

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Identificación de predictores de respuesta a quimioterapia neoadyuvante
con carboplatino-docetaxel en pacientes con cáncer de mama triple
negativo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Echavarría Díaz-Guardamino

Directores

Miguel Martín Jiménez
Sara López-Tarruella Cobo
Milagros González Rivera

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE PREDICTORES DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA
NEOADYUVANTE CON CARBOPLATINO-DOCETAXEL EN PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

ISABEL ECHAVARRIA DÍAZ-GUARDAMINO

MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE PREDICTORES DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA
NEOADYUVANTE CON CARBOPLATINO-DOCETAXEL EN PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

ISABEL ECHAVARRIA DÍAZ-GUARDAMINO

DIRECTORES:

MIGUEL MARTÍN JIMÉNEZ

SARA LÓPEZ-TARRUELLA COBO

MILAGROS GONZÁLEZ RIVERA

MADRID, 2017

AGRADECIMIENTOS

En las siguientes líneas me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible el desarrollo de este proyecto de Tesis Doctoral.

En primer lugar, agradecer al Dr. Miguel Martín la confianza depositada y el haberme brindado las oportunidades que han marcado el inicio de mi trayectoria profesional. Sin ellas, no podría plantearme las perspectivas profesionales actuales.

A la Dra. Sara López-Tarruella, que, gracias a su esfuerzo personal más allá de sus funciones de directora de tesis y tutora de residentes, ha hecho posible que aprovechara al máximo la residencia.

A la Dra. Milagros González-Rivera, por su soporte técnico y metodológico, necesario para el adecuado desarrollo de esta tesis doctoral.

A María del Monte Millán, por su respaldo constante y eficiencia, por ser un pilar fundamental en el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Antonio Picornell y Enrique Álvarez por el soporte bioinformático, sin cuya ayuda me habría sido imposible realizar este trabajo y sobrevivir a R. A la Dra. Rocío Ramos y todos los miembros del LAOT, por haberme apoyado en la parte más técnica de este proyecto.

Al Dr. Charles M. Perou y Dra. Katherine Hoadley, por haberme enseñado las herramientas necesarias para la realización de esta tesis doctoral, pero, sobre todo, por haber marcado un antes y un después en el enfoque de mi carrera profesional.

A todos los centros colaboradores, y, en especial, a todas las pacientes participantes en este estudio, necesarias para sumar al conocimiento del cáncer de mama triple negativo.

A mis padres, por los esfuerzos realizados para ofrecernos la mejor educación y por haber sabido inculcarnos la búsqueda de la excelencia sin olvidar lo realmente importante. A Eduardo e Ignacio, por su disponibilidad y ayuda constante a lo largo de estos años.



A mis padres.

ÍNDICE PAGINADO

AGRADECIMIENTOS.....	1
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	10
LISTA DE FIGURAS:.....	13
LISTA DE TABLAS:	14
RESUMEN	15
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO:.....	27
1.1.1. Definición del cáncer de mama triple negativo:.....	27
1.1.2. Epidemiología del CMTN:.....	28
1.1.3. Características clínicas del CMTN:	29
1.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA.	30
1.2.1. Subtipos intrínsecos del cáncer de mama:	30
1.2.2. Fenotipo basal:.....	32
1.2.3. Clasificación molecular del CMTN:.....	34
1.3. CMTN y MUTACIONES EN BRCA.....	39
1.3.1. Frecuencia de mutaciones BRCA y genes de reparación homóloga en CMTN.	39
1.3.2. BRCA y la recombinación homóloga:	40
1.3.3. Fenotipo BRCAness.	42
1.4. TRATAMIENTO DEL CMTN.	42
1.4.1. Indicaciones del tratamiento neo/adyuvante.....	42
1.4.2. Evaluación de la respuesta a la neoadyuvancia:.....	44
1.4.3. Asociación de pCR y pronóstico:	45
1.4.4. Tratamiento sistémico del CMTN.	46
1.4.4.1. Neoadyuvancia con esquemas clásicos:	46
1.4.4.2. Neoadyuvancia con sales de platino:.....	47
1.5. PREDICCIÓN DE RESPUESTA A NEOADYUVANCIA EN CMTN.....	51

1.6.	INFILTRACIÓN POR TILS EN CMTN:.....	51
1.7.	ENFERMEDAD RESIDUAL POST-NEOADYUVANCIA:	52
2.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
2.1.	JUSTIFICACIÓN:.....	57
2.2.	HIPÓTESIS:.....	57
2.3.	OBJETIVOS:.....	58
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1.	DISEÑO DE ESTUDIO:.....	63
3.1.1.	Criterios de inclusión:	63
3.1.2.	Criterios de exclusión:.....	63
3.1.3.	Tratamiento:	64
3.1.4.	Evaluación patológica de las muestras:	65
3.1.5.	Evaluación de la respuesta:.....	65
3.1.6.	Confidencialidad y aspectos ético-legales:	66
3.1.7.	Cálculo del tamaño muestral:	67
3.1.8.	Centros participantes:.....	67
3.2.	MUESTRAS BIOLÓGICAS:	68
3.2.1.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS:.....	68
3.2.2.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS:.....	69
3.2.2.1.	Extracción del RNA tumoral:	69
3.2.2.2.	Extracción del DNA germinal:	71
3.2.2.3.	Cuantificación y control de calidad del RNA:	71
3.2.2.4.	Conservación de los ácidos nucleicos extraídos.	72
3.3.	DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO INTRÍNSECO POR PAM50.	73
3.3.1.	Tecnología Nanostring:	73
3.3.2.	Determinación del subtipo intrínseco mediante PAM50:	75
3.4.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RNAseq:.....	76
3.4.1.	Tecnología RNAseq	76

3.4.1.1.	Elaboración de las librerías:	77
3.4.1.2.	Secuenciación:.....	78
3.4.1.3.	Alineamiento con genoma de referencia y cuantificación:	78
3.4.2.	Análisis de RNAseq.....	79
3.4.2.1.	Retirada de los genes con bajo número de cuentas.....	79
3.4.2.2.	Análisis de expresión diferencial.....	80
3.4.2.3.	Análisis de vías génicas:	80
3.4.2.4.	Determinación del PAM50 por RNAseq:.....	81
3.4.2.5.	Determinación del TNBCtype (Lehmann):	81
3.5.	ANÁLISIS DE DNA GERMINAL:.....	82
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	84
3.6.1.	Selección de variables:.....	84
3.6.2.	Escenarios de comparación:	85
3.6.3.	Análisis estadístico:.....	85
3.6.4.	Construcción de modelos predictivos de respuesta.....	84
4.	RESULTADOS	87
4.1.	CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA MUESTRA:.....	89
4.1.1.	Características basales de los pacientes:	89
4.1.2.	Características del tratamiento recibido:	90
4.1.3.	Respuesta a la quimioterapia.....	91
4.1.4.	Muestra final para análisis moleculares:	92
4.2.	PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS:.....	93
4.2.1.	Análisis univariantes:	93
4.2.2.	Análisis multivariantes:	95
4.2.3.	Modelos de predicción de respuesta con variables histopatológicas:	95
4.3.	PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON PAM50:.....	96
4.3.1.	Distribución de subtipos intrínsecos y claudin-low:	96
4.3.2.	Asociación de subtipos intrínsecos a la respuesta:.....	97
4.3.3.	Asociación de ROR y PS a la respuesta a quimioterapia:	99
4.3.4.	Asociación a los centroides y respuesta a la quimioterapia:	100

4.3.5.	Análisis multivariantes:	102
4.3.6.	Construcción de modelos predictivos de respuesta:	102
4.3.7.	Predicción de quimio-resistencia:.....	103
4.4.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR RNAseq:	105
4.4.1.	Tratamiento inicial de los genes:	105
4.4.2.	Determinación del subtipo intrínseco por RNAseq.	107
4.4.2.1.	Concordancia PAM50 Nanostring/RNAseq.....	107
4.4.2.2.	Correlación por genes:	109
4.4.2.3.	Correlación por centroides:	109
4.4.3.	Análisis de expresión diferencial:.....	110
4.4.3.1.	Expresión diferencial de genes entre pCR vs no-pCR (R1):.....	111
4.4.3.2.	Expresión diferencial de genes entre pCR y RCB-I frente a RCB-II y RCB-III (R2):.....	116
4.4.3.3.	Expresión diferencial de genes entre pCR vs no-pCR en pacientes basal-like (R3):	117
4.4.3.4.	Expresión diferencial de genes entre pCR y RCB-I frente a RCB-II y RCB-III en pacientes basal-like (R4):.....	117
4.5.	PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON TNBCtype.....	118
4.5.1.	Distribución de subtipos.	118
4.5.2.	TNBCtype y respuesta a quimioterapia:	120
4.6.	ANÁLISIS DE MUTACIONES EN GENES DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y RESPUESTA A QTNA.	122
5.	DISCUSIÓN	125
5.1.	PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS:.....	127
5.2.	PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON EL SUBTIPO INTRÍNSECO DEFINIDO POR PAM50. ..	130
5.2.1.	DISTRIBUCIÓN DE PAM50.....	131
5.2.2.	PAM50 COMO PREDICTOR DE RESPUESTA A QTNA.	132
5.2.2.1.	Subtipos intrínsecos y respuesta a distintos fármacos:	135
5.2.2.2.	Valor predictivo de respuesta de PAM50 en otros subtipos de cáncer de mama:	137
5.2.3.	CORRELACIÓN A LOS CENTROIDES Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO.	138
5.2.4.	TN/BL Y TN/no-BL:	138
5.2.5.	pCR o pCR+RCB-I:	140

5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR RNAseq:	141
5.3.1. Expresión génica inmune y respuesta a quimioterapia basada en TCb:	141
5.3.2. Correlación de perfiles génicos inmunes y TILs:	144
5.3.3. Genes de proliferación y respuesta a QTNA:	146
5.3.4. Otras firmas génicas relacionadas con la respuesta:	147
5.3.5. Expresión génica en enfermedad residual:	148
5.4. CORRELACIÓN DE PAM50 por nCounter y RNAseq:	149
5.5. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LEHMANN (TNBCtype-4) Y RESPUESTA A QTNA:	150
5.5.1. Distribución de los subtipos:	150
5.5.2. Respuesta a la QTNA:	152
5.6. RESPUESTA A QTNA SEGÚN MUTACIÓN EN GENES DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA:	153
5.6.1. Frecuencia y características de las pacientes con mutación:	153
5.6.2. Respuesta al tratamiento según estado mutacional:	154
5.7. PUNTOS FUERTE Y LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO:	159
5.8. PLANES FUTUROS:	160
6. CONCLUSIONES	163
7. BIBLIOGRAFÍA	167
8. ANEXOS	189
ÍNDICE ANALÍTICO	197

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AR: receptor de andrógeno.

BL: basal-like (PAM50).

BL1: basal-like 1 (TNBCtype-Lehmann).

BL2: basal-like 2 (TNBCtype-Lehmann).

BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela.

cDNA: DNA complementario de doble hebra

CK: citoqueratinas.

CMTN: cáncer de mama triple negativo.

CM: cáncer de mama.

CNA: alteración número de copias.

EEM: error estándar de la media.

FT: factores de transcripción.

HER2E: HER2-enriched (PAM50).

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

HRD: “homologous repair deficiency”

IHQ: inmunohistoquímica.

IM: inmunomodulador (TNBCtype-Lehmann).

LAOT: Laboratorio de Oncología Traslacional.

LAR: Luminal androgen receptor (TNBCtype-Lehmann).

lncRNA: long non-coding RNA.

LPBC: tumores de predominio linfocítico.

LumA: Luminal A (PAM50).

LumB: Luminal B (PAM50).

M: mesenquimal (TNBCtype-Lehmann).

MSL: "mesenchymal stem-like" (TNBCtype-Lehmann).

miRNA: microRNAs.

mRNA: RNA mensajero.

PARP: poly(ADP-ribose) polimerasa.

pCR: respuesta patológica completa.

PS: proliferation score.

QTNA: quimioterapia neoadyuvante.

RCB: residual cancer burden.

RD: enfermedad residual.

RH: receptores hormonales.

RE: receptor de estrógeno.

RM: resonancia magnética.

ROR: Risk of recurrence.

RP: receptor de progesterona.

SG: supervivencia global.

SNC: sistema nervioso central.

SLE: supervivencia libre de enfermedad.

SLED: supervivencia libre de enfermedad a distancia.

SLP: supervivencia libre de progresión.

SOP: salpingooforectomía profiláctica.

TCb: Docetaxel-Carboplatino.

TCGA: The Cancer Genome Atlas.

TILs: linfocitos infiltrantes de tumor.

VSD: variantes de significado desconocido.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Diseño del estudio.....	64
Figura 2. Sondas de Nanostring	73
Figura 3. Tecnología Nanostring	74
Figura 4. Elaboración de las librerías de cDNA	77
Figura 5. Respuesta al tratamiento.....	91
Figura 6. Diagrama de flujo de las pacientes disponibles para estudios moleculares.	92
Figura 7. Distribución de subtipo intrínseco por PAM50 (Nanostring nCounter) en la muestra del estudio (n=94).....	96
Figura 8. Symmans RCB según subtipo intrínseco	98
Figura 9. Distribución de RCB en función del subtipo	99
Figura 10. Curvas ROC para la predicción de respuesta con el ROR, PS, centroide basal y luminal A	101
Figura 11. Gráficas MDS de dispersión para R1	106
Figura 12. Gráficas voom de "mean-variance trend"	106
Figura 13. Distribución de subtipos intrínsecos por RNAseq.....	107
Figure 14. Subtipos intrínsecos por Nanostring y RNAseq.	108
Figura 15. Correlación a los centroides entre Nanostring y RNAseq.....	110
Figura 16. "Volcano plots" para los 4 escenarios de respuesta.....	111
Figura 17. Heatmap de expresión génica diferencial entre pCR y RD	113
Figura 18. Expresión diferencial de genes de recombinación homóloga.....	114
Figura 19. Expresión génica diferencial de genes de vías de los andrógenos.....	115
Figura 20. Expresión diferencial de genes de respuesta inmune.	115
Figura 21. Diagrama Venn de genes diferencialmente expresados en R1 y R2.	116
Figura 22. Diagrama Venn de genes diferencialmente expresados en R1, R2 y R4	118
Figura 23. Distribución de TNBCtype. A. En la muestra global. B. En pacientes con tumores BL por PAM50. C. En pacientes con tumores no-BL por PAM50.....	119
Figura 24. Distribución de la respuesta a quimioterapia (RCB Symmans) según los subtipos de Lehmann	122

Figura 25. Respuesta en función de estado mutacional..... 123
 Figura 26. Respuesta en función de TNBCtype-4 y estado mutacional..... 124

LISTA DE TABLAS:

Table 1. Resumen de clasificaciones moleculares CMTN 38
 Tabla 2. Respuesta a QTNA con esquemas clásicos. 47
 Tabla 3. Respuesta a QTNA con sales de platino en CMTN 49
 Tabla 4. Características basales de la muestra 89
 Tabla 5. Respuesta al tratamiento 91
 Tabla 6. Respuesta en función de factores histopatológicos. 94
 Tabla 7. Resumen de asociación de variables a respuesta 94
 Tabla 8. Comparación de variables clínico-patológicos entre tumores BL y no-BL..... 97
 Tabla 9. Distribución de respuesta según subtipo intrínseco 97
 Tabla 10. Resumen del valor predictivo de los centroides 101
 Tabla 11. Modelos de predicción de respuesta 103
 Tabla 12. Tabla comparativa de distribución de subtipos intrínsecos por nanostring y rnaseq.107
 Tabla 13. Correlación de Nanostring y RNAseq a los centroides..... 109
 Tabla 14. 10 genes más diferencialmente expresados entre pCR y RD 112
 Tabla 15. Distribución de TNBCtype-4 en la muestra global y en tumores BL y no-BL 119
 Tabla 16. Características basales de los distintos subtipos de tnbctype-4..... 120
 Tabla 17. Respuesta en función del TNBCtype-4..... 122
 Tabla 18. Respuesta según estado mutacional 123
 Tabla 19. Distribución de los subtipos intrínsecos en CMTN 131
 Tabla 20. Respuesta según SI en CMTN 135
 Tabla 21. Respuesta a neoadyuvancia en función de TNBCtype-4..... 153

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS:

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa el 15-20% de los cánceres de mama diagnosticados, y se caracteriza por una gran agresividad y un peor pronóstico a largo plazo. En las pacientes diagnosticadas en estadios localizados, este mal pronóstico se centra fundamentalmente en las pacientes que no alcanzan una buena respuesta tras quimioterapia neoadyuvante (QTNA), ya que la obtención de una respuesta patológica completa (pCR) tras QTNA se asocia a un excelente pronóstico a largo plazo. Con los tratamientos actuales y la incorporación de las sales de platino al tratamiento, se obtienen pCR en alrededor del 50% de las pacientes.

La clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos mediante el análisis de expresión génica (PAM50) ha aportado información valiosa sobre la biología de esta enfermedad. El CMTN, definido por parámetros IHQ, es un diagnóstico de exclusión que engloba una enfermedad heterogénea. Aunque tradicionalmente se equiparó la definición de TN a basal-like por PAM50, hay evidencia de que ambos términos no son superponibles, y que sólo el 70-80% de los CMTN son basal-like. Además, han surgido nuevas clasificaciones moleculares específicas para el CMTN como el TNBCtype-4 de Lehmann. Por otro lado, un porcentaje significativo de pacientes presentan mutaciones en los genes de recombinación homóloga o en sus vías relacionadas, con una potencial implicación en la respuesta a QTNA.

La identificación de factores predictivos de respuesta a QTNA es prioritaria en el momento actual, con el fin de predecir qué pacientes no van a obtener beneficio de las

estrategias disponibles y poder ofrecerles nuevas alternativas terapéuticas en el contexto de estudios de investigación.

El objetivo primario de este estudio es evaluar la capacidad del subtipo intrínseco determinado por PAM50 en la predicción de la respuesta a QTNA con carboplatino y docetaxel.

Como objetivos secundarios, evaluamos el patrón de expresión génica diferencial entre pacientes respondedoras y no respondedoras, y evaluamos el valor predictivo de la clasificación de Lehmann a partir de los datos obtenidos de RNAseq. Analizamos asimismo la respuesta en función de la mutación en un panel de genes de recombinación homóloga en línea germinal. Por último, evaluamos la correlación entre la determinación del PAM50 por Nanostring Technologies y RNAseq para determinar su reproducibilidad y traducibilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio NCT01560663 es un estudio clínico prospectivo, no-aleatorizado, multicéntrico de pacientes con CMTN (RE y RP < 1% y HER2 no sobreexpresado) estadio I a III, candidatas a recibir tratamiento neoadyuvante con 6 ciclos de carboplatino AUC 6 y docetaxel 75 mg/m². Tras completar el tratamiento neoadyuvante las pacientes se someten a cirugía, y los tratamientos complementarios con radioterapia y quimioterapia adyuvante se administran a criterio del investigador. La pCR se definió como ausencia de tumor invasivo en mama y axila (ypT0/is ypN0), y la enfermedad residual se evaluó mediante la escala del Residual Cancer Burden (RCB) de Symmans et al. A partir de muestras parafinadas de la biopsia basal, previa al inicio del

tratamiento, evaluamos el subtipo intrínseco por PAM50 en la plataforma nCounter (Nanostring Technologies), y realizamos el análisis de RNAseq. Evaluamos asimismo por secuenciación dirigida el estado mutacional de 7 genes de recombinación homóloga en línea germinal (BRCA1, BRCA2, BARD1, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D). Los análisis de asociación y de expresión génica diferencial se llevaron a cabo en R studio v 3.2.1.

RESULTADOS:

Entre 2010 y 2015 se incluyeron 121 pacientes, de las cuales en 94 se dispuso de material histológico suficiente para realizar estudios moleculares. La media de edad de las pacientes al diagnóstico era de 51,6 años, un 69,1% tenían afectación ganglionar, y un 52,1% y 46,8% eran estadio II y III respectivamente. La tasa global de pCR fue de 44,7% y el 56,4% obtuvieron una buena respuesta patológica (pCR o RCB-I). Un 83,0% de las pacientes se clasificaron como basal-like por PAM50, y este subtipo basal-like se asoció a una significativa mejor respuesta a tratamiento (51,3% de pCR frente a 12,5%, $p < 0,01$). En los análisis multivariantes, el subtipo intrínseco por PAM50 fue el único factor asociado de forma significativa a la respuesta. La combinación de tamaño tumoral, subtipo intrínseco y ki67 logró una capacidad predictiva de respuesta medida en AUC de 0,692, incrementando la capacidad predictiva lograda con los factores histopatológicos clásicos (AUC 0,642). A nivel de expresión génica diferencial entre pacientes respondedoras y no respondedoras, se objetivó una sobreexpresión de genes de respuesta inmune en pacientes con pCR, así como de genes de proliferación y de un grupo de genes de histonas. Al aplicar la clasificación actualizada de Lehmann (TNBCtype-4) en nuestra

muestra, objetivamos un 34,0% de tumores BL1, 20,2% de BL2, 23,4% de M y un 14,9% de LAR. Se evidenció una respuesta diferencial significativa en función del subtipo molecular, con el subtipo BL1 alcanzando la mejor respuesta (65,6%), seguido por el BL2 (47,4%), M (36,4%) y LAR (21,4%) ($p=0,027$). Un 11,8% de nuestras pacientes presentaron mutación en alguno de los 7 genes de recombinación homóloga analizados, sin objetivarse diferencias en la respuesta entre pacientes portadoras de mutación y pacientes no portadoras (50,0% frente a 46,7% respectivamente). La distribución de subtipos moleculares entre las pacientes mutadas fue de un 100% de tumores basal-like por PAM50, y con respecto a la clasificación del TNBCtype-4, un 40% de BL2, 30% de BL1 y 30% de M respectivamente. La correlación entre subtipo intrínseco por PAM50 por plataforma nCounter y RNAseq fue alta, con una concordancia global del 94,6%.

CONCLUSIONES:

El subtipo intrínseco basal-like por PAM50 se asocia a una mejor respuesta a QTNA con carboplatino y docetaxel, y la determinación del subtipo intrínseco aporta un valor predictivo añadido a los factores histopatológicos clásicos. Existe además un claro componente inmune asociado a la respuesta a neoadyuvancia.

BACKGROUND AND AIMS:

Triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 15 to 20% of newly-diagnosed breast cancer, and is characterized by an aggressive course and poor prognosis. This detrimental prognosis in early-stage TNBC is mainly derived from patients not achieving a satisfactory response to neoadjuvant chemotherapy (NACT), as pathological complete response (pCR) has been strongly correlated with an excellent long-term survival. Currently, around 50% of the patients will achieve a pCR with the available neoadjuvant regimens.

Gene expression profiling identified 4 breast cancer intrinsic subtypes, with valuable biologic and prognostic information. TNBC is a diagnosis of exclusion encompassing a heterogenous disease, and, although TNBC and basal-like (BL) were initially considered as synonymous, only 70 to 80% of TNBC are in fact BL. New molecular classifications specific for TNBC have arisen in the last years aiming to decipher TNBC heterogeneity, such as the TNBCtype-4 by Lehmann et al. In addition, a significant proportion of TNBC patients harbor germline mutations in homologous recombination genes, which may play a role in determining response to NACT.

Identification of predictive factors of response to NACT is required, as non-responsive patients should be offered alternative chemotherapy regimens and new options within clinical trials.

The main goal of this study was to evaluate the predictive value of response of the intrinsic subtype BL by PAM50 after neoadjuvant chemotherapy with carboplatin and docetaxel.

In addition, we aimed to evaluate differential gene expression profiles between responders and non-responders. We also aimed to evaluate the predictive value of the Lehmann molecular classification of TNBC, and evaluate the response rate according to homologous recombination genes mutation status. Lastly, we evaluated the correlation of PAM50 determined by Nanostring and RNAseq in order to assess their reproducibility and translatability.

