 114, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127.

PAM50: 17, 18, 30, 34, 47, 51, 55, 56, 64, 66, 77, 79, 80, 82, 85, 86, 94, 100, 101, 103, 116, 117, 136, 137, 138.

Inmuno-histoquímica (IHQ): 18, 23, 30, 31, 33, 34, 47, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 59, 62, 63, 64, 69, 77, 78, 79, 80, 81, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 101, 104, 106, 107, 11, 112, 113, 114, 118, 119, 120, 125, 126, 131.

Subtipos moleculares: 17, 18, 23, 30, 34, 67, 68, 71, 77, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 100, 103, 105, 108, 109, 113, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127.

Kappa: 47, 51, 52, 53, 55, 77, 79, 81, 82, 83, 131, 137, 138.

Neoadyuvancia: 23, 27, 29, 30, 33, 34, 51, 52, 53, 54, 57, 64, 65, 66, 68, 70, 77, 78, 104, 110, 111, 113, 114, 116, 118, 120, 122, 123, 125, 126, 131.

Adyuvancia: 18, 23, 27, 28, 30, 54, 56, 60, 66, 79, 85, 86, 90, 94, 96, 98, 99, 101, 110, 111, 112, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 131.

Luminal A: 18, 34, 51, 60, 63, 66, 67, 68, 70, 71, 77, 80, 86, 100, 103, 104, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114, 116, 118, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 135, 137, 138.

Luminal B: 18, 34, 51, 59, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 77, 80, 85, 100, 103, 104, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 116, 118, 120, 122, 123, 125, 126, 131, 135, 137, 138.

HER2: 15, 16, 18, 23, 32, 33, 34, 51, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 67, 68, 70, 71, 77, 78, 79, 80, 84, 85, 87, 88, 90, 91, 97, 100, 101, 103, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 112, 113, 114, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 131, 135, 137, 138, 139.

Triple-negativo (TN): 34, 51, 53, 56, 59, 62, 80, 84, 106, 107, 108, 110, 111, 112, 113, 118, 119, 121, 122, 123, 125, 126, 127.

Basal: 16, 18, 51, 56, 60, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 78, 79, 83, 84, 85, 100, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 131, 135, 136, 138, 139.

Normal: 18, 53, 54, 56, 66, 67, 68, 70, 71, 100, 109, 113, 116, 120, 122, 123, 125, 135, 138.

Claudin-low: 53, 54, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 78, 105, 108, 109, 110, 116, 118, 120, 122, 123, 124, 125.