PATIENTS AND METHODS:

A study of predictive biomarkers was conducted within a prospective, non-randomized trial evaluating the clinical efficacy of neoadjuvant carboplatin and docetaxel (NCT 01560663). Patients with newly diagnosed stage I to III TNBC patients, candidate for this treatment, were accrued. TNBC was defined as the absence of expression of estrogen and progesterone receptor (ER and PR < 1%) and HER2 status was defined as negative using the ASCO/CAP guidelines. Patients received six cycles of carboplatin AUC 6 and docetaxel 75 mg/m² every 3 weeks and underwent surgery. Postoperative radiotherapy and adjuvant chemotherapy in case of residual disease were indicated following local clinical practice guidelines. pCR was defined as the absence of invasive tumor in the breast and axillary lymph nodes (ypT0/is ypN0) and residual disease was assessed by Symmans residual cancer burden calculator. From core FFPE biopsy, we performed PAM50 intrinsic subtype determination in the nCounter platform (Nanostring Technologies), and RNA-sequencing on a HiSeq2500. Targeted next-generation sequencing was performed on 7 homologous recombination genes (BRCA1, BRCA2, BARD1, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D). All statistical analyses were performed on R v3.2.1.

RESULTS:

From 2010 to 2015, 94 patients with available tissue sample were included in the analysis. Mean age at diagnosis was 51.6 years, 69.1% of the patients had nodal involvement, and 52.1% and 46.8% had stage II and III disease, respectively. pCR rate was 44.7%, and 56.4% achieved a good pathological response (pCR or RCB-I). With regards to the intrinsic subtype distribution, the majority of the patients were basal-like by PAM50 (83.0%), and this basal-like subtype was associated with a significant better response to NACT (pCR of 51.3% vs 12.5% for BL and non-BL respectively, $p < 0.01$). Multivariate analysis showed that the intrinsic subtype was the only factor significantly associated with response. A predictive model including tumor size, Ki67 and intrinsic subtype showed a predictive value in terms of AUC of 0.692, higher than the one achieved with histopathological factors alone (AUC 0.642). In terms of differential gene expression, responder patients showed an overexpression of immune-related genes, in addition to proliferations signatures and a histone cluster. With regards to Lehmann's refined classification (TNBCtype-4), we found 34.0% of BL1 tumors, 20.2% of BL2, 23.4% of M and 14.9% of LAR. Subtypes were significantly associated with response to NACT, with BL1 tumors achieving the highest pCR rates (65.6%), followed by BL2 (47.4%) and M (36.4%), and finally LAR tumors with the lowest pCR rates (21.4%), $p = 0.027$. Mutations in any of the 7 homologous recombination genes analyzed were found in 11.8% of the patients, although no difference in response to NACT was found between mutation carriers and non-carriers (50.0% vs 46.7%). All tumors arising in mutation carriers were basal-like by PAM50, and according to TNBCtype-4, 30% were BL1, 40% BL2 and 30% M. Lastly, we found a high correlation between PAM50 from Nanostring and RNAseq, with a global concordance rate of 94.6%.

CONCLUSIONS:

Basal-like intrinsic subtype is significantly associated with a better response to NACT with carboplatin and docetaxel in TNBC, and intrinsic subtype enhances the predictive value of classical histopathological factors. In addition, there is a clear immune component related to response to NACT.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO:

El cáncer de mama (CM) es el tumor maligno más frecuentemente diagnosticado en mujeres, afectando a alrededor de 1 de cada 8 mujeres a lo largo de la vida. Se estima que en el año 2017 se diagnosticarán en torno a 250.000 nuevos casos de CM en Estados Unidos, y que se producirán alrededor de 40.000 muertes por este tumor (1). Sin embargo, el CM no puede considerarse como una entidad única, sino que engloba distintos subtipos con una clara implicación terapéutica y pronóstica.

1.1.1. Definición del cáncer de mama triple negativo:

Entre los distintos subtipos de CM destaca el cáncer de mama triple negativo (CMTN), definido por la ausencia de expresión de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y amplificación del HER2, determinados mediante inmunohistoquímica (IHQ) y/o técnicas de hibridación in situ. Aunque históricamente se han considerado distintos puntos de corte para determinar la positividad de los receptores hormonales (RH), las últimas guías de la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) y Colegio Americano de Patólogos (CAP) recomiendan considerar la positividad para los RE y RP en todos aquellos tumores con $\geq 1\%$ de núcleos inmunorreactivos (previamente $\geq 10\%$) (2). Este cambio fue secundario a la objetivación de que un porcentaje de pacientes con expresión limítrofe de RE (1-9%) presentaban características moleculares sugestivas de activación de la vía estrogénica, aunque existen controversias sobre su potencial beneficio con la terapia endocrina (3,4). Por otro lado, se han modificado los

umbrales de la definición de positividad del HER2 mediante técnicas de hibridación in situ (ISH) en los últimos años, rescatando pacientes con valores limítrofes en las últimas guías. En las guías de 2013 se consideran HER2-positivos los tumores con una expresión intensa de HER2 por IHQ (IHQ 3+) o en el caso de evaluarse por técnicas ISH, aquellos con un cociente ≥ 2 , o < 2 pero con un número de copias medio de HER 2 ≥ 4 (5,6).

El diagnóstico de CMTN es por tanto un diagnóstico de exclusión, agrupando a aquellos tumores con ausencia de expresión de RE y RP ($< 1\%$) y HER2 negativo por las técnicas previamente descritas (7).

1.1.2. Epidemiología del CMTN:

El CMTN representa en torno al 15% de los CM invasivos de nuevo diagnóstico. Suele diagnosticarse a edades más tempranas que el resto de subtipos y es más frecuente en mujeres afroamericanas e hispanas (8–11). Se ha visto que en mujeres afroamericanas el riesgo de tener un CMTN puede llegar a triplicar el de las pacientes caucásicas, independientemente de la edad y del estado menstrual (12).

Parece que el CMTN tiene unos factores de riesgo algo diferentes de los del resto de CM. Al contrario que para los tumores RH-positivos, el CMTN se ha asociado a una edad más temprana de embarazo y a una mayor paridad (13). Por el contrario, sí se asocia a la ausencia de lactancia materna, y existen controversias sobre el potencial riesgo de los anticonceptivos orales (13,14),

así como sobre el impacto del índice de masa corporal (12,15). Por su parte, el alcohol y tabaco parecen no estar relacionado con el CMTN (16).

1.1.3. Características clínicas del CMTN:

El CMTN representa una entidad de tumores con un fenotipo agresivo (17). Histológicamente, son generalmente tumores de alto grado histológico y de tipo carcinoma ductal invasivo no específico, aunque también incluye subtipos histológicos más infrecuentes como carcinoma medular y metaplásico, carcinoma adenoide quístico y carcinoma apocrino (18). Se diagnostican generalmente con un mayor tamaño, y, a pesar de que no existen datos concluyentes, parece que podrían asociarse a una menor incidencia de afectación ganglionar con respecto al resto de CM (19). Alrededor del 80% de los CMTN se diagnostican en estadíos localizados (I-II), en torno al 16% en estadíos III y sólo el 5% debutan con enfermedad metastásica (20). Debido a su agresividad y velocidad de crecimiento están sobre-representados entre los tumores de intervalo, diagnosticados entre controles rutinarios de campañas de mamografía (21).

El CMTN se asocia con un patrón de diseminación y de recurrencia particular. Se asocia a una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) que los tumores luminales, estimada en torno al 68% a los 5 años frente al 77-85%, respectivamente, asociado, además, a una mayor tendencia a desarrollar metástasis a distancia viscerales (22,23). El CMTN tiene especial tendencia a metastatizar a pulmón (40% vs 20%), sistema nervioso central (SNC) (30% vs 10%) y

en menor medida a hígado (20% vs 30%) y hueso (10% vs 40%) (18). Aunque existen controversias sobre la incidencia de recidivas locorregionales del CMTN en comparación con el resto de subtipos, sí se ha objetivado que estas recidivas son en general más precoces (2,8 vs 4,2 años, $p=0,02$) (17,24). En comparación con los tumores luminales, el CMTN presenta un patrón de recurrencia precoz, con la mayoría de las recidivas en los 3 primeros años tras el diagnóstico inicial y de las muertes en los primeros 5 años (17,22). En efecto, presentan una menor mediana de tiempo a la recidiva a distancia (2,6 años frente a 5 años), mediana de tiempo a la muerte (4,2 frente a 6 años) y mediana de tiempo desde la recurrencia hasta la muerte (7 vs 20 meses, $p=0,02$) (23). Una vez superados los primeros años tras el diagnóstico, el pronóstico del CMTN se equipara al de los tumores RH-positivos.

1.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA.

1.2.1. Subtipos intrínsecos del cáncer de mama:

Aunque se objetivan diferencias claras en el CM según su subtipo IHQ, existe asimismo una gran heterogeneidad en el CM a nivel de expresión génica. En el año 2000, mediante el análisis de expresión génica por “microarrays”, Perou et al identificaron 5 subtipos intrínsecos dentro del CM: luminal A (LumA), luminal B (LumB), basal-like (BL), HER2-enriched (HER2E) y normal-like, siendo este último contaminación por tejido mamario sano (25,26). Los subtipos luminales se caracterizaron por una sobreexpresión de genes de vías estrogénicas y citoqueratinas (CK) luminales (CK 8, 18), y, en el caso de LumA, por una baja expresión de genes de proliferación (como por ejemplo el MKI67, CCNB1, CDC20 entre otros). El subgrupo HER2E se

caracterizaba por la sobreexpresión de ERBB2 y genes relacionados, así como baja expresión de RE y genes relacionados; mientras que el subtipo basal-like (BL) se caracterizaba por la ausencia de expresión de genes relacionados con el receptor de estrógenos, y, por el contrario, sobreexpresión de genes de proliferación, CK basales 5 y 17 y laminina, entre otros. Estos subtipos intrínsecos se acompañaban de una clara implicación pronóstica, con el subtipo basal-like asociado a un peor pronóstico, tanto en términos de SLE como de supervivencia global (SG). A estos subtipos intrínsecos se sumó unos años más tarde el subtipo “claudin-low”, caracterizado por la baja expresión de genes relacionados con la diferenciación luminal y de genes de adhesión intercelular (claudinas 3, 4, 7 y e-cadherina), y, al contrario, enriquecido en genes de la transición epitelio mesénquima, respuesta inmune y de células madre tumorales (27). La mayoría de estos tumores CL se englobaban dentro de los tumores TN (61-71%), y hasta un 25-34% de los tumores TN podrían corresponder a tumores CL por expresión génica. A diferencia de los tumores basal-like, este subgrupo de tumores presenta una menor expresión de CK basales como la 5, 14 y 17, así como de genes implicados en la proliferación, siendo por el contrario tumores más quiescentes con una menor velocidad de crecimiento. Se ha visto que los distintos subtipos intrínsecos se traducen en distintos fenotipos histológicos, con el subtipo BL, por ejemplo, asociado a mayor inflamación, necrosis, pleomorfismo nuclear e índice mitótico (28).

A partir de los datos de expresión génica de los subtipos intrínsecos, se desarrolló un predictor de subtipo basado en la expresión génica de 50 genes, el PAM50. La clasificación del CM mediante esta herramienta ha demostrado tener una importante implicación pronóstica y predictiva de respuesta al tratamiento (29). El test Prosigna, formado por la combinación del PAM50 y variables clínicas, ha sido validado en CM RH-positivo para la evaluación del riesgo de

recidiva a distancia y en consecuencia toma de decisión sobre la administración de quimioterapia adyuvante en mujeres post-menopáusicas (30,31). En estas pacientes, además, el PAM50 ha demostrado utilidad en la predicción de recidivas tardías (5 a 10 años) en pacientes tratadas con hormonoterapia adyuvante durante 5 años, postulándose como una potencial herramienta para la decisión de extender la hormonoterapia adyuvante más allá de los 5 años o no (32). Por otro lado, la determinación del subtipo intrínseco por PAM50 podría tener una implicación en la elección de las terapias diana, puesto que en el estudio PAMELA se ha objetivado que pacientes HER2E pero HER2-negativas por IHQ o ISH se benefician del tratamiento con lapatinib (33).

1.2.2. Fenotipo basal:

Los subtipos intrínsecos identificaron un subgrupo de tumores con un fenotipo basal, sobrerrepresentado entre el CMTN. La glándula mamaria normal está compuesta por dos tipos de células de distinto origen, las células basales (y/o mioepiteliales) y las células epiteliales luminales. Estas dos células presentan diferencias IHQ, con expresión de CK 5 y 6 en las células basales y CK 8 y 18 en las células luminales (25). Los tumores BL se caracterizan por una sobreexpresión de CK5/6 y CK17, así como de genes de proliferación. A partir de la identificación del subtipo basal-like por expresión génica, se ha intentado desarrollar una definición IHQ del fenotipo basal (34). A nivel de IHQ, los tumores basales se caracterizan por la negatividad para la expresión de RE, RP y HER2, así como una sobreexpresión de CK 5/6, HER1 y/o c-KIT, aunque no hay un consenso entre las definiciones histológicas y genómicas de fenotipo basal (35,36). Además, el rendimiento de la definición IHQ se encuentra íntimamente sujeto a la definición de

TN utilizada, ya que la inclusión de los tumores con RE y RP limítrofes, entre 1 y 9%, disminuye de forma significativa la proporción de tumores BL por PAM50 (37). La definición de tumores basales por IHQ ha demostrado tener una mayor implicación pronóstica que la triple-negatividad (19,38).

Además de las diferencias en expresión génica dentro del CM, el proyecto “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) objetivó diferencias a nivel de DNA entre los subtipos intrínsecos, con una mayor carga mutacional entre los tumores BL y HER2E que en el resto de subtipos (39). En los tumores basal-like se objetivó una alta tasa de mutaciones en TP53 (alrededor del 79%) y elementos relacionados de su vía, seguidos por la mutación en PIK3CA, presente en un 9% de los tumores BL. Sin embargo, se ha descrito que sólo un 36% de las SNV “single nucleotide variants” detectadas en CMTN se correlacionan posteriormente con sus alteraciones correspondientes en la transcripción (40). Se vio asimismo una alta frecuencia de alteraciones en la vía de PIK3CA, tanto a nivel génico, proteico, o por sobreactivación de la vía secundaria a pérdida de PTEN, INPP4B y/o amplificación de PIK3CA. Otra de las características principales de los tumores basal-like descritas eran las mutaciones de ATM, inactivación de BRCA1 y BRCA2, pérdida de Rb y amplificación de ciclina E. Hasta un 20% de los tumores basal-like presentaban mutación germinal o somática de BRCA1 o BRCA2.

Al estudiar de forma conjunta diversos tipos tumorales de distinta estirpe histológica se objetivó que los tumores de mama se segregaban en 2 grupos totalmente separados, los tumores luminales y HER2-positivos por un lado, y por el otro, los tumores basales, mostrando que estos últimos son tan distintos de los luminales como pueden serlo de tumores de otro órgano (41). Al

contrario, se objetivan grandes similitudes entre el cáncer de pulmón escamoso y los tumores de mama basales, y entre estos últimos y los carcinomas serosos de ovario.

1.2.3. Clasificación molecular del CMTN:

Con los datos de expresión génica resultó evidente que el propio diagnóstico de CMTN englobaba a distintas entidades clínicas, propiciando el desarrollo de diversas clasificaciones dirigidas a elucidar la biología de estos tumores y potenciales dianas terapéuticas específicas.

Una de las clasificaciones principales del CMTN es la clasificación molecular entre tumores TN basal-like (TN/BL) y TN no-basal-like (TN/no-BL) por PAM50. Aunque el CMTN y fenotipo basal se consideraron inicialmente sinónimos, existe evidencia de que ambas clasificaciones no se solapan de forma completa, con unas discordancias entre ambas en torno al 20-30% (42). Alrededor del 70-80% de los CMTN se corresponden con tumores basal-like, aunque al incorporar el subtipo claudin-low esta cifra descendería hasta el 50%, mientras que el resto de los CMTN incluye tumores de todos los subtipos intrínsecos (43). El análisis de expresión diferencial de los distintos subtipos intrínsecos dentro del CMTN ha revelado que el perfil de expresión génica se mantiene entre subtipos intrínsecos, independientemente de su perfil IHQ. Por el contrario, se objetivan diferencias importantes entre tumores de un mismo fenotipo IHQ y distinto subtipo intrínseco, sugiriendo que la clasificación genómica es más robusta que la IHQ (44).

Además de la clasificación por subtipos intrínsecos, han ido surgiendo nuevas clasificaciones específicas del CMTN según los perfiles de expresión génica (tabla 1) (45).

Una de las primeras clasificaciones surgidas fue la de Lehmann et al, que subdividió el CMTN en 6 subgrupos: basal like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), inmunomodulador (IM), mesenquimal (M), mesenquimal stem-like (MSL) y luminal androgen receptor (LAR) (46). Los subtipos basal-like 1 y 2 mostraban un enriquecimiento en la expresión de genes implicados en el ciclo celular y proliferación, además de genes de reparación del DNA para los BL1 y genes implicados en la señalización por factores de crecimiento, glucolisis y gluconeogénesis en el caso de los BL2. El subtipo IM se caracterizaba por la sobreexpresión de genes implicados en la respuesta inmune, mientras que el subtipo M mostraba un enriquecimiento en genes implicados en la motilidad celular, interacción con receptores de la matriz extracelular y vías de diferenciación celular. El subgrupo MSL, además de compartir las características con el subtipo M, se acompañaba de sobreexpresión de genes implicados en la señalización por factores de crecimiento y genes de célula madre, así como infraexpresión de genes de proliferación y unión intercelular como las claudinas. El subtipo LAR era el subgrupo más diferenciado a nivel de expresión génica, exhibiendo una sobreexpresión de genes relacionados con las vías hormonales, en especial del receptor de andrógeno (AR) y de sus efectores "downstream". Este subtipo LAR se diferenciaba asimismo en el perfil IHQ, al expresar citoqueratinas luminales. Los subtipos moleculares de Lehmann asociaron además una respuesta diferencial a la QTNA, distintas sensibilidades a grupos farmacológicos y un valor pronóstico (47). No obstante, esta clasificación ha sufrido modificaciones recientemente, al objetivarse que los subgrupos MSL e IM se debían más a expresión génica del microambiente que de las propias células tumorales, reduciendo la clasificación a 4 subgrupos: BL1, BL2, M y LAR (44,48). La mayoría de los tumores BL1, BL2 y M se corresponden con tumores BL por PAM50, mientras que los tumores LAR son el principal

componente del subtipo no-BL. Se ha desarrollado y validado un panel de 101 genes que permiten la clasificación de los subtipos de Lehmann de forma robusta, acercando esta herramienta a la práctica clínica habitual, además de una plataforma web que permite su realización (49,50).

En el año 2014 surgió una nueva clasificación por el Baylor College of Medicine, que clasificó el CMTN en 4 grupos: "luminal androgen receptor" (LAR), mesenquimal (MES), basal-like inmunoactivado (BLIA) y basal-like inmunosuprimido (BLIS) (51). El subtipo LAR, superponible al subtipo descrito por Lehmann, se caracterizaba por la señalización de las vías del RE y AR entre otros. El subtipo MES se asoció a sobreexpresión de genes relacionados con las vías del ciclo celular, reparación del DNA por "mismatch repair" y vías de los factores de crecimiento (IGF1). El subtipo BLIS presentó una infraexpresión de genes relacionados con procesos inmunes, mientras que los tumores BLIA presentaron sobreexpresión de estos genes. El subtipo BLIA fue el que se asoció a un mejor pronóstico, frente a los tumores BLIS. Al comparar esta clasificación con el PAM50, todos los tumores BLIS y BLIA se correspondieron con tumores basal-like por PAM50, mientras que el subtipo LAR incluyó todos los tumores luminales A, B y HER2E de la muestra. El subtipo MES, por su parte, incluyó los tumores basal-like restantes y normal-like. Por otro lado, se objetivó una concordancia completa entre los subtipos LAR de la clasificación de Burstein y Lehmann, y entre el subtipo M y MES. Los subtipos BL1 y BL2 se distribuyeron entre los subtipos BLIS y BLIA de Burstein, y los tumores IM entre BLIA y MES.

Otra de las clasificaciones surgidas en los últimos años es la de Jézéquel et al, que clasificaba el CMTN en 3 subtipos (52). Por un lado, el grupo C1 o LAR, caracterizado por un bajo

índice proliferativo y ser no-basal. Por el contrario, C2 y C3 eran dos grupos de tumores basales a nivel de IHQ (CK5 y/o HER1 +, Ki67 alto), siendo C2 el grupo con mayor índice proliferativo. No obstante, la principal diferencia entre los subgrupos basales C2 y C3 fue la respuesta inmune, definiéndose como basal-like con baja respuesta inmune (C2-LIR y alto macrófagos M2) o alta respuesta inmune (C3-HIR y bajo M2). Al contrastar con las otras clasificaciones moleculares, C1 estaba compuesto en su mayoría por tumores luminales A y B, C2 era un grupo basal puro, y C3, aunque predominaban los tumores BL por PAM50, contenía otros subtipos. La mayoría de los tumores claudin-low se incluyeron en el grupo C3. Al comparar esta clasificación con la de Lehmann, el grupo C1 se correspondía fundamentalmente a tumores LAR, C2 incluía a los BL1 y M (47,6% y 42,6%), mientras que C3 estaba predominantemente compuesto por IM y MSL (65,5% y 13,8%).

Aunque las clasificaciones surgidas presentan sus diferencias, en conjunto, estas 3 clasificaciones moleculares específicas de CMTN subdividen estos tumores en 4 grupos principales. Por un lado, el subtipo basal, caracterizado por expresión de vías del ciclo celular y reparación del daño al DNA; el subtipo mesenquimal, definido por la expresión de genes de motilidad celular, interacción con la matriz extracelular, transición epitelio-mesénquima y señalización por factores de crecimiento; el subtipo inmune, enriquecido en genes implicados en los procesos inmunes celulares; y, por último, el subtipo LAR, cuya característica principal es la expresión de genes de la vía androgénica (45).

Además de las clasificaciones basadas en expresión génica de mRNA, se han desarrollado otras clasificaciones en base a otros fenómenos intracelulares. Liu et al han integrado datos de

expresión génica por mRNA y RNAs largos no-codificantes (lncRNAs) para la clasificación del CMTN, clasificándolo en 4 grupos: LAR, MES, IM y BLIS (53). El análisis epigenómico de los tumores, mediante el estudio de la metilación, ha creado una nueva clasificación de CMTN en 3 grupos (54). Por último, también se ha desarrollado una nueva clasificación molecular basada en la alteración en el número de copias, con buena concordancia con el PAM50 (55).

	Subtipos	Distribución	Características
PAM50 + Claudin-low. Perou et al 2000. Prat 2010	Basal-like	50-80%	Ausencia de expresión de genes relacionado con el RE, sobreexpresión de CK basales y genes de proliferación.
	HER2E	5-15%	Sobreexpresión de ERBB2 y genes relacionados, sobreexpresión de genes de proliferación. Expresión intermedia expresión de RE y genes relacionados
	Lum A	1-5%	Sobreexpresión de genes de diferenciación luminal. Baja expresión de genes de proliferación y ciclo celular.
	Lum B	1-10%	Sobreexpresión de genes de diferenciación luminal, menor expresión de RP y FOXA1 que Luma. Sobreexpresión de genes de proliferación y ciclo celular.
	Claudin-low	10-30%	Baja expresión de genes relacionados con la diferenciación luminal y de genes de adhesión intercelular. Sobreexpresión de genes de la transición epitelio mesénquima, respuesta inmune y de células madre tumorales
TNBCtype-4 Lehmann 2016	BL1	35%	Genes de perfil basal. Ciclo celular y respuesta al daño al DNA.
	BL2	22%	Genes de perfil basal. Vías de los factores de crecimiento y marcadores mioepiteliales. Metabolismo.
	M	25%	Vías de diferenciación celular, motilidad celular e interacción con la matriz extracelular.
	LAR	17%	Señalización por andrógenos.
Burstein et al. 2015	LAR	19%	Señalización por andrógenos y vía del RE.
	Mesenquimal (MES)	24%	Señalización por factores de crecimiento, ciclo celular, reparación del DNA.
	BLIS	30%	Infraexpresión de vías de células B, T, NK y citoquinas. Sobreexpresión de FT SOX.
	BLIA	28%	Sobreexpresión de vías de células B, T, NK y citoquinas. Sobreexpresión de FT STAT.
Jézéquel et al. 2015	C1-LAR	22%	Bajo índice proliferativo, no-basal.
	C2-LIR	45%	Basal, baja respuesta inmune, aumento de macrófagos M2
	C3-HIR	33%	Basal, alta respuesta inmune, baja respuesta macrófagos M2

1.3. CMTN y MUTACIONES EN BRCA.

1.3.1. Frecuencia de mutaciones BRCA y genes de reparación homóloga en CMTN.

La relación entre CMTN y mutaciones en los genes BRCA1/2 se conoce desde hace tiempo. Se estima que el riesgo acumulado de desarrollar un cáncer de mama u ovario en las pacientes portadoras de mutación en BRCA1 y BRCA2 alcanza el 83% y 76%, y que, de estos CM, en torno al 60-80% y 20-25% serán CMTN respectivamente (56). El CMTN, a su vez, se asocia a una prevalencia del 10 a 20% de mutaciones de BRCA1/2 en línea germinal, con un porcentaje mayor en poblaciones seleccionadas de pacientes, como en los judíos askhenazi, en los que podría alcanzar el 40% (57,58). La detección de mutación en BRCA1/2 se asocia a una edad más temprana al diagnóstico y a una historia familiar positiva, aunque se estima que hasta un 5,7% de las pacientes con CMTN y sin antecedentes familiares podrían ser portadoras de una mutación (59). Se calcula que hasta un 18% de las mujeres con CMTN menores de 60 años presentan mutación en alguno de estos genes, frente a <5% en las mayores de 60 años (57). Por tanto, las guías NCCN avalan la realización de test diagnósticos en las pacientes diagnosticadas de un CMTN a una edad <60 años (60). Las pacientes portadoras de mutación en BRCA2 presentan los tumores a una edad más avanzada que las pacientes portadoras de mutación en BRCA1 (61).

La mutación en BRCA no se ha asociado a diferencias pronósticas en las pacientes con CMTN, tanto para la supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED de 80,5% para portadoras frente a 76,9% en no portadoras), como en sitio de metástasis o mortalidad específica por CM (62).

El hallazgo de una mutación en BRCA se acompaña de importantes implicaciones terapéuticas y preventivas, puesto que la identificación de estas pacientes permite la realización de maniobras reductoras de riesgo, como la mastectomía bilateral profiláctica y salpingooforectomía profiláctica (SOP), además de la adecuación del seguimiento a las características de riesgo de la paciente y familiares. La mastectomía bilateral profiláctica reduce en un 90% el riesgo de CM en las mujeres portadoras, aunque no se ha objetivado un beneficio en supervivencia, mientras que la mastectomía contralateral reductora de riesgo se ha asociado a una disminución del riesgo de CM y de la mortalidad específica. La SOP ha demostrado reducir en un 80-90% el riesgo de cáncer de ovario y en estas mujeres se asocia a una reducción en la mortalidad, aunque existen controversias sobre el efecto protector de la SOP sobre el CM (56,63).

1.3.2. BRCA y la recombinación homóloga:

BRCA1/2 están implicados en los mecanismos de reparación del daño de doble cadena del DNA por reparación homóloga. El daño de la doble hebra del DNA provoca una interrupción en la continuidad en las moléculas de DNA, que no puede ser reparada por los mecanismos habituales. Por el contrario, es necesaria la puesta en marcha de la reparación basada en recombinación homóloga, mediante la cual BRCA1 es reclutada al lugar del daño junto con otras enzimas de reparación, y donde participa en la resección de los bordes del DNA y creación de una molécula de DNA de hebra única. A continuación, es necesario la formación de un macrocomplejo por BRCA1, BRCA2, PALB2 y RAD51 para continuar la reparación del daño (64).

Las células con mutaciones en BRCA1/2 tienen por tanto una deficiencia en la reparación de los daños de doble cadena del DNA, resultando en la reparación de estos daños por mecanismos alternativos potencialmente mutagénicos. Esta reparación del daño al DNA no conservadora genera una inestabilidad genómica que podría estar en la base de la predisposición de estas pacientes al desarrollo de tumores. En condiciones normales, ante un daño genético, los puntos de control en el ciclo celular actuarían, deteniendo el avance del ciclo celular hasta su reparación o derivando a la célula a la apoptosis. Sin embargo, parece que en las pacientes portadoras de BRCA se produce un escape a estos puntos de control, mediante mutaciones en TP53 o aurora kinasa 2.

Las deficiencias en la reparación del daño de doble hebra condicionan una especial sensibilidad a los agentes que inducen daño en el DNA como las sales de platino o los inhibidores de la poly(ADP-ribose) polimerasa (PARP). Esta enzima está implicada en la reparación del daño de hebra simple del DNA, y, su disfunción deriva en roturas de doble cadena, que, en presencia de deficiencias asociadas en la reparación homóloga inducirán la muerte celular. Los estudios iniciales con inhibidores de PARP han demostrado tasas de respuesta esperanzadoras en este subgrupo de pacientes, y, en especial, en pacientes con CMTN, con un perfil de seguridad muy favorables. Están ahora mismo en desarrollo tanto para la enfermedad metastásica como para la enfermedad localizada (65,66).

1.3.3. Fenotipo BRCAness.

Además, en un porcentaje significativo de pacientes se objetiva una deficiencia en los mecanismos de reparación del DNA que remedan las alteraciones características de las mutaciones en BRCA, ya sea por silenciamiento epigenético de estos genes o por mutación en genes con funciones relacionadas (PALB2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, familia FANC y ATM entre otros) (67,68). Este fenotipo “BRCAness” se encuentra hasta en un 30-70% de los CMTN según las series (69). El silenciamiento de BRCA secundario a hipermetilación de las islas CpG y represión de la transcripción, podría ocurrir hasta en el 30% de los CMTN, siendo mutuamente excluyente con las mutaciones.

1.4. TRATAMIENTO DEL CMTN.

1.4.1. Indicaciones del tratamiento neo/adyuvante.

El CM es una enfermedad sistémica, e incluso en estadios precoces I-III resecaados, hasta el 30,6% de pacientes podrían presentar micrometástasis en médula ósea, con una mayor incidencia a mayor tamaño tumoral, afectación ganglionar o fenotipo TN (70). En consecuencia, gran parte de los tumores diagnosticados en estadios localizados van a requerir un tratamiento con quimioterapia complementario a los tratamientos locales, a fin de intentar reducir las recidivas a distancia. Este tratamiento complementario, en caso de administrarse tras la cirugía debe iniciarse en las 2 a 6 semanas siguientes a la cirugía, puesto que un retraso mayor a 12 semanas conlleva un importante deterioro en la SLE y SG (71).

Sin embargo, el tratamiento neoadyuvante ha cobrado una especial relevancia en CMTN, al demostrar resultados equivalentes al tratamiento adyuvante en términos de SLE, SLED y SG, acompañándose de un incremento en el número de cirugías conservadoras (72,73). Pero, sin duda, el principal valor de la QTNA reside en su valor pronóstico, en especial en CMTN y HER2-positivo, al representar un test in vivo de la quimiosensibilidad del tumor en la paciente (74).

La indicación de quimioterapia adyuvante o neoadyuvante en el CM se realiza en base al perfil IHQ y estadificación clínica, tamaño tumoral y afectación ganglionar. En el caso del CMTN, el tratamiento complementario con quimioterapia está indicado en prácticamente todos los casos, considerándose que todo tumor mayor a 0,5 cm (> T1a) se beneficia de la quimioterapia adyuvante, salvo excepciones de histologías de buen pronóstico (carcinoma apocrino, adenocarcinoma quístico o secretor juvenil) (75). Por tanto, en este subtipo de tumores cada vez tiene más valor la administración del tratamiento previo a la cirugía.

Además, la realización de estudios en el escenario neoadyuvante permite una obtención de resultados rápida y eficiente para probar nuevos fármacos (76). Los estudios adyuvantes exigen tamaños muestrales muy elevados, así como un largo tiempo de seguimiento hasta la obtención de los resultados. Al contrario, el tratamiento neoadyuvante permite la aprobación acelerada de nuevos fármacos, abaratando el acercamiento de los nuevos fármacos al paciente, como ha sido el caso del pertuzumab en cáncer de mama precoz HER2-positivo (77). Sin embargo, el beneficio objetivado en términos de pCR no siempre tiene una traducción en los objetivos a largo plazo, como fue el caso de los estudios con lapatinib en cáncer de mama HER2-positivo, NeoALTTO y ALTTO (78,79).

1.4.2. Evaluación de la respuesta a la neoadyuvancia:

La evaluación de la respuesta a neoadyuvancia se realiza en términos de respuesta patológica completa (pCR) y tumor residual. Aunque existen diversas definiciones de pCR, la ausencia de tumor en mama y axila (ypT0 ypN0) o la ausencia de tumor invasivo en mama y axila (ypT0/is ypN0) son las que conllevan un mayor valor predictivo, sin prácticamente diferencias entre ambas (74).

Sin embargo, la categorización dicotómica en pCR y enfermedad residual (“residual disease”, RD) es insuficiente, puesto que el RD engloba un amplio abanico de respuestas al tratamiento. En consecuencia, se han establecido diferentes herramientas para la medida del tumor residual, todas ellas con impacto pronóstico (80). Una de las clasificaciones iniciales evaluaba el estadio TNM tras el tratamiento (yTNM), objetivando que sólo el 18% de las pacientes con estadio IIIC post-tratamiento se encontraban libres de enfermedad a distancia a 5 años (81). Posteriormente se desarrolló la clasificación del “residual cancer burden” (RCB) de Symmans, que es en el momento actual una de las más utilizadas (82). El RCB es una variable continua que toma en cuenta las dimensiones del tumor primario, la celularidad residual en el lecho tumoral y la carga de afectación axilar residual, categorizando en 3 grupos principales: RCB-I (enfermedad mínima residual), RCB-II (enfermedad residual moderada) y RCB-III (enfermedad residual extensa). Este índice RCB asocia un mayor valor pronóstico que el yTNM, y ha demostrado una alta reproducibilidad en su determinación (83).

1.4.3. Asociación de pCR y pronóstico:

La respuesta a quimioterapia neoadyuvante conlleva un importante impacto pronóstico, en especial en el CMTN y CM HER2-positivo. El mal pronóstico asociado al CMTN se centra fundamentalmente en aquellas pacientes con enfermedad residual tras neoadyuvancia, multiplicándose el riesgo de recidiva en este grupo de 6 a 9 veces (84). Se ha visto que el pronóstico de las pacientes con RD tras neoadyuvancia es significativamente peor en las pacientes TN que en las no-TN, mientras que no hay diferencias entre las pacientes que alcanzan la pCR, independientemente de su perfil IHQ (TN/no-TN) (85). No obstante, todavía no se ha podido demostrar la correlación entre el aumento en la tasa de pCR y la mejoría en SLE y SG (86). La carga de enfermedad residual tiene también un impacto pronóstico clave, y, en CMTN en concreto, se objetivó que las pacientes con pCR o RCB-I se asociaban a una SLE a 10 años del 86 y 81%, frente al 55 y 23% de las RCB-II y RCB-III respectivamente (87).

Aunque el impacto de la pCR en el pronóstico es claro, traducir el beneficio en términos de pCR a supervivencia a largo plazo no siempre es evidente, y puede verse artefactado por diversos factores, entre los que destacan los tratamientos adyuvantes posteriores y las características de riesgo de la población inicial. Además, las pacientes con enfermedad residual mínima podrían tener un pronóstico similar al de las pacientes con pCR, y, por último, en torno a un 5-6% de las pacientes tendrán una recidiva a distancia a pesar de alcanzar la pCR (87,88).

1.4.4. Tratamiento sistémico del CMTN.

El CMTN se asocia a una mayor respuesta al tratamiento QT que el resto de subtipos, y, sin embargo, a un peor pronóstico a largo plazo, “la paradoja del TN”. Como se ha comentado previamente, este mal pronóstico se deriva fundamentalmente de las pacientes con enfermedad residual tras neoadyuvancia (89,90).

No existe un consenso sobre el esquema de quimioterapia neoadyuvante recomendado para las pacientes con CMTN, y en especial, sobre la incorporación de las sales de platino al tratamiento a la población de CMTN general o restringido a las pacientes portadoras de mutación en BRCA.

1.4.4.1. Neoadyuvancia con esquemas clásicos:

La combinación de antraciclinas y taxanos es el estándar en muchos centros para el tratamiento del CMTN (91). En la tabla 2 se recogen alguno de los estudios disponibles con este esquema en neoadyuvancia del CMTN, obteniendo una tasa de pCR global en torno al 35%, según un análisis combinado realizado por un grupo alemán (92). El uso de taxanos y los esquemas de dosis densas se asociaron a un incremento significativo en la tasa de pCR (93,94). Por el contrario, existe evidencia de que el CMTN podría tener una resistencia intrínseca a las antraciclinas (95).

Tabla 2. Respuesta a QTNA con esquemas clásicos.

Esquema QT	N	Estadio tumoral	pCR	Definición pCR	Referencia
AC x4 → +/- T x8	34	II, III	27%	ypT0/is ypN0	Carey 2007 (89)
Antraciclinas y taxanos (análisis combinado)	542	I-III	34%	ypT0/is ypN0	Von Minckwitz 2011. (92)
T x 12 → FAC x 4 (basal-like por expresión génica)	22	I-III	45%	ypT0/is ypN0	Rouzier 2005 (96)
FAC/FEC/AC TFAC/TFEC	255	I-III	20% 28%	ypT0/is ypN0	Liedtke 2008(85)
Docetaxel	28	IIB-III B	29%	RCB0+RCB1	Martin 2011. (95)
Doxorrubicina	20		10%		
ddAC - Nab-paclitaxel	35	IIB-III C	28,6%	ypT0/is ypN0	SWOG S0800 Nahleh 2016. (93)
ddAC - Nab-paclitaxel - Bevacizumab	32		59,4%		
wPaclitaxel	141	II-III A	21%	ypT0/is ypN0	SOLTI-neoPARP Llombart 2015 (97).
wPaclitaxel + Iniparib			17-19%		
EC-T	41	Localmente avanzado.	24%	ypT0/is ypN0	Giacchetti 2014. (94)
DdEC	21		48%		
AC → Docetaxel	143	I-III	46,2%	ypT0/is ypN0	Jung 2016. (98)
wPaclitaxel x 12 → ddAC	108	II-III	39%	ypT0/is ypN0	Sikov 2015. (99)
WPaclitaxel → FEC	38	II-III A	26,3%	ypT0/is ypN0	Ando 2014. (100)

A: adriamicina, C: ciclofosfamida, T: docetaxel, F: 5-fluorouracilo, dd: dosis densas, E: epirrubicina, wPaclitaxel: paclitaxel semanal.

1.4.4.2. Neoadyuvancia con sales de platino:

Dada la frecuencia de alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA en el CMTN, cada vez va cobrando más importancia la incorporación de las sales de platino a su tratamiento. El estudio TNT, realizado en CMTN metastásico, objetivó que las pacientes portadoras de mutación germinal en BRCA1/2 presentaban un beneficio claro con carboplatino frente

docetaxel, con una tasa de respuesta del 68,0% y 33,3% respectivamente ($p=0,03$) y un beneficio en supervivencia libre de progresión (SLP) (6,8 frente a 3,1 meses). Por el contrario, en las pacientes sin mutación no hay beneficio con el uso de platino (101).

En CMTN precoz, las primeras evidencias sobre el uso de sales de platino surgieron de ensayos de monoterapia, con tasas de pCR del 21% en población de CMTN no seleccionada, y de hasta el 61% en pacientes con CMTN portadoras de mutación en BRCA1. Estas tasas de pCR fueron superiores en las pacientes tratadas con sales de platino que con esquemas clásicos (102–104). Sin embargo, el tratamiento en monoterapia es insuficiente para una gran proporción de las pacientes con CMTN, y, por tanto, es su uso en combinación el que está suscitando mayor interés. En la tabla 3 se encuentran recogidos diferentes estudios de tratamiento neoadyuvante del CMTN con sales de platino. Un metaanálisis reciente objetiva que la adición de carboplatino se asocia a un aumento significativo de las tasas de pCR (105,106).

Existen multitud de ensayos que han demostrado un incremento en las tasas de pCR con la inclusión de las sales de platino al tratamiento del CMTN. Entre ellos destaca el ensayo CALGB40603, en el que las pacientes recibían ddAC, seguido de paclitaxel, asociado a carboplatino, bevacizumab o la combinación de ambos (99). Se objetivó un incremento en la tasa de pCR con ambos fármacos, aunque sólo la adición de carboplatino alcanzó la significación estadística (54% vs 41%, $p=0,0029$), siendo las pacientes que recibieron ambos fármacos las que obtuvieron mejores pCR (60,0%). Además, en la actualización de los datos se ha objetivado un incremento no significativo en la SLE a 3 años, 76,5 y 71,6% para las pacientes con y sin carboplatino neoadyuvante (107). Otro de los ensayos principales fue el GEPARSIXTO, en el que

las pacientes recibían paclitaxel, adriamicina liposomal no pegilada y bevacizumab, con o sin carboplatino (108). Entre las pacientes con CMTN, la adición de carboplatino se tradujo en un incremento significativo de la tasa de pCR, 42,7% vs 53,2% ($p=0,005$), con un incremento significativo en SLE a 3 años, 76,1% frente a 85,8% ($p=0,035$). Resulta llamativo que el beneficio del carboplatino en este ensayo fue mayor en las pacientes sin mutación de BRCA1 (33,1 vs 50,8%, $p=0,005$) que en aquellas BRCA1 mutadas (50,0 vs 61,5%, $p=0,41$) (109). Sin embargo, no todos los estudios ni las distintas secuencias de administración han podido demostrar un beneficio de la adición de las sales de platino, como es el caso del ensayo GEICAM/2006-03 (110).

La elevada toxicidad de los esquemas de poliquimioterapia ha hecho que se explore la combinación de sales de platino sin antraciclinas, y, en especial, los esquemas con carboplatino y taxanos (docetaxel o paclitaxel), con tasas de pCR que alcanzan el 50-67% (111–115). La combinación de carboplatino y docetaxel demostró recientemente la superioridad frente a ET en términos de pCR (38,6% vs 14%, $p=0,014$) así como en SLE (115).

Tabla 3. Respuesta a QTNA con sales de platino en CMTN

Esquema QT	N	Tumor stage	Pcr	Definición pCR	Referencia
CDDP x 4	28	II-III	22%	Miller-payne	Silver 2010 (102)
CDDP x 4 ciclos (BRCA1-mut)	107	I-III	61%	YpT0/is ypN0	Byrski 2014 (103)
CDDP x4 – Bevacizumab x3	46		15% MP5 22% MP4	Miller-Payne 4-5	Ryan 2009 (116)
wP x12 → ddAC x4	107	II-III	39%	ypT0/is ypN0	CALGB40603, Sikov 2015 (99)
wP x12 - Bev → ddAC x4 - Bev	105		43%		
wP x12 - Cb x4 → ddAC x4	111		49%		
wP x12 - Cb x4 - Bev → ddAC x4 – Bev	110		60%		

wP-w lip-Dox - Bev	157	II-III	42,7%	ypT0/is ypN0	Geparsixto Von Minchwitz 2014. (108)
wP-w lip-Dox - Bev + wCb	158		53,2%	ypT0/is ypN0	
Cb – Gemcitabina – Iniparib x 6	80	I-III	36% (56% TN y BRCA1/2mut)	ypT0/is ypN0	PrECOG 0105 Telli 2015 (117)
EC-T	94 (basal IHQ)		35%	YpT0	GEICAM/2006-03 Alba 2012 (110)
EC-TCb			30%		
Sales de platino + taxanos +/- AC	144	II-III	31%	ypT0/is ypN0	Hurley 2013 (118)
TCb x6	190	I-III	55%	ypT0/is ypN0	Sharma 2016 (111)
TCb x6	30	I-III	50%	ypT0/is ypN0	Kern 2013 (112)
Cb-paclitaxel x 4-6	47	II-III	38,6%	ypT0/is ypN0	Zhang 2016 (115)
ET x4-6	44		11,4%		
wCb-Nab-paclitaxel x12	154	I-III	45,9%	YpT0/is ypN0	Gluz 2015. (119)
Gemcitabina- Nab-paclitaxel x12	182		28,7%		I-SPY2, Rugo 2016 (120)
Paclitaxel-Cb-Veliparib → AC			51%		
Paclitaxel → AC			26%		
wP → FEC	37	II-III A	26,3%	ypT0/is ypN0	Ando 2014 (100)
wP + Cb → FEC	38		61,2%		
Cb - Eribulina x 4	30	I-III	43,3%	ypT0/is ypN0	Kaklamani 2015 (121)
CDDP - Paclitaxel	49	II-III	48%	ypT0/is ypN0	Jovanovic 2017 (122)
CDDP – Paclitaxel - Everolimus	96		36%		

A: adriamicina, C: ciclofosfamida, T: docetaxel, F: 5-fluorouracilo, dd: dosis densas, E: epirrubicina, wP: paclitaxel semanal, Cb: carboplatino, CDDP: cisplatino, lip-Dox: doxorubicina liposomal, TCb: carboplatino-docetaxel, Bev: bevacizumab.

Además de las sales de platino, están cobrando cada vez mayor interés la incorporación de terapias diana al tratamiento del CMTN, como el bevacizumab o inhibidores de PARP (123). Uno de los estudios que ha evaluado el valor de la adición de carboplatino y veliparib a terapia estándar (wP → AC) ha sido el I-SPY 2, en el que se estimó la probabilidad de alcanzar la pCR en el 51%, frente al 26% con la terapia estándar (120).

1.5. PREDICCIÓN DE RESPUESTA A NEOADYUVANCIA EN CMTN.

A pesar de las mejoras en los tratamientos, hasta un 30-40% de las pacientes con CMTN precoz presentarán una recidiva de su enfermedad y hasta un 25-35% fallecerán por esta misma causa (94). El exceso de muertes en CMTN se concentra prácticamente de forma completa en las pacientes con enfermedad residual tras neoadyuvancia (89). Este impacto pronóstico detrimental de la enfermedad residual tras neoadyuvancia obliga a intensificar la búsqueda de factores predictivos de respuesta a neoadyuvancia en las pacientes con CMTN, con el fin de ofrecer nuevas opciones terapéuticas a las pacientes.

Se ha intentado identificar factores clínicos y patológicos asociado a la respuesta, como el índice proliferativo, el fenotipo IHQ, así como factores genómicos del tumor (98,124,125). Muchos estudios han evaluado la asociación de la expresión de determinadas firmas génicas a la respuesta y pronóstico del cáncer de mama, evidenciándose que la sobreexpresión de firmas génicas inmunes se asocia a una mejor respuesta al tratamiento (126,127). En algunos estudios también se sugiere que las mutaciones en BRCA o deficiencias en los mecanismos de recombinación homóloga (“BRCAness”) podrían asociarse a la respuesta a QTNA basada en platinos en CMTN, aunque existen controversias al respecto (128–130).

1.6. INFILTRACIÓN POR TILS EN CMTN:

No obstante, uno de los factores predictivos de respuesta y pronósticos que mayor interés está generando es la infiltración del tumor por linfocitos, fundamentalmente linfocitos T “helper”

y T citotóxicos, y, en menor medida linfocitos B, linfocitos T reguladores, macrófagos y “natural-killer” (131–133). La infiltración por TILs se asocia a un mayor grado histológico, y a la negatividad de los receptores hormonales. En efecto, el CMTN tiene una mayor infiltración por TILs que los tumores luminales, y alrededor del 20-30% de los tumores presentan más del 50-60% del estroma ocupado por TILs, definiéndose como tumores de predominio linfocítico (LPBC). La infiltración por TILs asocia un importante valor pronóstico en CMTN y tumores HER2-positivo (134). En CMTN, la infiltración por TILs ha demostrado un beneficio lineal, con una reducción significativa del riesgo de recidiva, recidiva a distancia y muerte por cada 10% de incremento de TILs (134–136). Las TILs han demostrado además un valor predictivo de respuesta, como se ha puesto de manifiesto en diversos estudios. En el GEPARSIXTO, por ejemplo, se ha visto que la infiltración por TILs se asociaba de forma significativa a la tasa de pCR (59,9% vs 33,8% para aquellas con mayor infiltración por TILs), alcanzando el 74% de pCR entre los LPBC (137).

1.7. ENFERMEDAD RESIDUAL POST-NEOADYUVANCIA:

Hay multitud de mecanismos por los que la célula tumoral puede escapar de la muerte celular por apoptosis y mantener su viabilidad, entre los cuales destacan las bombas transportadoras de fármacos, alteraciones enzimáticas o alteración de la apoptosis (138). El interés de la enfermedad residual post-neoadyuvancia radica en que estas células persistentes tras la quimioterapia son potencialmente las precursoras de las futuras metástasis en la paciente. Se ha descrito que presentan rasgos de células mesenquimales y de células iniciadoras de tumores, similares a los tumores claudin-low (139). En CMTN se ha objetivado un

enriquecimiento en células iniciadoras de tumores CD49f+ durante el tratamiento con docetaxel, condicionando resistencia al mismo (140). Además, el análisis de esta enfermedad residual en CMTN ha demostrado tener un valor pronóstico, y se evidencia que hasta en el 90% de los casos presentan alteraciones en vías potencialmente abordables, e incluso se han desarrollado escalas pronósticas en base a su análisis proteómico (141,142).

Como se ha detallado previamente, estas pacientes con enfermedad residual tras neoadyuvancia asocian un mal pronóstico a largo plazo, y representan por tanto un verdadero reto. La identificación a priori de los mecanismos implicados en su resistencia a los tratamientos convencionales y la implicación de vías potencialmente tratables permitiría la realización de ensayos con nuevos fármacos con el fin de intentar rescatarlas.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN:

El CMTN es un subgrupo de cáncer de mama con un curso especialmente agresivo y un mal pronóstico a largo plazo. Se estima que en torno al 30-40% de las pacientes con CMTN diagnosticados en estadios precoces recidivarán y acabarán falleciendo por el tumor. Este mal pronóstico viene sobre todo derivado de las pacientes que no alcanzarán la pCR tras la terapia neoadyuvante, estimada en torno al 50% con los tratamientos actuales. Es imprescindible lograr la identificación a priori de las pacientes con alta probabilidad de respuesta a QTNA, a fin de centrar en aquellas potencialmente quimio-resistentes la búsqueda de nuevos tratamientos.

2.2. HIPÓTESIS:

La identificación de factores predictivos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante con carboplatino y docetaxel en CMTN permitirá definir a las pacientes candidatas a recibir este esquema, y, por el contrario, buscar alternativas terapéuticas para las pacientes potencialmente resistentes. El subtipo intrínseco basal-like definido por PAM50 y la correlación al centroide basal serían factores predictivos de respuesta a neoadyuvancia basada en TCb, que podrían ayudar a la selección de estas pacientes. De la misma manera, la presencia de mutaciones en línea germinal de genes de recombinación homóloga se asociaría a la respuesta a la QTNA. Por último, el perfil diferencial de expresión génica tumoral entre pacientes respondedoras y no respondedoras contribuirá a caracterizar biológicamente ambos grupos de pacientes.

2.3. OBJETIVOS:

Objetivo principal:

- Evaluar la capacidad predictiva de respuesta a QTNA con TCb del subtipo basal-like por PAM50 frente al resto de subtipos mediante PAM50 (Nanostring Technologies) en pacientes con CMTN.

Objetivos secundarios:

- Evaluar la capacidad predictiva de respuesta a QTNA con TCb de la correlación al centroide basal y luminal A, tanto en la muestra global de pacientes con CMTN como en las pacientes con subtipo basal-like.
- Evaluar la asociación del proliferation score (PS) y risk of recurrence (ROR) a la respuesta a QTNA con TCb, tanto en muestra global de pacientes con CMTN como en las pacientes con subtipo basal-like .
- Evaluar la asociación de factores histopatológicos y del subtipo intrínseco por PAM50 a la quimiorresistencia (RCB-III) a QTNA basada en TCb en CMTN.
- Evaluar la correlación entre la determinación del PAM50 realizado por Nanostring y por RNAseq.

- Analizar la expresión génica diferencial por RNAseq entre pacientes respondedoras y no respondedoras, tanto en la muestra global de pacientes con CMTN como en las pacientes con subtipo basal-like.
- Evaluar la capacidad predictiva de respuesta a QTNA con TCb de los subtipos moleculares de CTMN de Lehmann (TNBCtype-4).
- Evaluar la capacidad predictiva de respuesta a QTNA con TCb de las mutaciones en línea germinal de genes de reparación homóloga.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DE ESTUDIO:

Para testar la hipótesis planteada y resolver los objetivos descritos, se diseña un estudio clínico no-aleatorizado, observacional, prospectivo y analítico, internacional y multicéntrico (NCT 01560663), iniciando la inclusión de pacientes en el año 2010.

3.1.1. Criterios de inclusión:

- Sexo femenino.
- Edad \geq 18 años.
- Diagnóstico de cáncer de mama tripe negativo definido por IHQ: RE <1%, RP <1% y HER2 negativo de acuerdo con las guías ASCO (2,5).
- Estadios IB-IIIC según el estadiaje de la AJCC 7ª edición (143).
- Adecuadas funciones renal, hepática y medular.
- ECOG 0-2.
- Candidatas a tratamiento neoadyuvante con carboplatino y docetaxel (TCb) según práctica clínica habitual.
- Consentimiento informado por escrito.

3.1.2. Criterios de exclusión:

- Tratamiento con quimioterapia previo.

3.1.3. Tratamiento:

Las pacientes incluidas en el estudio recibían 6 ciclos de carboplatino área bajo la curva (AUC 6) y docetaxel 75 mg/m² el día 1 de cada 21 días, asociado a G-CSF profiláctico y premedicación habitual según práctica clínica; hasta completar 6 ciclos, progresión o toxicidad inaceptable. Tras finalizar el tratamiento neoadyuvante se procedía a cirugía, definiéndose el tipo de cirugía (conservadora o mastectomía) y el tratamiento sobre la axila de acuerdo a la práctica clínica habitual. La administración de radioterapia adyuvante posterior se realizaba según indicación clínica. Quedaba a la elección del investigador la administración de quimioterapia adyuvante y el esquema o duración de la misma en caso de enfermedad residual.

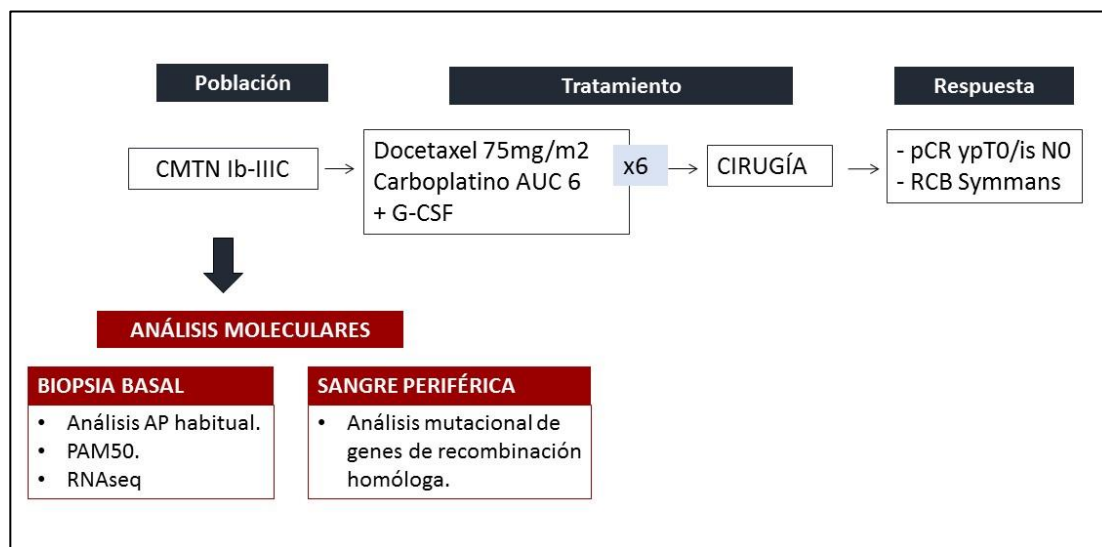


Figura 1. Diseño del estudio

3.1.4. Evaluación patológica de las muestras:

La valoración histopatológica de la biopsia basal para la determinación de marcadores IHQ (ER, PR, Ki67, grado histológico) y determinación de HER2 (IHQ o por hibridación in situ) se realizó a nivel local, en los respectivos centros participantes.

La evaluación de la respuesta se realizó asimismo a nivel local, según la práctica clínica habitual.

3.1.5. Evaluación de la respuesta:

La evaluación de la respuesta a la quimioterapia se realizó en base a la obtención de la respuesta patológica completa, definida como ausencia de tumor invasivo en mama y axila (ypT0/is ypN0), y medida de la carga de tumor residual mediante el Residual Cancer Burden (RCB) por Symmans et al (<http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3>) (82).

El RCB es una medida continua calculada como:

$$\text{RCB} = 1.4(f_{\text{inv}}d_{\text{prim}})^{0.17} + [4(1 - 0.75^{\text{LN}})d_{\text{met}}]^{0.17}, \text{ siendo:}$$

- d_{prim} : diámetro del lecho tumoral primario en la pieza de resección quirúrgica ($\sqrt{d1d2}$)
- f_{inv} : proporción del lecho tumoral ocupada por carcinoma invasor
- LN: número de ganglios linfáticos invadidos por el tumor.

- d_{met} : diámetro de la mayor metástasis ganglionar

El RCB permite tanto su estimación como medida continua como su clasificación en 4 categorías:

- RCB-0: respuesta patológica completa.
- RCB-I: enfermedad mínima residual.
- RCB-II: enfermedad residual moderada.
- RCB-III: enfermedad residual extensa.

3.1.6. Confidencialidad y aspectos ético-legales:

Este estudio está registrado en www.clinicaltrials.gov (NCT01560663), autorizado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (MMJ-CAR-2014-01) y fue aprobado por el Comité de Ética de todos los centros participantes. Todas las pacientes incluidas en el estudio firmaron un consentimiento informado por escrito.

A fin de garantizar la confidencialidad, se procedió a la codificación de los datos de las pacientes mediante la asignación de un código único. El tratamiento de los datos de carácter personal se ajustó a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y su reglamentación posterior.

Este estudio cuenta con financiación pública (PI12-02684) del Instituto de Salud Carlos III.

3.1.7. Cálculo del tamaño muestral:

El diseño del estudio y cálculo del tamaño muestral se realizó siguiendo las recomendaciones REMARK (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies). (144). Teniendo en cuenta que la pCR estimada era de alrededor del 50% con TCb, se propuso incluir a unas 120 pacientes, asumiendo que alrededor del 20% de las pacientes no tendrían muestra suficiente para los análisis moleculares.

El estudio contará de una cohorte test, en la que se tratará de identificar marcadores predictivos de respuesta a TCb neoadyuvante, y una posterior cohorte de validación para la confirmación de los hallazgos. En este estudio se presentarán los datos de la primera cohorte de pacientes.

3.1.8. Centros participantes:

- Hospital General Universitario Gregorio Marañon (HGUGM), Madrid
- Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid
- Hospital de la Santa Creu y Sant Pau, Barcelona
- Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid
- Hospital Universitario de La Princesa, Madrid
- Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona
- Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Lima, Perú.

3.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS:

3.2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS:

Para la realización de este estudio se requería la recogida de muestra tumoral en dos momentos:

- **Biopsia basal pre-tratamiento**, para la extracción de RNA tumoral. Una pequeña parte de la muestra de la biopsia diagnóstica se utilizó para el estudio sin que en ningún momento se comprometiera el diagnóstico de las pacientes.
- **Sangre periférica pre-tratamiento**, para extracción de DNA de línea germinal. Esta extracción de sangre se realizó coincidiendo con una extracción planificada por práctica clínica habitual.
- Pieza quirúrgica tumoral para la evaluación de la respuesta patológica al tratamiento.

Ambas muestras tumorales eran parafinadas según los estándares habituales de Anatomía Patológica de cada centro participante.

Tras la evaluación anatomopatológica en cada centro individual, todas las muestras se centralizaron en el Laboratorio de Oncología Traslacional (LAOT) perteneciente al Servicio de Oncología Médica del HGUGM, para su inclusión en la colección de muestras biológicas registrada en el Instituto de Investigación Sanitaria Carlos III (C.0000188, ISCIII, Spain) destinada a Investigación en cáncer.

3.2.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

La extracción de RNA y DNA se realizó a nivel central en LAOT del HGUGM.

3.2.2.1. Extracción del RNA tumoral:

El aislamiento del RNA tumoral se realizó según los siguientes pasos:

Fase pre-analítica:

- Recepción de la muestra tumoral embebida en parafina (FFPE) según procedimiento habitual.
- Cortes con el microtomo de 4-5 μm .
- Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E): sumersión del porta en xilol durante 3 minutos, seguido de etanol absoluto durante 15-30 segundos y etanol 96º durante 15-30 segundos. Posteriormente sumersión durante 30 segundos en agua corriente y a continuación en una cubeta con Hematoxilina de Harris durante 3 minutos. Tras lavar con agua corriente, sumersión durante 15-30 segundos en cubeta con Eosina 0,5% solución alcohólica, seguido de etanol absoluto durante 15-30 segundos, etanol 96º durante 15-30 segundos y en xilol durante 1 minuto.

Fase de macrodissección:

- A continuación, el área de carcinoma invasivo es delimitado por un anatomopatólogo en el portaobjetos teñido con H&E, marcando en el porta el área tumoral y excluyendo el tejido circundante no tumoral.
- Tras delimitación del área tumoral y enfriamiento del bloque tumoral en placa fría, se procede a realizar cortes a 10 μ m con el micrótopo, dejándolos estirar en agua a 40º y posteriormente secar una noche en estufa a 45º.

Fase de extracción del RNA:

La extracción de RNA se realizó siguiendo el protocolo del RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, USA).

- Se produce digestión de la muestra con proteinasa K y se deja en buffer de lisis de tejido durante 12-23 horas a 55º. Posteriormente se incuba a 80º durante 15 minutos, se añade a la muestra buffer de fijación de parafina (PBB) y etanol absoluto a cada muestra, y se coloca la mezcla en un tubo de filtrado de alta pureza. A continuación, se añade DNAsa, se lava con buffer de lavado, y por último se procede a la centrifugación para eluir el RNA.

3.2.2.2. Extracción del DNA germinal:

La extracción de DNA de sangre periférica se realizó siguiendo con el kit QIAamp DNA Blood Midi kit (Qiagen, Valencia, CA), a partir de una muestra de 2 ml.

En primer lugar, se añade la proteasa a nuestra muestra de partida, seguido de la incorporación del buffer AL e incubación a 70°C durante 10 minutos. A continuación, se añade etanol al 96-100% y se traslada la muestra a un tubo de columnas del kit QIAamp Midi, procediendo a la centrifugación durante 3 minutos. Tras desechar el filtrado y colocar la columna en el nuevo tubo de centrifugación, se añade buffer AW1 al tubo y se centrifuga durante 1 minuto. Tras añadir buffer AW2 y centrifugación durante 15 minutos, se desecha el filtrado y se colocaba la columna en un nuevo tubo de centrifugación para la elución del DNA, con 200 µl de agua libre de nucleasas y centrifugación durante 2 minutos.

3.2.2.3. Cuantificación y control de calidad del RNA:

Los ácidos nucleicos extraídos fueron sometidos posteriormente a cuantificación y control de calidad mediante:

- NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop Products), que permite la cuantificación y evaluación de la pureza de la muestra (RNA y DNA) mediante la medición de la absorbancia de las moléculas en la muestra a una determinada longitud de onda prefijada. La pureza se evalúa mediante el cociente A260/280, estimándose que

un DNA de calidad óptima tiene un cociente A260/280 en torno a 1,7-1,8, y un RNA en torno a 2,0.

- TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Germany): permite el análisis de la integridad de los ácidos nucleicos mediante electroforesis capilar.

3.2.2.4. Conservación de los ácidos nucleicos extraídos.

Las alícuotas de RNA y DNA extraídos se conservaron a -80°C en el LAOT del HGUGM hasta su utilización para la determinación del PAM110 con tecnología nCounter y secuenciación del RNA (RNAseq) y estudio de mutaciones en DNA.

3.3. DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO INTRÍNSECO POR PAM50.

A partir del RNA tumoral, se realizó la determinación del subtipo intrínseco a través de la aplicación del PAM50 en la tecnología nCounter (Nanostring Technologies, Seattle, EEUU), en el LAOT.

3.3.1. Tecnología Nanostring:

La tecnología Nanostring permite la identificación y cuantificación digital directa de moléculas de ácidos nucleicos, sin necesidad de reacciones enzimáticas de amplificación (145). La detección se realiza a partir de una librería de 2 sondas multiplexadas dirigidas frente al gen de interés, las sondas de captura

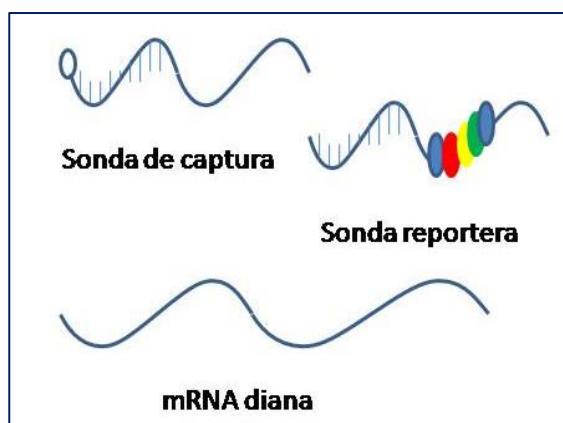


Figura 2. Sondas de Nanostring

y sondas reporteras (figura 2). La sonda de captura, compuesta por una secuencia complementaria al RNA mensajero (mRNA) diana de unos 35-50 pares de bases, y conjugada con biotina, tiene el papel de inmovilizar el mRNA diana en el cartucho. La sonda reportera, formada por una secuencia de 35-50 pares de bases complementaria al mRNA diana y acoplada a una etiqueta codificada con color, proporciona la señal de detección. El orden de la secuencia de los 6 fluoróforos crea un código único para cada gen de interés. Se usan 6 posiciones posibles con 4 colores distintos, permitiendo la creación de un código único para $4^6 = 4096$ posibles combinaciones.

La tecnología nCounter ha sido validada frente a los “microarrays”, objetivando que es capaz de detectar mRNA de baja abundancia con mayor sensibilidad que los microarrays, y permitiendo el análisis de hasta 800 genes simultáneamente (145).

Pasos:

En una primera fase, se realiza la hibridación del mRNA con las sondas para cada gen de interés, derivando en la formación de complejos de mRNA unido a sus sondas de captura y reportera específicas (figura 3).

A continuación, las sondas no hibridadas son retiradas del medio por purificación por afinidad y los complejos restantes son inmovilizados sobre el cartucho.

Después de la captura en dicha superficie, son sometidos a un campo eléctrico que alinea los

complejos para su cuantificación. Cada molécula de interés es reconocida por el código de colores identificativo situado en la sonda reportera y se procede a la medida del nivel de expresión por la cuantificación del número de códigos para cada transcrito diana previamente seleccionado.

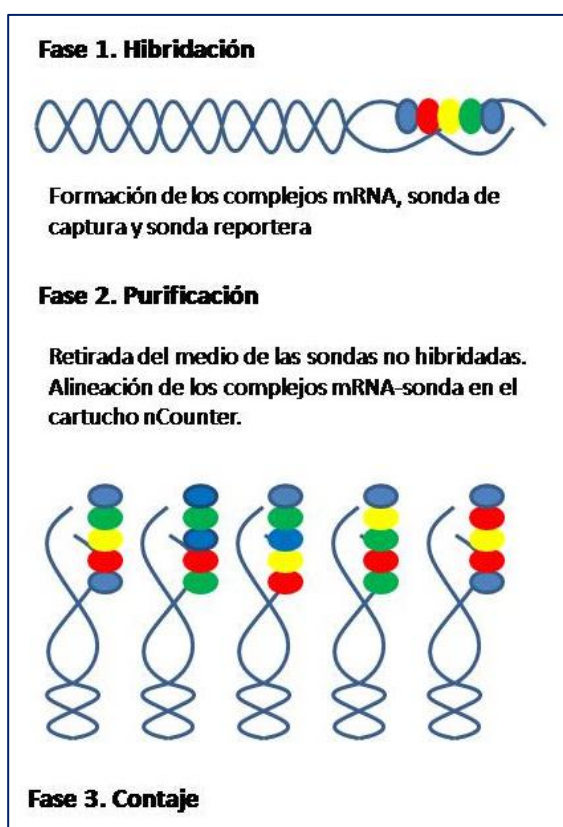


Figura 3. Tecnología Nanostring

Plataforma nCounter:

La plataforma nCounter está formada por dos instrumentos, la PrepStation, encargada de la purificación de los complejos hibridados y de su inmovilización en la superficie del cartucho, y, por otro lado, el analizador digital (DA), un escáner que identifica y contabiliza los códigos de barra capturados para cada muestra.

3.3.2. Determinación del subtipo intrínseco mediante PAM50:

La determinación del subtipo intrínseco se realiza mediante la cuantificación de la expresión génica de los 50 genes (PAM50) descritos por Parker et al (tabla 1 anexo) (146). En la tecnología Nanostring, esto se realiza con un panel prediseñado de 110 genes (PAM110) en el que se incluyen los 50 genes de interés, además de 5 genes “housekeeper”.

El análisis de los datos de expresión de estos 50 genes se realiza mediante “clustering” jerárquico, midiendo la distancia a cada uno de los 5 centroides (luminal A, luminal B, basal-like, HER2enriched y normal-like). Se procede en primer lugar a la corrección del entorno usando las sondas de control negativo y normalizando por la media – 2 desviaciones estándar. A continuación, se procede a la normalización de los 50 genes clasificadores en base a la media geométrica de la expresión de los 5 genes “housekeeper”. Para la determinación del subtipo, se aplica la metodología de la clasificación al centroide más próximo, tomando el perfil de expresión génica de cada muestra y calculando el cuadrado a la distancia a cada uno de los centroides

mediante la correlación de Spearman. La clase asignada es aquella cuyo centroide se encuentra más cercano del perfil de expresión génica de la muestra (29,147).

La determinación del subtipo claudin-low se hizo con los datos de expresión del PAM110 (clasificación en claudin-low/no-claudin-low), predominando esta designación sobre el subtipo intrínseco por PAM50 (27,43).

El PAM50 permite asimismo calcular un modelo indicador de riesgo, el "risk of recurrence" o ROR-S basado en las distancias a los centroides, con la siguiente fórmula:

$$\text{ROR-S} = 0.05 * \text{basal} + 0.12 * \text{HER2} - 0.34 * \text{LumA} + 0.23 * \text{LumB}.$$

El "proliferation score" (PS) se calcula mediante la expresión génica de 11 de los 50 genes analizados en el PAM50 (BIRC5, CCNB1, CDC20, CDCA1, CEP55, KNTC2, MKI67, PTTG1, RRM2, TYMS, UBE2C).

3.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RNAseq:

La secuenciación del mRNA total se llevó a cabo en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill (EEUU), en el seno de una colaboración con el grupo del Dr. Charles M. Perou.

3.4.1. Tecnología RNAseq

La secuenciación de mRNA se ha ido posicionando como la técnica de elección para el estudio del transcrito, puesto que permite su análisis completo sin restricciones a priori por

conocimientos previos, sustituyendo a los microarrays. Es un método altamente sensible y preciso para la cuantificación de la expresión génica, permitiendo además la identificación de distintas isoformas y fusiones génicas. Las aproximaciones basadas en la secuenciación determinan el DNA complementario de doble hebra (cDNA) de forma directa, al contrario que los microarrays (148). Para ello, es necesario la elaboración de una librería de cDNA unido a adaptadores específicos.

3.4.1.1. Elaboración de las librerías:

La elaboración de las bibliotecas de RNAseq tienen como misión la eliminación del RNA ribosómico (rRNA), fragmentación del RNA, síntesis de DNA complementario (cDNA) y ligamiento a los adaptadores de secuenciación (figura 4).

La mayoría de las plataformas de secuenciación requieren la fragmentación del RNA, ya que sólo pueden proporcionar lecturas de secuencias cortas (40-400 pares de bases según la

plataforma usada). En el momento actual, la fragmentación suele realizarse sobre el RNA, previo a la conversión a cDNA, con el objetivo de producir una población de RNA de unos 200 pares de base de media.

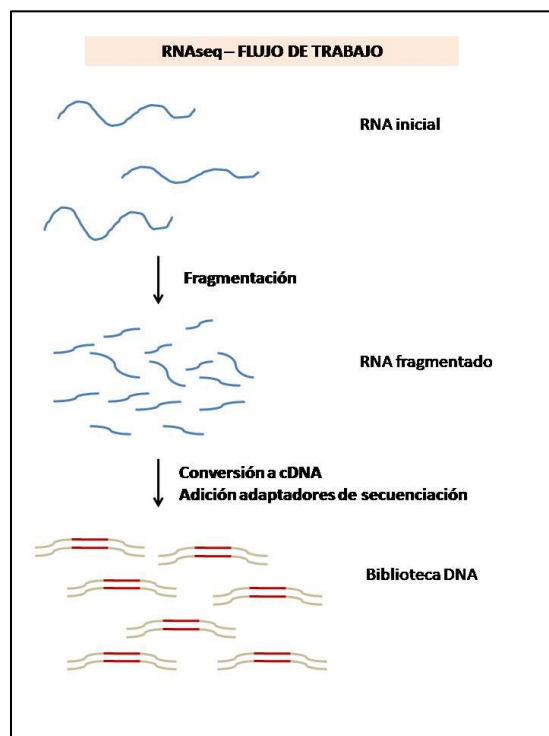


Figura 4. Elaboración de las librerías de cDNA

Para la elaboración del cDNA, el mRNA es usado como molde por la DNA polimerasa con función transcriptasa inversa. La segunda hebra de cDNA es sintetizado por una DNA polimerasa a partir del DNA sintetizado por la transcriptasa inversa. Ambas polimerasas requieren un “primer” unido al RNA para el inicio de la transcripción. A continuación, se requiere la presencia de adaptadores específicos en ambos extremos de los fragmentos del cDNA sintetizado.

La elaboración de las librerías de cDNA es un paso crítico, puesto que el RNA es una molécula de gran labilidad, y las RNAsas enzimas muy estables. Es importante cuantificar y validar la calidad del cDNA previo a la secuenciación.

En nuestro caso, la elaboración de las librerías se realizó en la Universidad de Carolina del Norte, con el Illumina TruSeqRiboGold Kit, siguiendo los pasos indicados por el proveedor.

3.4.1.2. Secuenciación:

Esta librería de cDNA se secuenció a continuación en la plataforma Illumina HiSeq2500 con una configuración de 48x7x48 pares de bases.

3.4.1.3. Alineamiento con genoma de referencia y cuantificación:

Las lecturas generadas por el RNAseq tienen que ser alineadas o mapeadas a un genoma de referencia, con el fin de identificar la posición original de cada lectura con respecto a la

referencia. Esto permite además cuantificar las lecturas alineadas en cada posición, lo que permitirá de forma posterior la comparación de la expresión génica entre diferentes muestras.

Sin embargo, un porcentaje de lecturas no podrán alinearse con el genoma, debido a errores en el ensamblaje, presencia de secuencias repetidas, errores en la secuenciación o polimorfismos.

Con los resultados de alineamiento (coordenadas de cada elemento con su cuantificación) se crean las BAMfiles.

Nuestras muestras se alinearon con la versión GRCh37 del genoma humano, con MapSplice HG v2.2.1 y se hizo la cuantificación con RSEM v1.3.0.

3.4.2. Análisis de RNAseq.

3.4.2.1. Retirada de los genes con bajo número de cuentas.

Tras cuantificación de los niveles de expresión de cada uno de los genes, se procede a la retirada del análisis de los genes con bajo número de lecturas (menos de 10) en > 75 % de las muestras, separando por respuesta o no respuesta. Con la función voom() incluida dentro del paquete “limma”, se permite analizar el número medio de copias del gen por RNAseq, al transformar el número de transcritos hacia una variable en base logarítmica de las cuentas por millón (base log₂) y estimando la relación entre media y varianza. La distribución esperable en una muestra de alta calidad sería obtener un alto número de genes con bajo número de copias, con un descenso progresivo de aquellos con mayor nivel de expresión (149).

3.4.2.2. Análisis de expresión diferencial.

Una vez retirados del análisis los genes con un bajo número de lecturas, realizamos los análisis de expresión diferencial con el paquete de R limma (150).

Este paquete nos va a ofrecer para cada gen analizado su “fold change” en escala logarítmica, la expresión media, y el p-valor asociado, bruto y ajustado por el método de corrección de test múltiple de Benjamini y Hochberg. Se estableció una “false discovery rate” (FDR) de $< 0,05$ para considerar un gen diferencialmente expresado de forma estadísticamente significativa.

Se elaboraron gráficas de tipo “volcano plots”, que representan el p-valor ajustado frente al fold-change, en el eje de las abscisas y ordenadas respectivamente. Son una manera rápida y visual de objetivar la expresión diferencial de los genes.

Se construyeron asimismo “heatmaps” con la función `hclust()` del paquete de R `heatmap3` y `ggplot2`, con el fin de agrupar muestras en función de su patrón de expresión génica.

3.4.2.3. Análisis de vías génicas:

Por último, el análisis de grupos de genes predefinidos de acuerdo a su funcionalidad (“gene set analysis”) se realizó con las funciones `camera()` y `mroast()` dentro del paquete `limma`, utilizando las listas de genes de las bases de datos KEGG y Biocarta, obtenidas de MSigDB (151). Sólo se tuvieron en cuenta los grupos de genes con un FDR $< 0,05$ detectadas por ambos métodos.

El análisis de vías génicas supone una herramienta más robusta que el análisis de genes individuales.

3.4.2.4. Determinación del PAM50 por RNAseq:

Determinamos asimismo el subtipo intrínseco por PAM50 a partir de los datos de expresión de los 50 genes de interés por el RNAseq.

Para ello, utilizamos un código de R desarrollado por la Universidad de Carolina del Norte. Dado que se trataba de una muestra formada por tumores TN exclusivamente, se procedió a la normalización de nuestra matriz dentro de una base de datos con una población de CM más heterogénea. Esta matriz incluía todos los subtipos IHQ, en una proporción similar a la matriz utilizada para la identificación inicial de los subtipos intrínsecos por PAM50.

3.4.2.5. Determinación del TNBCtype (Lehmann):

Para la determinación de los subtipos moleculares definidos por Lehmann et al, cargamos nuestra matriz normalizada de RSEM a la plataforma online: <http://cbc.mc.vanderbilt.edu/tnbc> (49,50).

En un primer paso, la herramienta del TNBCtype aplica un filtro que identifica las muestras con una alta expresión de ESR1 y las retira del análisis, con el fin de evitar sesgos en la clasificación.

La determinación del subtipo molecular se hace en base al cálculo de la distancia a cada uno de los 4 centroides (BL1, BL2, M y LAR), asignándose el subtipo al centroide a una menor distancia. Aquellos con baja correlación o con dos centroides equidistantes se consideran como inestables (UNS). Debido al cambio en la simplificación molecular de 6 a 4 subtipos, la asignación de los tumores inicialmente clasificados como IM o MSL se hizo al siguiente centroide con una mayor correlación (48).

3.5. ANÁLISIS DE DNA GERMINAL:

Por último, se realizó el análisis mutacional de 7 genes implicados en los mecanismos de reparación homóloga (BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D) para evaluar su asociación a la respuesta al tratamiento, mediante “targeted next-generation sequencing”. La secuencia diana es capturada y enriquecida usando el SureSelect system (Agilent Technologies), y se procede a continuación a su amplificación clonal y secuenciación “paired-end” en la plataforma Illumina MySeq (Illumina, San Diego, EEUU). Los análisis genómicos y bioinformáticos se realizaron en los laboratorios de Sistemas Genómicos (Valencia, España).

Las lecturas obtenidas se alinearon frente al genoma de referencia versión GRCh37/hg19. La determinación de las variantes se realizó en base a la aplicación del “pipeline” de análisis de

GATK, en combinación con VarScan y la base de datos Ensembl para su anotación. La validación por técnica Sanger de mutaciones clínicamente relevantes o de significado incierto permitieron analizar las variables filtradas, priorizando las variables previamente descritas como patogénicas en la literatura, las mutaciones con frecuencias alélicas menor al 1% y consecuencias perjudiciales de dichas variantes.

Las variantes de significado desconocido (VSD) se analizaron con el software Alamut para estudios predictivos; SIFT, PolyPhen y Condel se usaron para las variantes missense; y MaxEnt, NNSPLICE, HSF para las variantes de "splicing".

Las deleciones y duplicaciones de los genes BRCA1 y BRCA2 se detectaron mediante "multiplex ligation-dependent probe amplification" (MLPA).

Los datos de cuantificación, análisis y resultados se obtuvieron por el analizador genético ABI 370x1 (Life Technologies, Thermo Fisher Inc.) y software Coffalyser.net.

Los resultados se reportaron como:

- positivo, si una o más mutaciones patogénicas o variantes probablemente patogénicas se detectaron.
- negativo, en el caso de no detectarse variantes clínicamente relevantes (incluyendo pacientes sin mutaciones detectadas, o aquellas con mutaciones no patogénicas o probablemente no patogénicas con una frecuencia <1%)
- inconcluyente (VSD) si únicamente se detectaron variantes de significado incierto.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

3.6.1. Selección de variables:

Variables clínico-patológicas:

- Tamaño tumoral medido por RM, como variable continua y categórica según el estadiaje de la AJCC 7ª edición (143).

- Afectación ganglionar basal, evaluado como variable dicotómica: sí/no.

- Grado histológico de Nottingham, G3 frente al G1-2.

- índice proliferativo Ki67 por IHQ como variable continua y como variable dicotómica ($\leq 50\%$ / $> 50\%$), según el punto de corte establecido en el estudio de Alba et al (124).

- Historia familiar: variable dicotómica (positiva/negativa), definiéndose la historia familiar positiva siguiendo los criterios utilizados en el análisis del GEPARSIXTO (152):

- Al menos tres mujeres con cáncer de mama independientemente de la edad.
- Al menos dos mujeres con cáncer de mama, una de ellas < 51 años.
- Al menos una mujer con cáncer de mama y una mujer con cáncer de ovario.
- Al menos una mujer con cáncer de mama y ovario.
- Al menos dos mujeres con cáncer de ovario.
- Al menos una mujer con cáncer de mama bilateral, el primero a edad < 51 años.
- Al menos una mujer con cáncer de mama a edad < 36 años.

- Al menos un hombre con cáncer de mama y un pariente adicional con cáncer de mama u ovario.

- Edad al diagnóstico, como variable continua, y como variable dicotómica: ≤ 50 o >50 años.

Para la realización de los análisis multivariantes se incluyeron aquellas variables con una asociación estadísticamente significativa con la respuesta en los análisis univariantes, así como aquellas consideradas importantes a nivel clínico.

3.6.2. Escenarios de comparación:

Los análisis de este estudio se llevaron a cabo en varios escenarios, definidos como:

- R1: pCR frente a enfermedad residual (RD) en la muestra global.
- R2: pCR+RCB-I frente a RCB-II y RCB-III en la muestra global.
- R3: pCR frente a RD en tumores basal-like por PAM50.
- R4: pCR+RCB-I frente a RCB-II y RCB-III en tumores basal-like por PAM50.

3.6.3. Análisis estadístico:

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en R studio v3.2.1.

La asociación de variables categóricas a la respuesta a quimioterapia se realizó mediante el test de la Chi cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher según las características de cada comparación.

Los análisis de asociación de las variables continuas a la respuesta se realizaron mediante regresión logística simple y se evaluó la capacidad predictiva con las curvas "receiver operating characteristic" (curvas ROC), que representan una medida global de la exactitud de la prueba para el conjunto de todos los posibles puntos de corte. El área bajo la curva (AUC) ROC representa la medida de exactitud global de la variable, siendo 1 una capacidad diagnóstica perfecta y 0,5 una prueba sin poder diagnóstico. La construcción de curvas ROC se realizó con el pROC de R (<http://expasy.org/tools/pROC/>). La comparación de medias no paramétricas se realizó con el test de Kruskal-Wallis. Las gráficas se construyeron en R studio, Excel, y fueron modificadas en Inkspace.

3.6.4. Construcción de modelos predictivos de respuesta:

Construimos a continuación modelos de predicción de respuesta con las variables de interés, determinando su capacidad predictiva por el AUC de sus curvas ROC. Para ello utilizamos los paquetes de R doParallel, foreach y pROC. A partir de regresiones logísticas múltiples con variables de interés, se dividió la muestra en grupos aleatorios de pacientes estratificando por la variable respuesta, y se procedió a aplicar el modelo predictivo de forma repetida (x1000 veces) en las cohortes realizadas al azar. Por último, se calculó la mediana del AUC de todas las muestras.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA MUESTRA:

4.1.1. Características basales de las pacientes:

Entre 2010 y 2015 se incluyeron 121 pacientes en la cohorte test del estudio NCT 01560663. Las características basales se encuentran detalladas en la tabla 4. La media de edad de las pacientes fue de 51,4 años, un 45,5% eran premenopáusicas y la mayoría eran de raza caucásica. La mediana de tamaño tumoral medido por RM era de 41 mm y un 64,5% de las pacientes tenían afectación ganglionar. Un 54,5% y un 44,6% de las pacientes presentaban estadios II y III al diagnóstico, respectivamente.

Todos los tumores eran TN según la definición de las ASCO/CAP, con

Tabla 4. Características basales de la muestra		
	N = 121	N = 94
Edad		
Media (rango)	51,4 (28-80)	51,6 (28-78)
IC 95%	26,5-76,2	26,2-77,0
Raza		
Caucásica	96,7%	95,7%
Asiáticas	1,7%	2,2%
Hispanas	1,7%	2,2%
ESTADO MENSTRUAL		
Premenopáusica	58 (47,9%)	43 (45,7%)
Postmenopáusica	61 (50,4%)	49 (52,1%)
Tamaño tumoral (mm)		
Media (rango)	53,6 (9-180)	53,3 (12-180)
Mediana	41	42
Multicéntrico	20 (16,5%)	20 (21,3%)
DISTRIBUCIÓN T		
T1	4 (3,3%)	4 (4,3%)
T2	66 (54,5%)	49 (52,1%)
T3	23 (19,0%)	20 (21,3%)
T4	27 (22,3%)	21 (22,3%)
AFECTACIÓN AXILAR		
N0	43 (35,5%)	29 (30,9%)
N+	78 (64,5%)	65 (69,1%)
N1	52 (43,0%)	48 (5,1%)
N2	15 (12,4%)	10 (10,6%)
N3	11 (9,1%)	7 (7,4%)
ESTADÍO TNM		
I	1 (0,8%)	1 (1,1%)
II	66 (54,5%)	49 (52,1%)
III	54 (44,6%)	44 (46,8%)
KI67		
Media (rango)	62,9% (3-100)	63,7% (3-100)
Mediana	70%	70%
<50%	38 (31,4%)	35 (37,2%)
GRADO HISTOLÓGICO		
G1	2 (1,7%)	2 (2,1%)
G2	29 (24,0%)	20 (21,3%)
G3	87 (71,9%)	70 (74,5%)
NA	3 (2,5%)	2 (2,1%)
Historia familiar	25 (20,7%)	20 (21,3%)

expresión de RE y RP <1%, negatividad para la sobreexpresión HER2. La mayoría de los tumores eran de alto grado (71,9% de G3) y la mediana del índice proliferativo por Ki67 se situó en 70%.

En un 33,9% de las pacientes se realizó biopsia selectiva del ganglio centinela pre-quimioterapia (BSGC), siendo positiva para afectación ganglionar en un 17,1% de los casos. En un 8,3% adicional se realizó BSGC post-quimioterapia, resultando positiva en 20% de ellas.

4.1.2. Características del tratamiento recibido:

El 95% de las pacientes (115/121) recibieron TCb como único tratamiento neoadyuvante, de las cuales 84,1% completaron los 6 ciclos planeados, mientras que el 10% restante interrumpió el tratamiento de forma temprana. La interrupción del tratamiento se debió en un 5% de los casos a toxicidad limitante de dosis, en un 3,3% a progresión de la enfermedad y en 1,6% a decisión de la paciente. El 5% restante inició tratamiento con TCb (3 a 5 ciclos) con un cambio posterior de esquema terapéutico a combinaciones con gemcitabina, bevacizumab o antraciclinas por progresión de la enfermedad.

Las pacientes a quienes se les retiró el tratamiento por toxicidad se consideraron no evaluables para los análisis moleculares, mientras que las que recibieron tratamientos neoadyuvantes complementarios por progresión de la enfermedad se incluyeron en el análisis y se consideraron como enfermedad residual extensa (RCB-III).

Un 33,1% de las pacientes presentaron una toxicidad G3-4 durante el tratamiento neoadyuvante, siendo las más frecuentes la neutropenia (15,7% de neutropenia G3-4 con 5,8% de neutropenia febril), trombopenia (5,8%), emesis (4,1%), diarrea (2,5%) y anemia (2,5%)

La cirugía se llevó a cabo en un 95,9% de las pacientes, no realizándose en 3 pacientes por progresión de la enfermedad (consideradas como RCB-III en el análisis) y 2 por pérdidas en el seguimiento (NA). En un 50,4% de las pacientes se realizó cirugía conservadora y en el 45,5% restante mastectomía. Se realizó linfadenectomía en un 72,7% de las pacientes. Un 87,3% de las pacientes recibieron radioterapia adyuvante posterior.

4.1.3. Respuesta a la quimioterapia.

La distribución de respuesta se encuentra detallada en la tabla 5. Se alcanzó la pCR en el 47,1% y un 10,7% adicional lograron una RCB-I. Se produjo la conversión de la afectación axilar en un 66,2% de las pacientes con afectación axilar de inicio.

Tabla 5. Respuesta al tratamiento		
	N = 121	N = 94
pCR	57 (47,1%)	42 (44,7%)
pCR+RCB-I	70 (57,9%)	53 (56,4%)
RCB-III	15 (12,4%)	12 (12,8%)
NA	2 (1,7%)	0

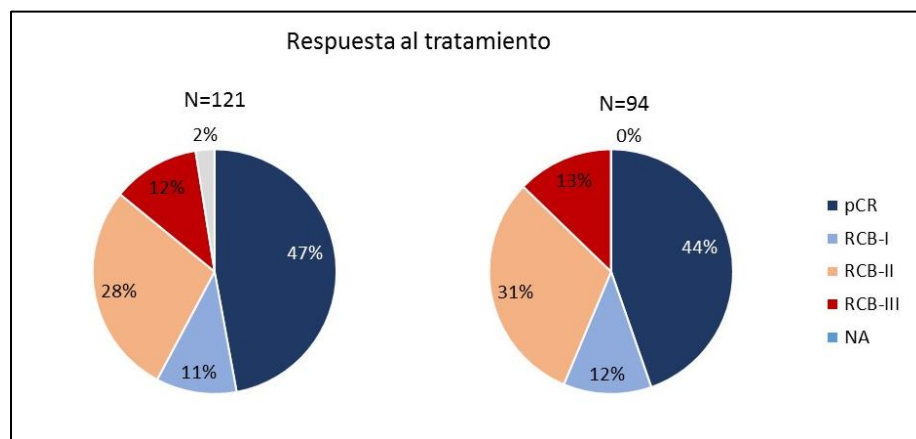


Figura 5. Respuesta al tratamiento

4.1.4. Muestra final para análisis moleculares:

De las 121 pacientes incluidas en la cohorte de tratamiento, se dispuso de tejido suficiente para la realización de subtipo intrínseco por Nanostring y RNAseq en 97 de ellas, teniendo datos de respuesta en 95. Una paciente adicional fue retirada del análisis al recibir un único ciclo de TCb por toxicidad. La muestra global para la que se realizaron los análisis de biomarcadores fue de 94 pacientes (figura 6).

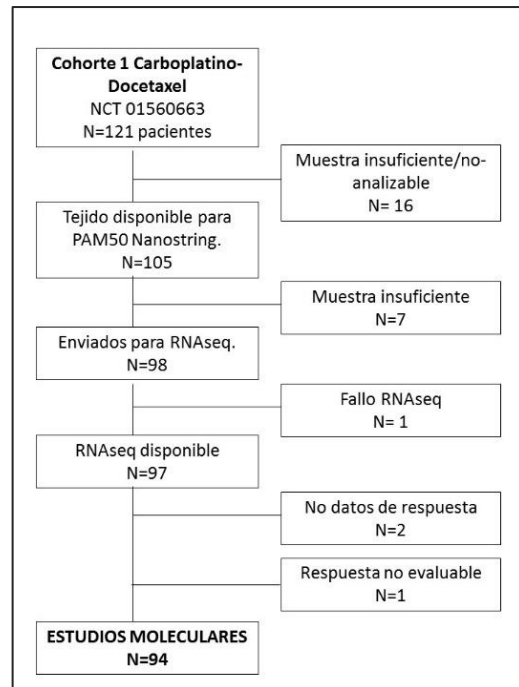


Figura 6. Diagrama de flujo de las pacientes disponibles para estudios moleculares.

Las características basales de la muestra para el análisis de biomarcadores no presentaban diferencias significativas con respecto a la muestra de partida (tabla 4).

De estas 94 pacientes, en 5 de ellas se produjo una progresión de la enfermedad durante el tratamiento neoadyuvante con TCb y se cambió de esquema terapéutico. Estas pacientes se incluyeron en el análisis y fueron consideradas como enfermedad residual extensa (RCB-III).

4.2. PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS:

4.2.1. Análisis univariantes:

En primer lugar, analizamos la asociación a la respuesta de las variables histopatológicas, tanto comparando pCR frente a RD (escenario R1) como buena respuesta patológica (pCR+RCB-I) frente a RCB-II+RCB-III (escenario R2). Resumen en tabla 6 y 7.

El tamaño tumoral y afectación ganglionar no demostraron una asociación estadísticamente significativa con la respuesta. Al analizar las pacientes con buena respuesta patológica (R2) sí se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre un menor tamaño tumoral y una mayor respuesta al tratamiento. El grado histológico, edad al diagnóstico (continua y dicotómica) e historia familiar no mostraron una asociación estadísticamente significativa con la respuesta a la quimioterapia en ninguno de los dos escenarios.

El índice proliferativo medido por Ki67 fue el único factor asociado de forma estadísticamente significativa a la respuesta, tanto como variable continua como variable dicotómica ($\leq 50\%$ / $> 50\%$). Al comparar las pacientes con Ki67 $\leq 50\%$ y $> 50\%$, se objetivó un incremento significativo en la tasa de pCR en aquellas con mayor índice proliferativo, 25,7% y 55,9% respectivamente ($p=0,008$). La capacidad predictiva del Ki67 medida por el AUC de las curvas ROC fue de 0,691 y 0,623 para R1 y R2 respectivamente. La media del Ki67 entre las pacientes respondedoras y no respondedoras fue de 71,7% vs 56,1% respectivamente ($p<0,01$) para R1, y 67,3 vs 57,6% para R2 respectivamente ($p 0,07$).

Tabla 6. Respuesta en función de factores histopatológicos.

	N	R1 (pCR)	P	R2 (pCR + RCB-I)	P
Tamaño tumoral					
T1	4	50,0%	0,15	50,0%	0,12
T2	49	53,1%		67,4%	
T3	20	45,0%		50,0%	
T4	21	23,8%		38,1%	
Afectación ganglionar					
N0	29	51,7%	0,49	65,5%	0,33
N+	65	41,5%		52,3%	
Grado histológico					
G1-2	22	45,5%	1,00	68,2%	0,31
G3	70	44,3%		52,9%	
Índice proliferativo (Ki67)					
Ki67≤50%	35	25,7%	0,008	42,9%	0,07
Ki67>50%	59	55,9%		64,4%	
Edad al diagnóstico					
≤50 años	45	51,1%	0,32	60,0%	0,64
>50 años	49	38,8%		53,1%	
Historia familiar					
Historia familiar +	20	40,0%	0,87	65,0%	0,50
Historia familiar -	53	45,2%		53,4%	

Tabla 7. Resumen de asociación de variables a respuesta

	R1	R2
Tamaño tumoral (variable continua)	NO	SÍ
Tamaño tumoral (variable categórica)	NO	NO
Afectación ganglionar (sí/no)	NO	NO
Grado histológico (G3 vs resto)	NO	NO
Ki67 (variable continua)	SÍ	Límite
Ki67 (variable dicotómica: ≤50/>50)	SÍ	Límite
Edad al diagnóstico (variable continua)	NO	NO
Edad (variable dicotómica: ≤50/>50)	NO	NO
Historia familiar	NO	NO

NO: no asociación estadísticamente significativa con la respuesta, SÍ: asociación estadísticamente significativa con la respuesta ($p < 0,05$). Límite: $p = 0,05 - 0,10$.

Los análisis de asociación entre TP53 y respuesta a quimioterapia no se llevaron a cabo por un alto número de datos no disponibles en esta sección (34/94, 36,2%).

4.2.2. Análisis multivariantes:

Se realizaron posteriormente los análisis multivariantes incluyendo las variables histopatológicas, evidenciando que para el escenario R1, únicamente el ki67, tanto como variable continua ($p=0,003$) como categórica ($p=0,006$), se asociaba de forma significativa a la respuesta a la quimioterapia.

Al considerar pCR y RCB1 (escenario R2), un menor tamaño tumoral y un mayor índice proliferativo como variable dicotómica se relacionaron de forma significativa a la respuesta (tamaño tumoral, $p=0,04$) y (ki67, $p=0,03$). Al considerar el ki67 como variable continua, sólo éste se asoció a la respuesta al tratamiento ($p=0,04$ para ki67 y $p=0,06$ para tamaño tumoral).

4.2.3. Modelos de predicción de respuesta con variables histopatológicas:

Construimos un modelo de predicción de respuesta teniendo en cuenta el tamaño tumoral como variable continua, la afectación ganglionar (sí/no) y el ki67 como variable dicotómica, obteniendo una capacidad predictiva (AUC) mediana de 0,642 para el escenario R1.

Para el escenario R2 obtenemos un modelo con estas variables con una capacidad predictiva AUC 0,649.

4.3. PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON PAM50:

4.3.1. Distribución de subtipos intrínsecos y claudin-low:

En primer lugar, analizamos la distribución de subtipos intrínsecos por PAM50 en nuestra muestra, utilizando la plataforma Nanostring nCounter. La mayoría de nuestras pacientes se clasificaron como basal-like (BL), con la siguiente distribución: 83,0% basal-like, 12,8% HER2E, 1,1% luminal B y 3,20% de normal-like. Figura 2.

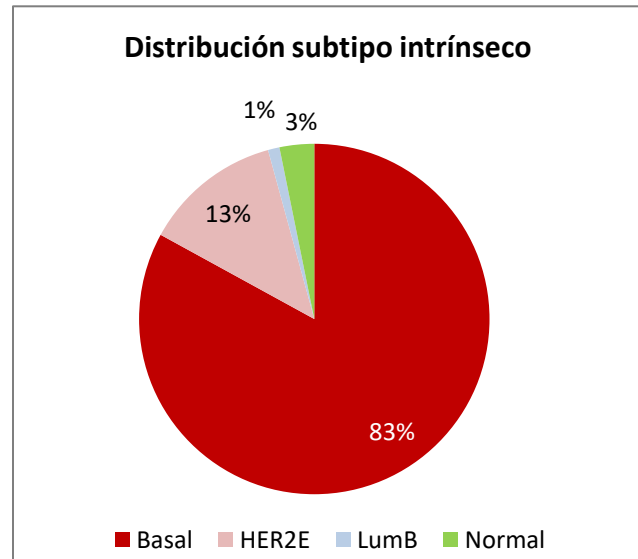


Figura 7. Distribución de subtipo intrínseco por PAM50 (Nanostring nCounter) en la muestra del estudio (n=94)

Sólo una paciente (1,1%) se clasificó como claudin-low tras aplicar el PAM110, por lo que no se realizaron más análisis sobre este subgrupo.

A continuación, comparamos las características basales e histopatológicas de los tumores BL frente a aquellos no-BL (detalladas en tabla 5). Las pacientes con tumores BL presentaban una media de edad significativamente menor que las pacientes no-BL (49,9 vs 60,1 años, $p=0,006$) y en consecuencia un mayor porcentaje de mujeres pre-menopáusicas (50,6% vs 18,8%, $p=0,015$). En cuanto a las características tumorales, no se objetivaron diferencias en el tamaño tumoral, afectación ganglionar ni grado histológico. Sin embargo, los tumores BL sí exhibieron un mayor Ki67 medio (68,4% vs 37,9%, $p < 0,001$).

Tabla 8. Comparación de variables clínico-patológicas entre tumores BL y no-BL

	Basal-like (n=78)	No basal-like (n=16)	P
Edad	49,9	60,1	0,006
Estado menstrual			0,015
Premenopáusicas	50,6%	18,8%	
Postmenopáusicas	46,2%	81,2%	
Tamaño tumoral por cm (mm)	54,0	49,9	0,78
Afectación ganglionar	69,2%	68,8%	1,00
Ki67 (media)	68,4	37,9	<0,001
G3	75,6%	68,8%	0,52

4.3.2. Asociación de subtipos intrínsecos a la respuesta:

Posteriormente, evaluamos el objetivo primario de nuestro estudio, analizando la capacidad predictiva de respuesta a neoadyuvancia del subtipo intrínseco basal-like frente al resto.

Objetivamos diferencias estadísticamente significativas en la respuesta según el subtipo intrínseco, obteniendo la siguiente distribución: pCR 51,3%, RCB-I 10,3%, RCB-II 29,5% y RCB-III 9,0% para las pacientes BL, y 12,5% de pCR, 18,8% RCB-I, 37,5% RCB-II y 31,3% RCB-III para las pacientes no-BL respectivamente (p=0,007). Estos resultados se encuentran detallados en la tabla 9 y representados en la figura 8.

Tabla 9. Distribución de respuesta según subtipo intrínseco

	Basal-like (n=78)	No basal-like (n=16)	P
PCR	51,3%	12,5%	0.007
RCB-I	10,3%	18,8%	
RCB-II	29,5%	37,5%	
RCB-III	9,0%	31,3%	

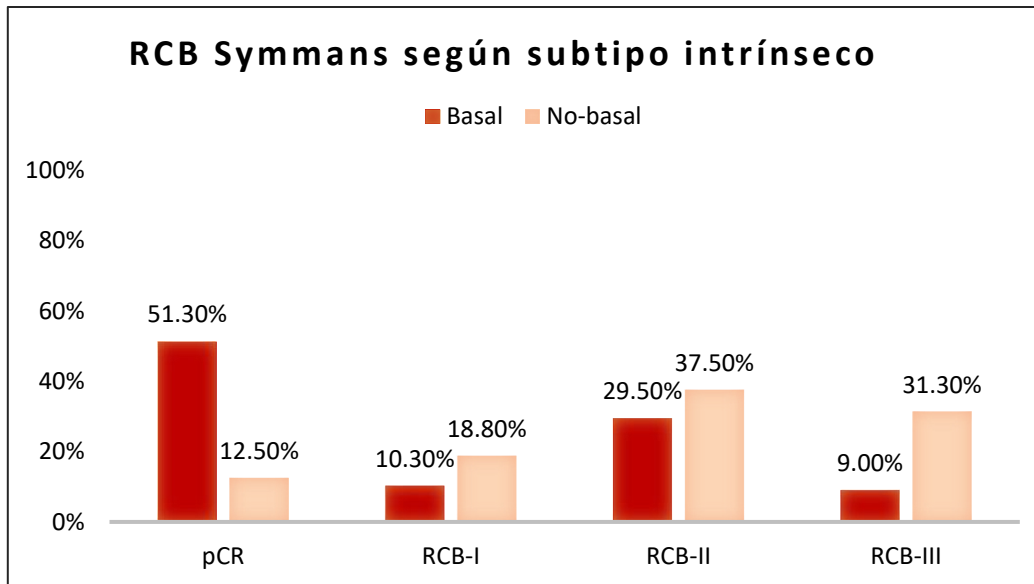


Figura 8. Symmans RCB según subtipo intrínseco

Los tumores basal-like alcanzaron una pCR significativamente mayor que los no basal-like, 51,3%, frente al 12,5%, respectivamente (OR=7,23; IC 95% 1,51-69,9; $p=0,005$). Al considerar de forma conjunta las pacientes con pCR y enfermedad residual mínima (pCR y RCB-I), se alcanzó una buena respuesta patológica en el 61,5% frente al 31,3% de las pacientes basales y no-basales respectivamente, en el límite de la significación estadística ($p=0,050$). Por el contrario, el porcentaje de pacientes con enfermedad residual extensa (RCB-III) fue significativamente mayor en las pacientes no-basales frente a las basales: 31,3% vs 9,0% respectivamente, $p=0,03$.

Esta mejor respuesta de los tumores BL se traduce en un enriquecimiento de tumores BL entre las pacientes respondedoras (95,2%) frente a las no respondedoras (73,1%).

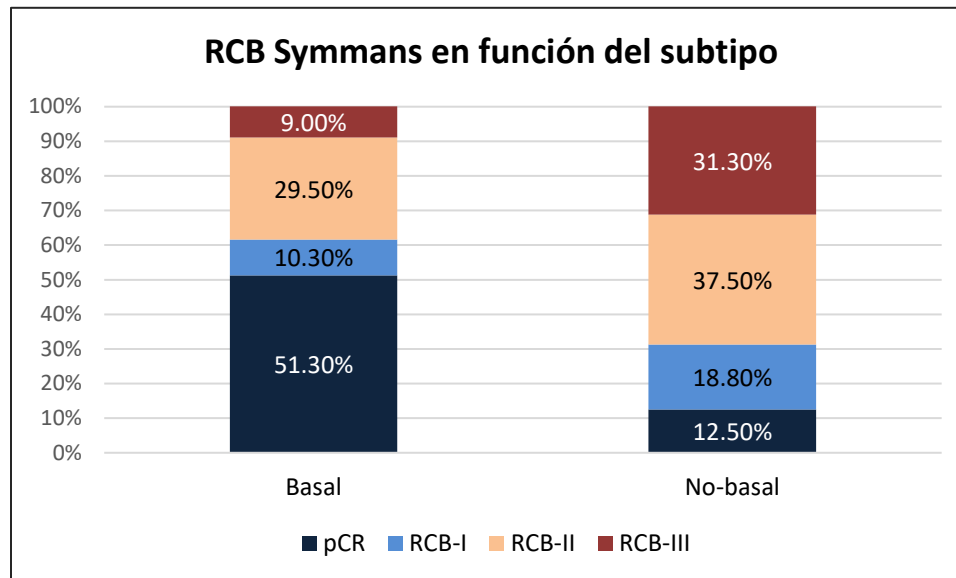


Figura 9. Distribución de RCB en función del subtipo

4.3.3. Asociación de ROR y PS a la respuesta a quimioterapia:

Posteriormente, evaluamos la capacidad predictiva de respuesta del risk of recurrence (ROR) y proliferation score (PS) determinados por el PAM50, tanto en la muestra global como en las pacientes BL por separado, teniendo en cuenta los 2 escenarios de respuesta, pCR frente a enfermedad residual, y pCR y RCB-I frente a RCB-II y RCB-III.

En la muestra global de pacientes, un mayor ROR mostró una tendencia a una mayor respuesta a la quimioterapia, en el límite de la significación estadística ($p=0,053$). El ROR medio de las pacientes que alcanzaron la pCR fue de 68,92, frente a 63,26 en las pacientes con enfermedad residual. Sin embargo, al analizar los tumores basal-like por separado, el ROR no se asoció de forma significativa a la respuesta a quimioterapia en ninguno de los dos escenarios de

respuesta ($p=0,51$). La capacidad predictiva medida por curvas ROC en la población general es limitada, con un AUC de 0,564 (R1).

El "proliferation score" (PS), derivado de la expresión génica de 11 genes, por su parte, presentó una asociación positiva estadísticamente significativa con la respuesta a la quimioterapia ($p=0,034$). Al considerar pCR y RCB-I de forma conjunta (R2), se objetivó esta misma tendencia a mayor PS mayor respuesta, sin alcanzar la significación estadística ($p=0,11$). De la misma manera que con el ROR, en los tumores basal-like por separado, el PS no demostró una asociación estadística significativa en ninguno de los dos escenarios. La capacidad predictiva de pCR medida por curvas ROC fue asimismo limitada, con un AUC de 0,577 (R1).

4.3.4. Asociación a los centroides y respuesta a la quimioterapia:

La correlación al centroide basal presentó una asociación positiva estadísticamente significativa con la respuesta a la quimioterapia ($p=0,005$ y $p=0,008$ para R1 y R2 respectivamente).

Al contrario, se objetivó una correlación negativa estadísticamente significativa entre el centroide luminal A y la respuesta a QT, en los dos escenarios dentro de la muestra global ($p=0,013$ y $p=0,036$ para R1 y R2). La capacidad predictiva global de la firma basal logró un AUC de 0,619 y la luminal A un AUC de 0,594

Al igual que lo objetivado previamente, al analizar los tumores BL por separado, no se objetivó una correlación entre los centroides BL y LumA y la respuesta, tanto para R3 como R4.

La distancia al resto de centroides (Luminal B, Normal-like y HER2) no demostró por el contrario asociación con la respuesta a la quimioterapia, ya fuera en la muestra global como para los tumores basal-like.

	Muestra global (n=94)		Basal-like (n=78)	
	pCR vs RD (R1)	pCR y RCB-I vs RCB-II y RCB-III (R2)	pCR vs RD (R3)	pCR y RCB-I vs RCB-II y RCB-III (R4)
PAM50 BL vs no-BL	SÍ	LÍMITE	-	-
ROR (variable continua)	LÍMITE	NO	NO	NO
PS (variable continua)	SÍ	NO	NO	NO
Centroide basal (variable continua)	SÍ	SÍ	NO	NO
Centroide LumA (variable continua)	SÍ	SÍ	NO	NO

NO: no asociación estadísticamente significativa con la respuesta, SÍ: asociación estadísticamente significativa con la respuesta (p<0,05). Limite: p=0,05-0,10.

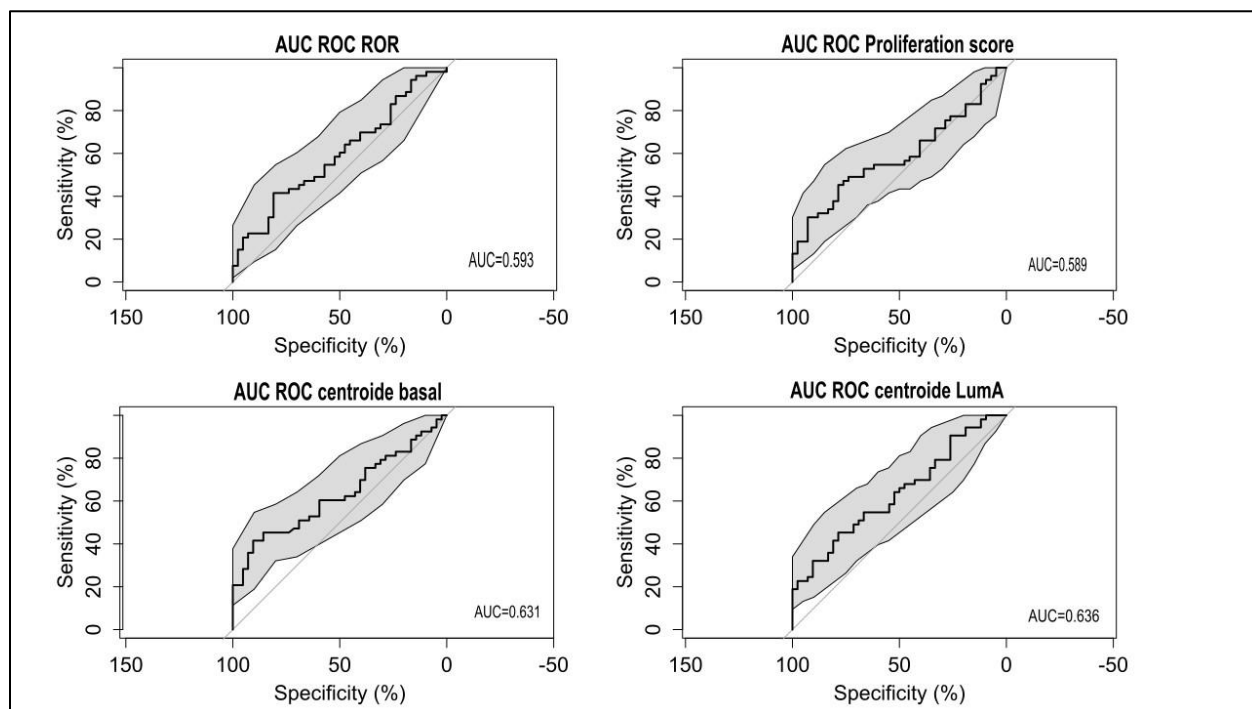


Figura 10. Curvas ROC para la predicción de respuesta con el ROR, PS, centroide basal y luminal A

4.3.5. Análisis multivariantes:

Realizamos posteriormente el análisis multivariante incluyendo los factores histopatológicos previamente descritos (T-variable continua, N-dicotómica, Ki67-variable dicotómica) y el subtipo intrínseco como variable dicotómica (BL vs no-BL).

El subtipo intrínseco por PAM50 fue el único factor que se asoció de manera independiente a la respuesta a la quimioterapia ($p=0,04$), mientras que el Ki67 se quedó en el límite de la significación estadística ($p=0,053$). Al considerar la pCR y RCB-I en conjunto, el tamaño tumoral fue el único factor independiente asociado a la respuesta, quedando el subtipo intrínseco en el límite de la significación ($p=0,076$).

Al considerar los centroides con los factores histopatológicos, sólo el centroide basal se mantuvo estadísticamente asociado a la respuesta a la quimioterapia ($p=0,024$), quedándose el luminal A en el límite de la significación ($p=0,069$). Por el contrario, el PS y ROR no resultaron significativos en los análisis multivariantes.

Para el escenario R2, la proximidad al centroide basal se asoció de forma significativa a una mejor respuesta al tratamiento ($p=0,02$). Al contrario, la cercanía al centroide luminal A se asoció a una tendencia a una peor respuesta al tratamiento, en el límite de la significación ($p=0,068$).

4.3.6. Construcción de modelos predictivos de respuesta:

Al igual que se realizó con los factores histopatológicos, construimos a continuación modelos de predicción de respuesta incluyendo distintas variables. Como vemos en la tabla 11, el modelo

que incluyó el subtipo intrínseco, tamaño tumoral como variable continua y Ki67 como variable dicotómica, fue el que se asoció a una mejor capacidad predictiva de respuesta, con un AUC de 0,692. La incorporación del subtipo intrínseco a los modelos incrementa la capacidad predictiva de forma notable, ya que con factores histopatológicos logramos una capacidad predictiva global del 0,642.

VARIABLES INCLUIDAS	AUC R1	AUC R2
KI67.50 + NDIC + T	0,642	0,653
SI + N DIC + T	0,654	0,683
SI + TCONT + N + KI7.50	0,664	0,663
SI + TCONT + KI67.50	0,692	0,690
CENTROIDE BASAL + T + KI67.50	0,678	0,693
CENTROIDE BASAL + N DIC + T + KI67.50	0,654	0,675
CENTROIDE LUMA + T + KI67.50	0,679	0,679
CENTROIDE LUMA + N DIC + T + KI67	0,656	0,658

* T: variable continua, N dicotómica (sí/no) y ki67 como variable dicotómica (cutoff de 50%), SI: subtipo intrínseco (BL vs no-BL). R1: pCR frente a enfermedad residual. R2: pCR+RCB-I frente a RCB-II y RCB-III.

4.3.7. Predicción de quimio-resistencia:

Por último, debido al mal pronóstico que caracteriza a las pacientes con enfermedad residual extensa (RCB-III), decidimos analizar a continuación el valor predictivo de los factores histopatológicos y del subtipo intrínseco en la predicción de la refractariedad al tratamiento.

En resumen, objetivamos lo siguiente:

- Asociación entre mayor tamaño tumoral y obtención de RCB-III en el límite de la significación (p=0,056)
- Asociación estadísticamente significativa entre afectación ganglionar positiva y RCB-III, con un 0,0% de RCB-III entre las pacientes N0, frente a un 18,5% en las N+ (p=0,016).

- El Ki67, tanto como variable continua como variable dicotómica, no presentó asociación con la RCB-III. Entre las pacientes con un Ki67 ≤ 50 , un 17,1% presentaron RCB-III, frente al 10,2% de aquellas con ki67 >50 ($p=0,35$).
- El subtipo intrínseco por PAM50 (BL vs no-BL) se asoció de forma significativa a RCB-III, con un 10,1% de RCB-III entre las pacientes basales, frente a un 31,3% en las no-basales ($p=0,03$).
- La asociación al centroide basal se asoció de forma inversa a la enfermedad residual extensa ($p=0,013$). No se objetivó por el contrario asociación entre el ROR, PS y centroide luminal A y RCB-III.
- En los análisis multivariantes con factores histopatológicos, ningún factor mostró una asociación significativa con la enfermedad residual extensa. Al introducir el subtipo intrínseco por PAM50, el no ser basal se asoció de forma significativa a la obtención de una RCB-III ($p=0,025$).

Por tanto, el subtipo intrínseco basal y la distancia al centroide basal fueron los únicos factores asociados de forma significativa a presentar una RCB-III tras el tratamiento neoadyuvante con TCb.

No es posible construir los modelos de predicción de respuesta de quimiorresistencia debido al bajo número de pacientes ($n=12$).

4.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR RNAseq:

Los análisis de RNAseq se realizaron para 4 escenarios distintos:

- R1: pCR vs no-pCR en la muestra global
- R2: pCR+RCB-I vs RCB-II y RCB-III.
- R3: pCR vs no-pCR en tumores basal-like
- R4: pCR+RCB-I vs RCB-II y RCB-III en tumores basal-like.

4.4.1. Tratamiento inicial de los genes:

Genes analizados.

A priori se consideraron un total de 20531 genes para el análisis. En un primer momento se retiraron del análisis los genes con un bajo número de copias con la función trim(), retirando del análisis aquellos genes con menos de 10 cuentas en más del 75% de los pacientes.

De los 20531 genes inicialmente considerados, quedaron para el análisis:

- R1: 16975 genes analizables.
- R2: 17018 genes analizables.
- R3: 17100 genes analizables.
- R4: 17115 genes analizables.

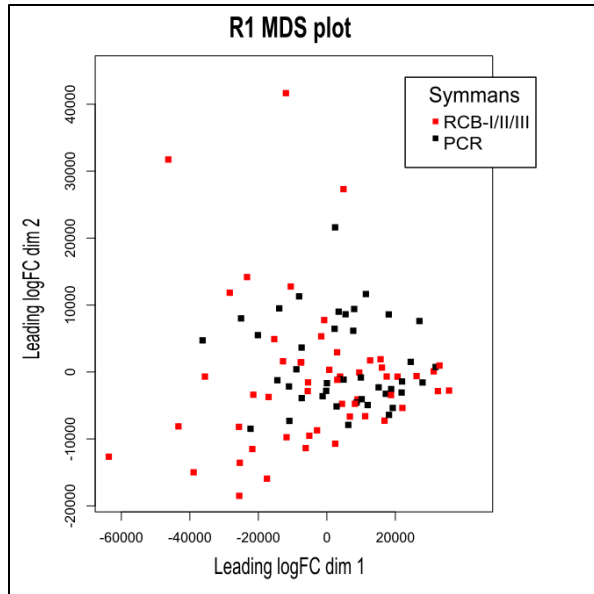


Figura 11. Gráficas MDS de dispersión para R1

Tras la retirada del análisis de los genes con un bajo número de lecturas, evaluamos la dispersión de nuestras muestras en función de sus perfiles de expresión.

Objetivamos que no hay una segregación de las pacientes con respuesta (negro) y aquellas sin respuesta (rojo).

Voom mean-variance trend.

El análisis de “voom mean-variance trend” realizado para evaluar de forma global el número de lecturas por gen, demuestra la distribución esperada, con una mayoría de genes con un menor número de cuentas y un descenso gradual hacia aquellos con mayor número de cuentas, teniendo en cuenta que previamente se habían

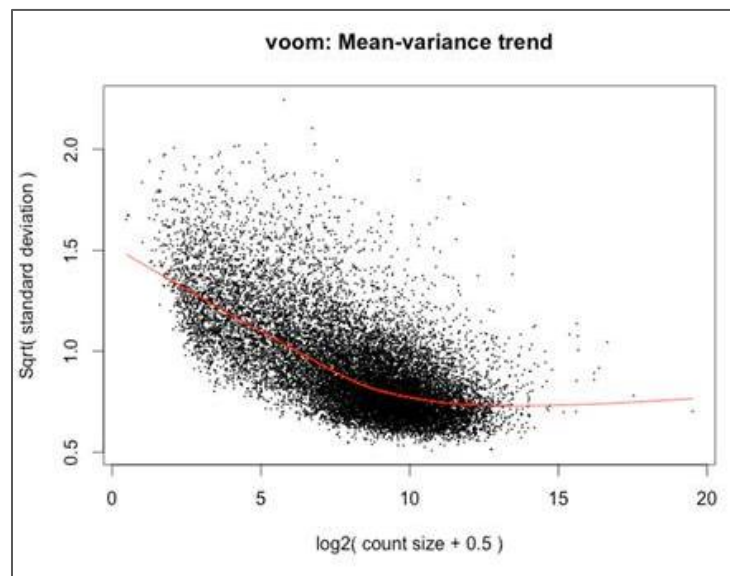


Figura 12. Gráficas voom de "mean-variance trend"

eliminado aquellos genes con número de lecturas bajo. Debido a la superposición de nuestros hallazgos con la línea esperada, no fueron necesarias normalizaciones sucesivas.

4.4.2. Determinación del subtipo intrínseco por RNAseq.

Con los datos de expresión génica obtenidos del RNAseq, determinamos a continuación los subtipos intrínsecos por PAM50.

La distribución de subtipos intrínsecos por RNAseq fue la siguiente: 76,6% BL, 18,1% HER2, 4,3% LumA, 1,1% LumB y ningún normal-like (figura 13).

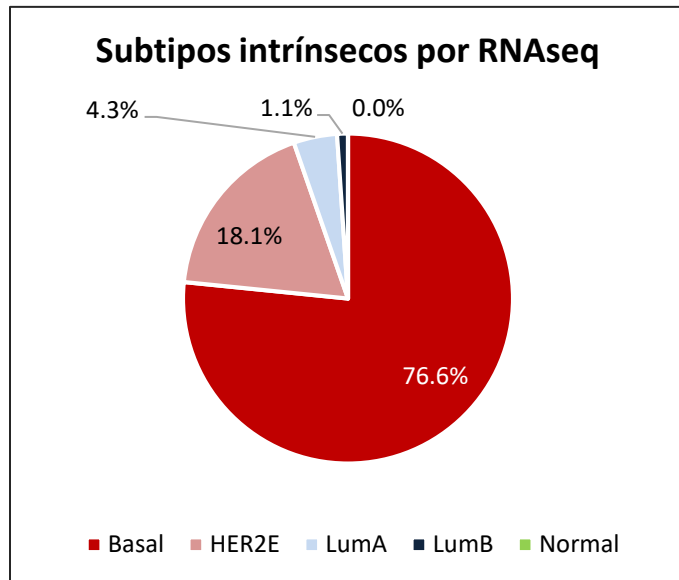


Figura 13. Distribución de subtipos intrínsecos por RNAseq

4.4.2.1. Concordancia PAM50 Nanostring/RNAseq.

Evaluamos posteriormente la concordancia entre el subtipo intrínseco realizado por la plataforma nCounter y con los datos de RNAseq.

En la tabla 12 mostramos los la distribución y porcentaje comparativo de los subtipos intrínsecos por ambas técnicas (figura 14).

Tabla 12. Tabla comparativa de distribución de subtipos intrínsecos por nanostring y rnaseq.

	Nanostring		RNAseq	
	N	%	N	%
BASAL-LIKE	78	83,0%	72	76,6%
HER2E	12	12,8%	17	18,1%
LUMA	0	0,0%	4	4,3%
LUMB	1	1,1%	1	1,1%
NORMAL-LIKE	3	3,20%	0	0,0%

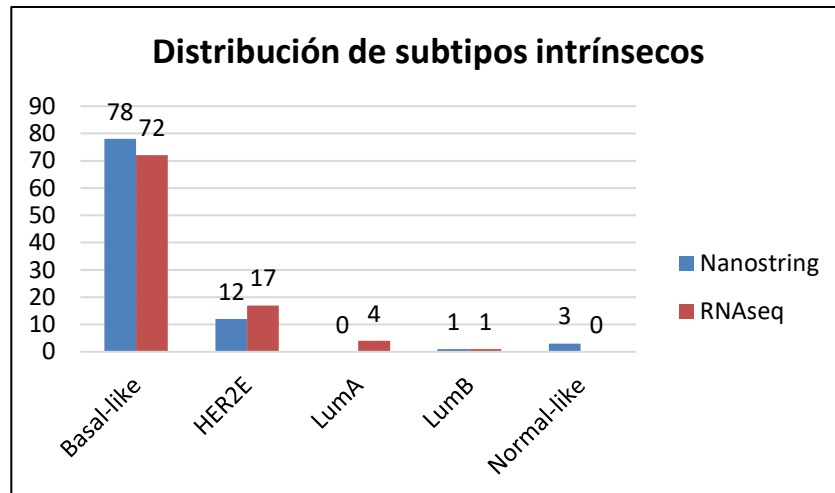


Figure 14. Subtipos intrínsecos por Nanostring y RNAseq.

De las 94 muestras con subtipado intrínseco con ambas técnicas, se identificaron 10 casos de discordancia entre el subtipo intrínseco asignado por Nanostring y por RNAseq. El porcentaje de tumores BL fue menor en el análisis por RNAseq, y al contrario aumentó la proporción de HER2E y de Lum A. La totalidad de los normal-like por Nanostring fueron asignados a LumA por RNAseq (3/10). Un HER2E por Nanostring también se consideró LumA por RNAseq. El resto de los casos discordantes correspondieron a tumores BL por Nanostring que pasaron a ser considerados HER2E (6/10). Al analizar estos casos discordantes:

- 1 paciente fue fallo en la determinación de PAM50 por RNAseq (máxima proximidad a un centroide 0,08), por lo que no puede considerarse como discordante.
- En 4 pacientes, la asignación del subtipo se realizó teniendo los dos centroides más cercanos con una distancia $<0,10$, por lo que no deberían considerarse discordancias.
- En los 5 casos restantes, se objetivaron diferencias en la cercanía a los centroides, considerándose por tanto como discordancias reales.

En consecuencia, aunque inicialmente objetivamos una concordancia en el 89,4% de los casos, al analizar estos casos discordantes consideramos que en realidad la concordancia se situaría realmente en torno al 94,6% (88/93).

4.4.2.2. Correlación por genes:

Analizamos a continuación la correlación mediante correlación de Spearman para cada uno de los genes que conforman el PAM50. 20 (40%) genes presentaban una correlación por ambas plataformas > 90%, 14 entre el 85 y 90%, 7 entre 80-85% (42% entre 80 y 90%), 7 entre 70-80% y sólo 2 genes tuvieron una correlación <70%. (Anexo 3).

4.4.2.3. Correlación por centroides:

Se analiza la correlación a cada uno de los centroides entre PAM50 y RNAseq, obteniendo unos altos coeficientes de correlación en todos los casos, con valores en torno a 0,90 para cada una de las variables analizadas. En la tabla 13 se encuentra detallada la correlación entre las dos plataformas para cada uno de los centroides. En la

	Spearman (rho)
BASAL-LIKE CENTROID	0,937
HER2E-CENTROID	0,961
LUMA CENTROID	0,895
LUMB CENTROID	0,937
NORMAL-LIKE CENTROID	0,953
ROR	0,887
PROLIFERATION SCORE	0,970

figura 15 presentamos una representación gráfica de los análisis de correlación.

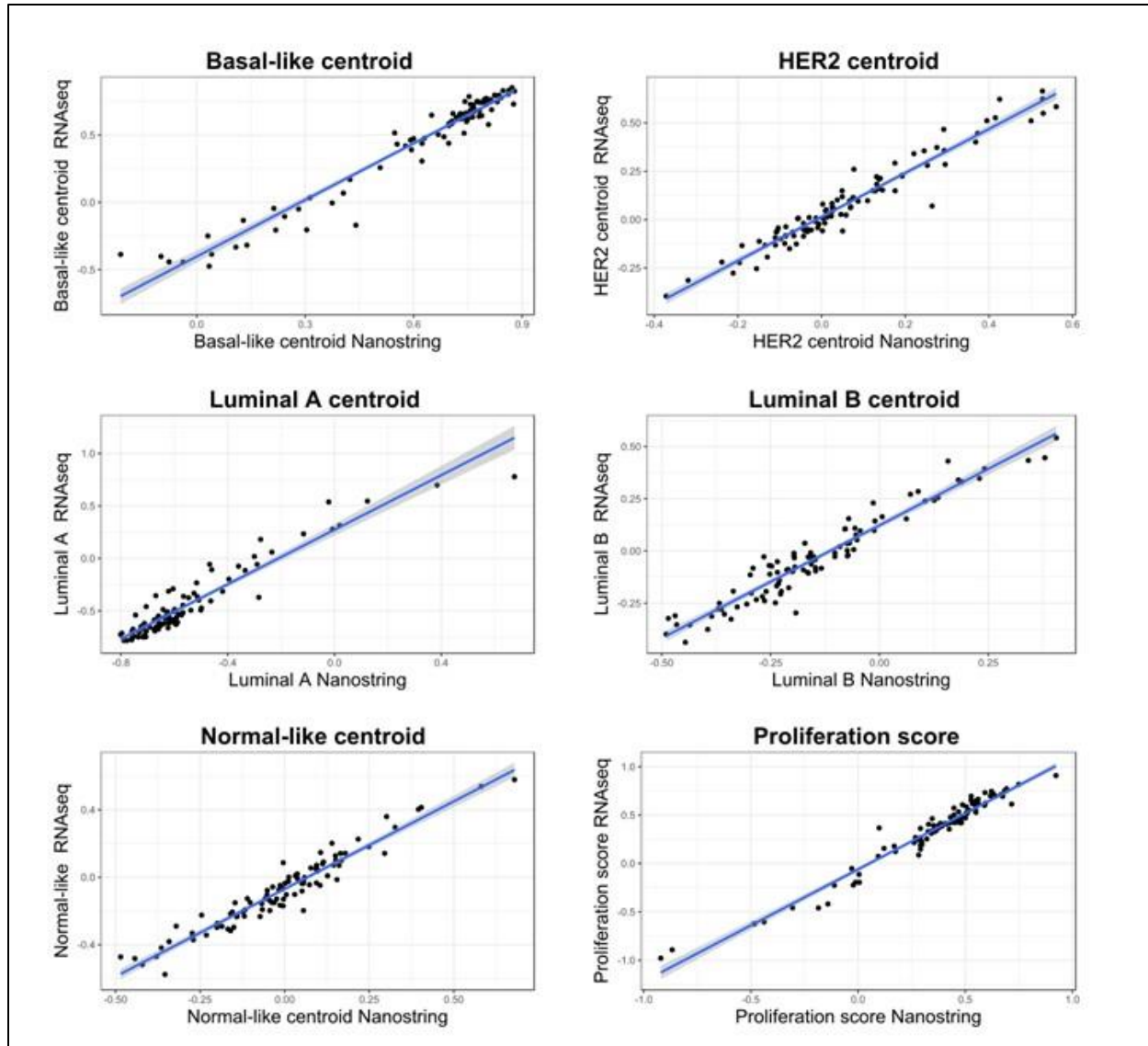


Figura 15. Correlación a los centroides entre Nanostring y RNAseq.

4.4.3. Análisis de expresión diferencial:

Se procedió posteriormente al análisis de expresión diferencial mediante limma, corrigiendo los p valor por test múltiple con el método de Benjamini y Hochberg ($FDR < 0,05$).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- R1: 399 genes diferencialmente expresados.
- R2: 538 genes diferencialmente expresados.
- R3: 0 genes diferencialmente expresados.
- R4: 186 genes diferencialmente expresados.

Estos mismos hallazgos pueden observarse en los “volcano plots” obtenidos, en los que se objetivan en rojo aquellos genes con una expresión diferencial entre las pacientes respondedoras y no respondedoras, tanto infra como sobreexpresión. Como vemos, en todos los escenarios salvo en R3, se objetivan genes diferencialmente expresados.

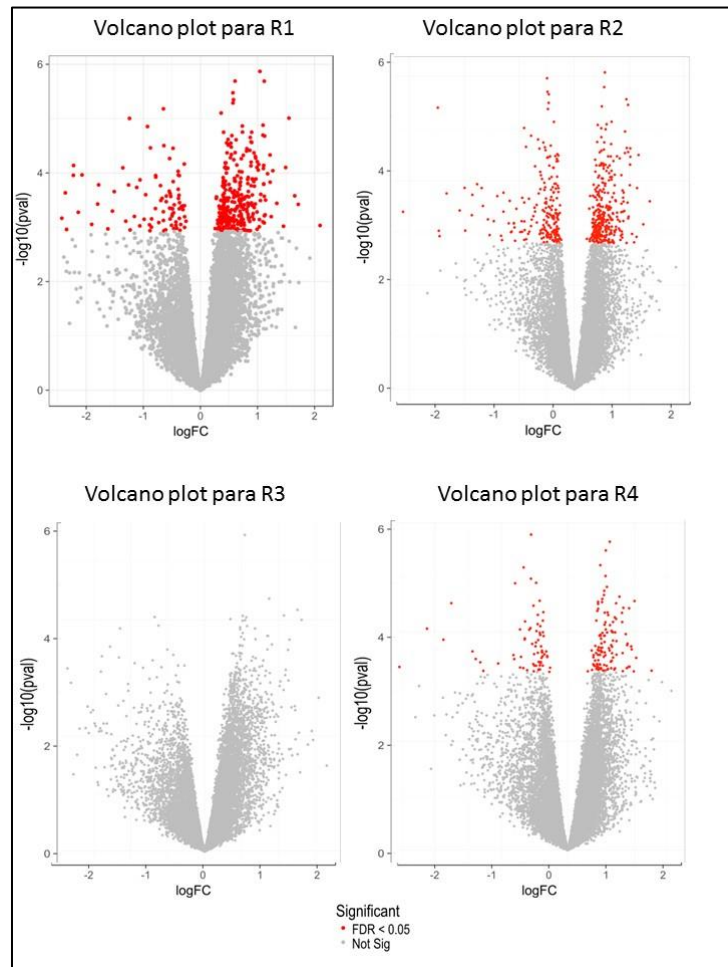


Figura 16. "Volcano plots" para los 4 escenarios de respuesta.

4.4.3.1. Expresión diferencial de genes entre pCR vs no-pCR (R1):

En primer lugar, analizamos la expresión génica diferencial entre las pacientes que alcanzaron la pCR frente a aquellas con enfermedad residual, para el total de nuestras 94

pacientes. Se objetiva la expresión diferencial de 399 genes entre pacientes respondedoras y no respondedoras (FDR <0,05), estando 83 de ellos infraexpresados y 316 sobreexpresados en las pacientes respondedoras.

A continuación, presentamos los 10 genes más diferencialmente expresados:

Tabla 14. 10 genes más diferencialmente expresados entre pCR y RD						
	LogFC	expresion media	t	P.valor	p valor ajustado	B
HIST1H2AH 85235	1.042315	4.108809	5.149015	1.35E-06	0.011595	5.09174
RPUSD3 285367	0.606542	4.525051	5.049994	2.04E-06	0.011595	4.725017
HIST1H2AG 8969	1.118422	4.578289	5.049496	2.05E-06	0.011595	4.723796
RANGRF 29098	0.569524	2.677621	4.930219	3.35E-06	0.014223	4.158448
BRPF1 7862	0.579544	5.37769	4.858394	4.49E-06	0.014604	4.001937
GRK6 2870	0.569782	4.919821	4.824241	5.16E-06	0.014604	3.875578
LMLN 89782	-0.64686	4.790345	-4.76312	6.61E-06	0.01602	3.648596
GGA2 23062	0.362711	7.004206	4.718292	7.91E-06	0.01678	3.460105
KCNQ4 9132	1.550006	0.839119	4.664804	9.79E-06	0.016867	2.914587

Entre estos 10 genes con mayor significación estadística se identifican genes implicados en la replicación del DNA, como genes de histonas (HIST1H2AH y HIST1H2AG), RPUSD3 (RNA Pseudouridylate Synthase Domain Containing 3), RANGRF (RAN Guanine Nucleotide Release Factor) y BRPF1 (Bromodomain And PHD Finger Containing 1).

Análisis de vías génicas:

Se realizó posteriormente el análisis de expresión diferencial de vías génicas, con los criterios previamente mencionados en el apartado de material y métodos (expresión diferencial tanto por KEGG como Biocarta). En la tabla 2 del Anexo pueden encontrarse las vías diferencialmente expresadas. Objetivamos que todas las vías halladas se encuentran

sobreexpresadas en las pacientes respondedoras y que estas vías representan los siguientes procesos de forma general:

- Vías génicas implicadas en procesos inmunes, con una implicación de la mayoría de los mecanismos inmunes: genes de proteínas de la vía del complemento, HLA, inmunoglobulinas, Linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B, granulocitos y citoquinas e interleuquinas
- Vías implicadas en el ciclo celular (ciclinas y factores de transcripción, genes implicados en la formación del huso mitótico), replicación, traducción y splicing alternativo.
- Sobreexpresión de genes de histonas, con más de 30 genes sobreexpresados en las pacientes respondedoras, con componentes de HIST1H1, HIST1H2, HIST1H3, HIST1H4, HIST2H2, HIST2H3 e HIST2H4.

- Vías implicadas en la recombinación homóloga.

Heatmap:

Se realizó asimismo un “heatmap” para intentar agrupar las muestras en función de su perfil de expresión génica (figura 17). Aquellos genes sobreexpresados se representan en rojo, mientras que aquellos infraexpresados en verde y los neutros en

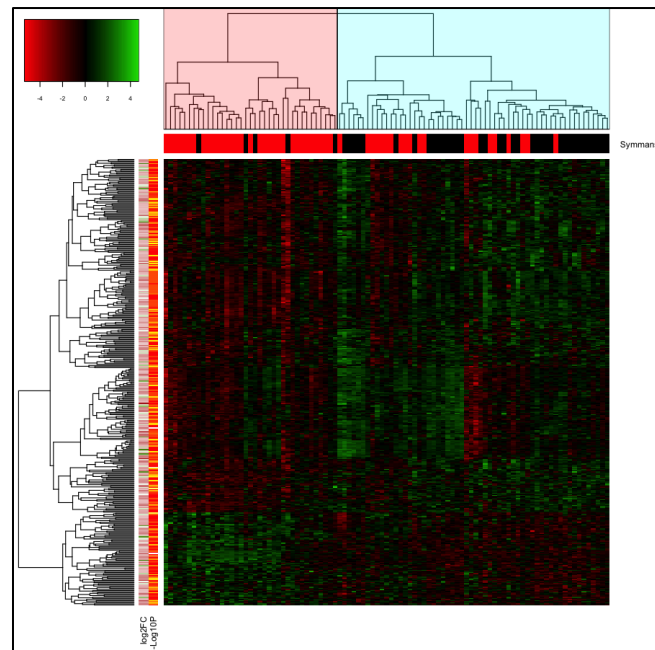


Figura 17. Heatmap de expresión génica diferencial entre pCR y RD

negro. Aunque se objetivan grupos de genes, estos no segregaban de forma adecuada a las pacientes respondedoras y no respondedoras (negro: pCR/ rojo: no-pCR).

Análisis de genes específicos:

Analizamos a continuación la expresión de determinados genes relevantes, en función de la respuesta R1 (pCR vs RD). Con respecto a genes implicados en los procesos de reparación homóloga expresados a nivel somático en el tumor, no objetivamos diferencias significativas en su expresión entre pacientes respondedoras y no-respondedoras (figura 18). En el caso de BRCA1 se objetiva una tendencia a una menor expresión en las pacientes que logran la pCR, sin alcanzar la significación estadística ($p=0,076$).

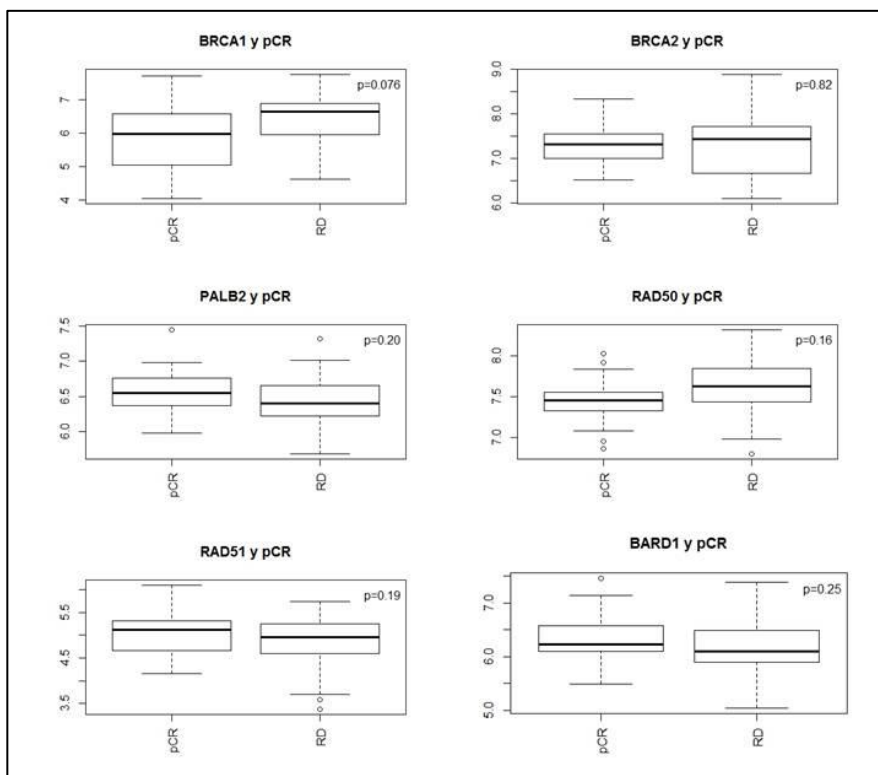


Figura 18. Expresión diferencial de genes de recombinación homóloga.

Evaluamos a continuación AR y FOXA1, como genes implicados en la señalización de la vía de los andrógenos, encontrando una infraexpresión de FOXA1 en pacientes que alcanzaron la respuesta patológica completa ($p=0,03$). Figura 19. Para el gen del receptor de andrógenos (AR), aunque se objetivó una tendencia a la infraexpresión de este gen en las pacientes con respuesta, no se alcanzó la significación estadística ($p=0,12$).

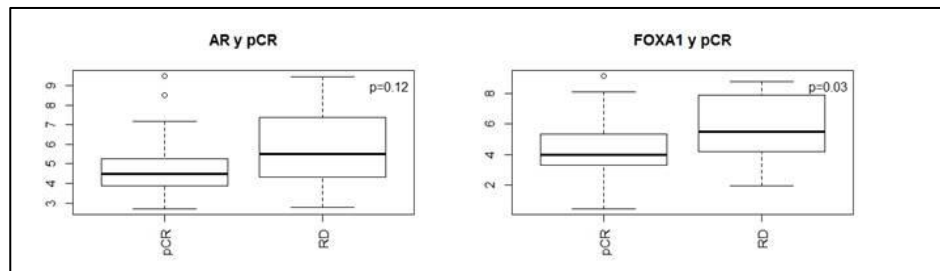


Figura 19. Expresión génica diferencial de genes de vías de los andrógenos.

A nivel de genes inmunes, se objetiva una sobreexpresión estadísticamente significativa de PD1 en pacientes con respuesta completa frente a aquellas sin respuesta. Aunque PDL1, CTLA4 y FOXP3 tenían una tendencia a una sobreexpresión en las pacientes con respuesta, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. Figura 20.

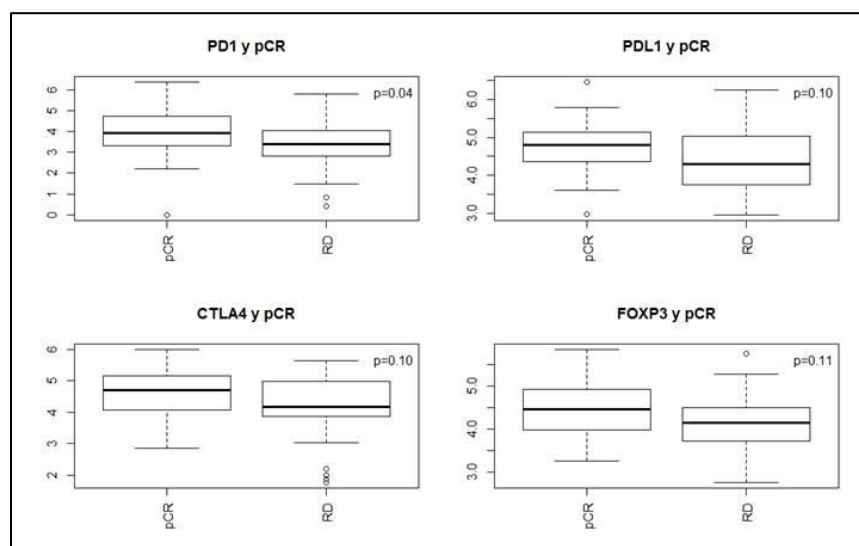


Figura 20. Expresión diferencial de genes de respuesta inmune.

4.4.3.2. Expresión diferencial de genes entre pCR y RCB-I frente a RCB-II y RCB-III (R2):

Se realizaron asimismo los análisis agrupando a las pacientes con RCB-0 y RCB-I, frente a aquella con enfermedad residual RCB-II o RCB-III. En este escenario se identificaron 538 genes diferencialmente expresados entre ambas poblaciones, 212 infraexpresados en pacientes con respuesta casi-completa y 326 sobreexpresados.

Entre los genes sobreexpresados, destacaban genes implicados en:

- Nucleosoma, con la sobreexpresión de 30 genes de histonas.
- Factores del complemento: C1QA, C1QC, C2.
- HLA: HLA-DRB1, HLA-E, HLA-H.
- Enzimas implicadas en el ciclo celular: AURKB, PLK1.

Al comparar los genes identificados entre el escenario R1 y R2, ambos escenarios compartían la expresión diferencial de 192 genes. Aunque no hay un solapamiento completo de los genes diferencialmente expresados entre las pacientes con pCR y pCR-RCBI, al analizar las vías génicas implicadas sí se objetivan los mismos procesos celulares que los identificados para R1, fundamentalmente la sobreexpresión de genes del nucleosoma (histonas, polimerasas) y genes de respuesta inmune.

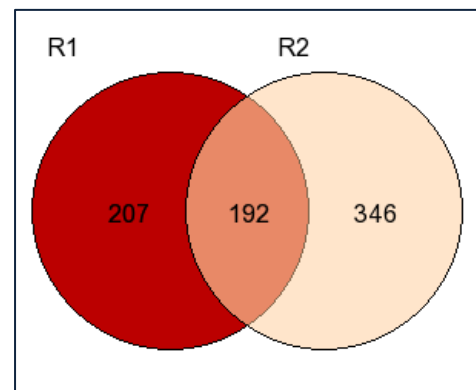


Figura 21. Diagrama Venn de genes diferencialmente expresados en R1 y R2.

4.4.3.3. Expresión diferencial de genes entre pCR vs no-pCR en pacientes basal-like (R3):

Al analizar la expresión génica diferencial entre pacientes basal-like por PAM50 que alcanzan la pCR frente a aquellas con enfermedad residual no se identifica ningún gen con una expresión diferencial estadísticamente significativa.

El análisis de firmas génicas, por el contrario, sí identifica alguna vía sobrerrepresentada en las pacientes respondedoras. Estas vías, de nuevo, están en relación con la activación inmune, y muchas de ellas son compartidas con las identificadas para R1.

4.4.3.4. Expresión diferencial de genes entre pCR y RCB-I frente a RCB-II y RCB-III en pacientes basal-like (R4):

Por último, al considerar las pacientes basal-like con respuesta casi completa (pCR + RCB-I), se objetivan 186 diferencialmente expresados, 70 con una infraexpresión y 116 sobreexpresados entre las pacientes con buena respuesta.

Se objetivan de nuevo las mismas vías implicadas en los otros escenarios:

- Genes del nucleosoma.
- Vías inmunes: C1QA, HLA-DRB1.
- No se objetivan diferencias en este caso en la expresión de FOXA1 ni AR.

Comparación de los genes diferencialmente expresados en los distintos escenarios:

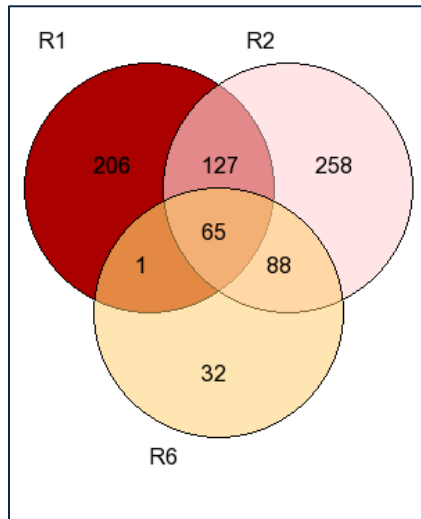


Figura 22. Diagrama Venn de genes diferencialmente expresados en R1, R2 y R4

De estos 186 genes, 153 son compartidos con los genes diferencialmente expresados en el total de la muestra en este mismo escenario.

Entre los 65 genes cuya expresión diferencial se mantiene en los 3 escenarios, se identifican genes de las vías descritas previamente, como genes implicados en la transcripción y replicación (histonas, factores de transcripción), genes implicados en inmunidad (factores del complemento y HLA, interleuquinas) y genes relacionados con el ciclo celular (CDK5).

4.5. PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON TNBCtype.

4.5.1. Distribución de subtipos.

Aplicamos el TNBCtype a nuestra muestra de datos (n=94 pacientes). 7 pacientes no pasaron el filtro de ESR1 y se clasificaron como ER-positivos, siendo retiradas del análisis.

Los subtipos basal-like fueron los más frecuentes (34,0% y 20,2% para BL1 y BL2 respectivamente), seguidos del mesenquimal y LAR. Tabla 15 y figura 23. Entre los tumores BL por PAM50, predominaron los subtipos BL1 y BL2, objetivándose que la práctica totalidad de los tumores clasificados como BL1/2 por Lehmann pertenecen al basal-like por PAM50. Por el contrario, los tumores no basal-like por PAM50, estaban compuestos fundamentalmente por LAR

(68,8%) y 1 BL2, además de 4 muestras identificadas como ER-positivas. Todos los tumores mesenquimales eran BL por PAM50, y, al contrario, la mayoría de los tumores LAR eran no-BL por PAM50, correspondiendo el 71,4% de los LAR eran HER2E por PAM50.

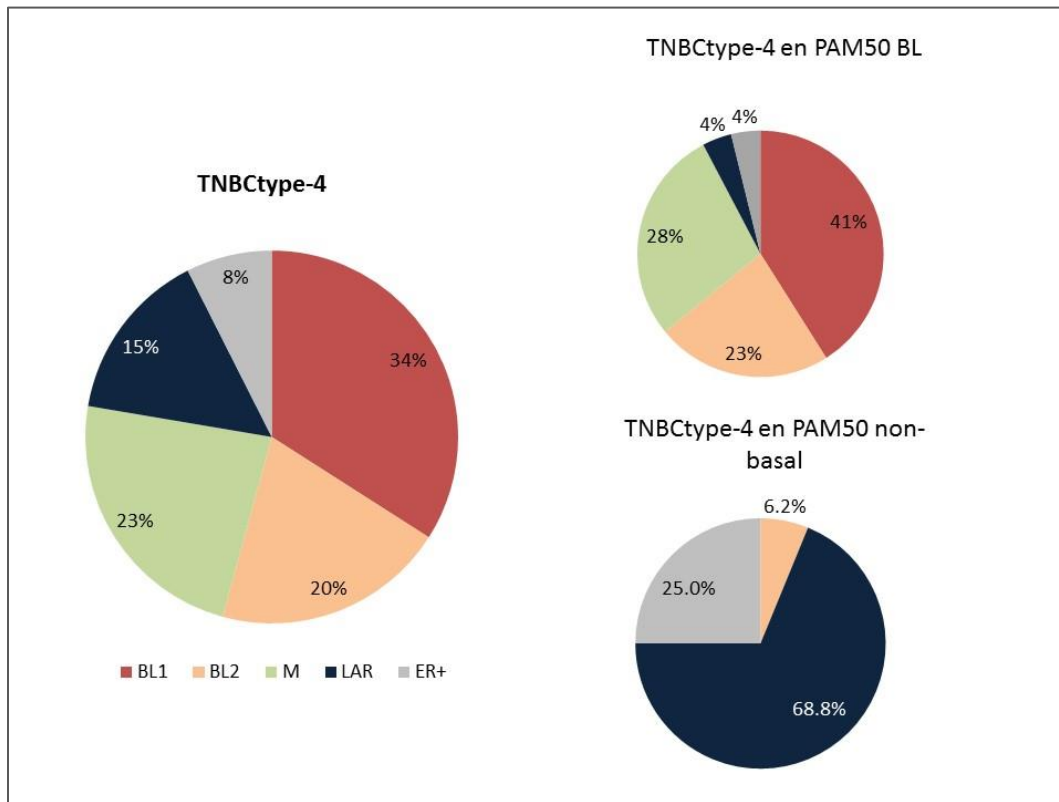


Figura 23. Distribución de TNBCtype. A. En la muestra global. B. En pacientes con tumores BL por PAM50. C. En pacientes con tumores no-BL por PAM50.

		Subtipo intrínseco PAM50					
		All		Basal		No-basal	
		N	%	N	%	N	%
Lehmann TNBC type	BL1	32	34,0%	32	41,0%	0	0,0%
	BL2	19	20,2%	18	23,1%	1	6,2%
	M	22	23,4%	22	28,2%	0	0,0%
	LAR	14	14,9%	3	3,8%	11	68,8%
	ER+	7	7,4%	3	3,8%	4	25,0%

Se objetiva que las pacientes con tumores BL1 tenían una edad menor que el resto de subtipos, y, al contrario, las pacientes con tumores LAR presentaban la mayor edad, con unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Las pacientes LAR tenían una tendencia a tener tumores más localmente avanzados, tanto a nivel de tamaño tumoral como afectación ganglionar, sin alcanzar la significación estadística. No se objetivaron diferencias significativas en la distribución del grado histológico entre los distintos subtipos. Los tumores BL1 presentaron un ki67 significativamente más alto que el resto de subtipos, y los tumores LAR y ER+ presentaron los ki67 más bajos. Las características basales se hallan detalladas en la tabla 16.

	BL1	BL2	M	LAR	ER+	p
N	32	19	22	14	7	
EDAD (MEDIANA)	41	51	50,5	67,5	55	<0,01
TAMAÑO TUMORAL POR RM (MEDIANA)	48	40	40	58,5	40	0,53
AFECCIÓN GANGLIONAR (% N+)	78,1%	52,6%	63,6%	85,7%	57,1%	0,18
KI67 (MEDIANA)	80%	60%	70%	40%	40%	<0,01
G3 (%)	84,4%	63,2%	72,7%	64,3%	85,7%	0,25

4.5.2. TNBCtype y respuesta a quimioterapia:

Evaluamos posteriormente la asociación entre los subtipos de Lehmann y la respuesta a la QT neoadyuvante con TCb. Los subtipos de Lehmann se asociaron de forma significativa a la respuesta a la quimioterapia ($p = 0,027$). Las pacientes con tumores BL1 alcanzaron las mayores tasas de pCR (65,6%), seguido de BL2 (47,4%), M (36,4%) y LAR (21,4%). Las respuestas se hallan detalladas en la tabla 17 y figura 24. Entre las pacientes clasificadas como ER-positivas, la tasa de pCR fue de 14,3% (1/7).

Al analizar las pacientes que obtuvieron una buena respuesta patológica (pCR y RCB-I), obtuvimos los siguientes resultados: 75,0% para las BL1, 57,9% para las BL2, 50,0% para las M y 35,7% para las LAR, en el límite de a significación estadística ($p=0,06$). Por el contrario, ninguna paciente dentro de las BL1 presentó enfermedad residual extensa (RCB-III), mientras que representó el 15,8% de las BL2, 13,6% de las M y 28,6% de las LAR.

Al comparar con BL1, los tumores LAR y M presentaba tasas de pCR significativamente menores, con un odds ratio (OR) de alcanzar una pCR de 0,14 y 0,30 respectivamente ($p<0,01$ y $p=0,037$). Esta asociación estadísticamente significativa se mantenía en los análisis multivariantes, incluyendo tamaño tumoral y afectación ganglionar, tanto para M y LAR ($p=0,015$ y $p=0,008$), con el subtipo BL2 con una tendencia a una peor respuesta también ($p=0,075$).

Al considerar la buena respuesta patológica, LAR y M se asociaron de nuevo a una menor respuesta a la quimioterapia (OR= 0,19 y 0,33, respectivamente). En el análisis multivariante, los 3 subtipos (M, LAR y BL2) se asociaron a una peor respuesta al tratamiento comparado con BL1 ($p<0,05$).

De acuerdo con lo expuesto previamente, al considerar el índice como una variable continua se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta entre los 4 subtipos ($p=0,004$).

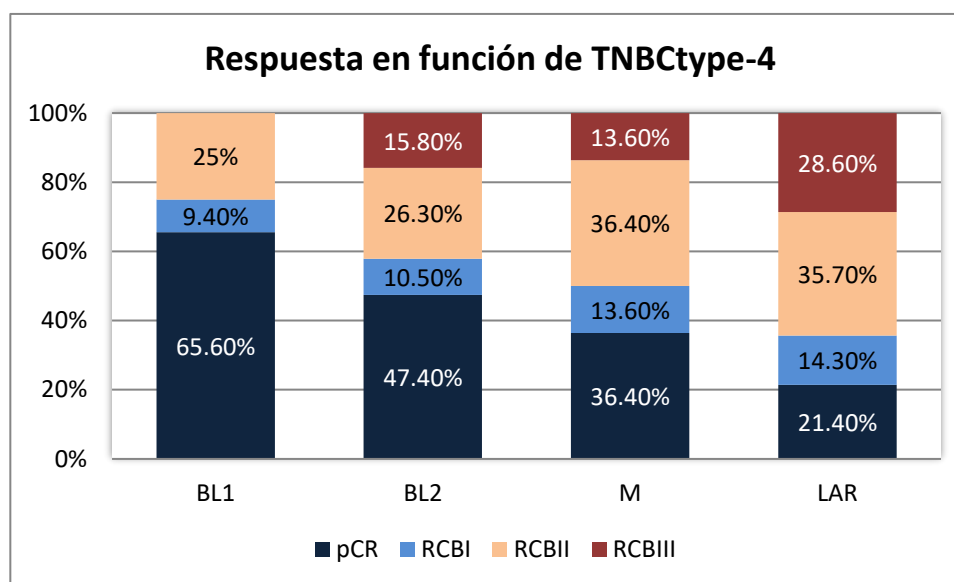


Figura 24. Distribución de la respuesta a quimioterapia (RCB Symmans) según los subtipos de Lehmann

	pCR+RCBI	RCB-III	RCBsym Media +/- EEM
BL1	75,0%	0,0%	0,551 +/- 0,159
BL2	57,9%	15,8%	0,723 +/- 0,166
M	50,0%	17,4%	1,338 +/- 0,279
LAR	35,7%	28,6%	1,835 +/- 0,490

4.6. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN GENES DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y RESPUESTA A QTNA.

En último lugar se evaluó la asociación de mutaciones en 7 genes de recombinación homóloga (BRCA1, BRCA2, PALB2, BARD1, RAD50, RAD51C, RAD51C) en línea germinal y la respuesta patológica a quimioterapia.

De las 94 pacientes incluidas en el análisis se pudo realizar el análisis mutacional en 85 de ellas (90,4%). En estas 85 pacientes analizables, se objetivaron 10 mutaciones (11,8% de las

pacientes), con 8 mutaciones en BRCA1, 1 mutación en BRCA2 y 1 mutación en BARD1. No se identificaron mutaciones en PALB2, RAD50, RAD51C ni RAD51D.

Entre las pacientes portadoras de mutación, un 40% tenían historia familiar positiva según los criterios previamente descritos, frente al 20% de aquellas sin mutación ($p=0,31$).

No se observan diferencias en la respuesta a quimioterapia entre las pacientes con mutación y sin ella, tanto para R1 (50,0% vs 46,7%, $p=1,0$) como para R2 (50,0% vs 60,0%, $p=0,73$). Tabla 18 y figura 25.

Tabla 18. Respuesta según estado mutacional

	N	pCR	RCB-I	RBC-II	RCB-III
Mutación	10	50,0%	0,0%	40,0%	10,0%
No mutación	75	46,7%	13,3%	28,0%	12,0%
NA	9	22,2%	11,1%	44,4%	22,2%

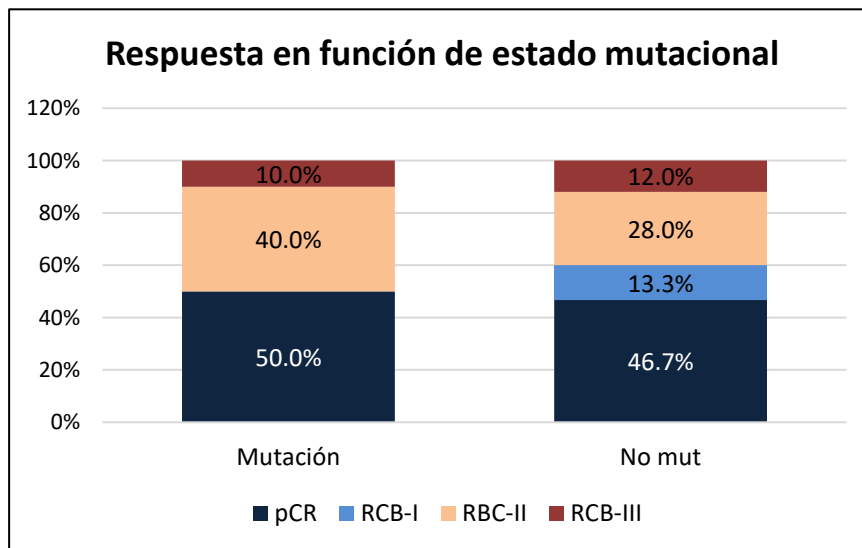


Figura 25. Respuesta en función de estado mutacional

Características moleculares de las pacientes portadoras de mutación:

Todas las pacientes portadoras de mutación se clasificaron como basal-like por PAM50, mientras que al clasificarlas con el TNBCtype-4 objetivamos que el 30,0% eran BL1, 40,0% BL2 y 30,0% M. Las tasas de pCR entre estas pacientes fueron de 66,6% para las BL1, 50,0% para las BL2 y 33,3% para las M ($p=1,00$), globalmente idénticos a las obtenidas en la cohorte TN global (figura 26).

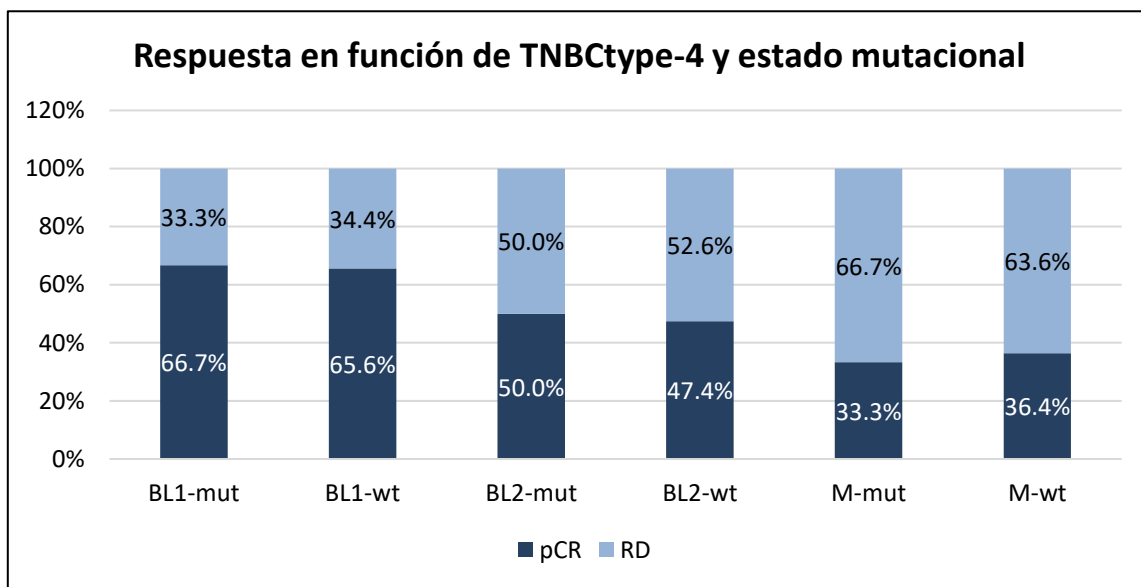


Figura 26. Respuesta en función de TNBCtype-4 y estado mutacional

5. DISCUSIÓN

La identificación de predictores de respuesta a QTNA en CMTN es uno de los principales retos a los que nos enfrentamos en el momento actual, dado el mal pronóstico que asocian las pacientes con una mala respuesta al tratamiento neoadyuvante. Este trabajo tiene como objetivo la identificación de factores predictores de respuesta a neoadyuvancia con carboplatino y docetaxel en CMTN, sirviéndonos de análisis de expresión génica y análisis mutacional de un panel de genes de reparación homóloga.

Sin embargo, es necesario conocer primero la capacidad predictiva de los factores clínico-patológicos clásicos disponibles en la práctica clínica habitual. Sólo de esta manera podremos evaluar el beneficio real aportado por los predictores moleculares que vamos a analizar.

5.1. PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS:

Numerosos estudios han intentado identificar predictores de respuesta en CMTN hasta la fecha, y, aunque distintas variables clínicas o patológicas se asocian a la respuesta en diversos estudios, los datos obtenidos no han podido ser reproducidos de forma consistente (153).

En nuestra serie, observamos que el marcador de proliferación Ki67 es el único factor asociado de forma significativa a la respuesta a quimioterapia. No encontramos por el contrario una asociación significativa entre el tamaño tumoral, afectación ganglionar o grado histológico. Al combinar los factores clínicos y patológicos más relevantes, alcanzamos una capacidad predictiva modesta con un AUC de 0,642.

El valor predictivo de respuesta y pronóstico del ki67 se ha estudiado de manera exhaustiva, tanto en cáncer de mama en general como en CMTN, con hallazgos controvertidos. En particular, en CMTN, aunque se objetiva una tendencia a la asociación entre un mayor ki67 y mayor respuesta a QT, esta asociación no siempre alcanza la significación estadística (154). El punto de corte del 50% parece ser óptimo en CMTN para la predicción de respuesta (124,155).

En nuestra serie, al estratificar por dicho punto de corte, obtuvimos pCR significativamente mayores en las pacientes con Ki67 >50%, 55,9% frente a 25,7% ($p=0,008$). Estos datos coinciden con los publicados recientemente por Alba et al, en los que se objetivó tasas de pCR de 15,0% frente 41,7% ($p= 0,0337$) para las pacientes con Ki67 $\leq 50\%$ y $> 50\%$ respectivamente tras QTNA basada en antraciclinas y taxanos, con un AUC en torno a 0,618. Sin embargo, en este estudio, la determinación del ki67 se hacía de forma centralizada, lo cual, al eliminar la variabilidad interobservador, dificulta su reproducibilidad en la práctica clínica habitual (124). El valor predictivo de respuesta del ki67 se ha visto asimismo en estudios de CMTN tratadas con sales de platino (156). En un estudio reciente que evaluó los factores histopatológicos asociados a la respuesta al tratamiento con carboplatino y paclitaxel en CMTN, se evidenció que las pacientes con Ki67 $> 50\%$ obtenían un 70,8% de pCR, frente al 19,8% de aquellas con un Ki67 $\leq 20\%$ ($p<0,01$). En este estudio, además, el tamaño tumoral y estadio clínico se asociaron también a la respuesta (157). Por el contrario, Kim et al, en un análisis retrospectivo de 198 pacientes con CMTN tratadas con antraciclinas y taxanos no encontró asociación predictiva independiente del Ki67 y la respuesta al tratamiento (158). Además del valor predictivo de respuesta, el ki67 ha demostrado un valor pronóstico, objetivándose una asociación entre

mayor índice proliferativo y menor supervivencia, y con un mayor impacto del Ki67 post-neoadyuvancia en pacientes con enfermedad residual tras neoadyuvancia (157).

Por tanto, aunque encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el Ki67 y la respuesta al tratamiento, éste tiene un valor predictivo modesto y la falta de estandarización en su determinación limita su aplicabilidad, debido a la alta variabilidad interobservador (159).

Además del índice proliferativo, se han evaluado otros factores histopatológicos, aunque sin una replicación consistente en los distintos estudios. Tras neoadyuvancia con la secuencia de antraciclinas y taxanos (AC-T), la infiltración por TILs, el grado de necrosis tumoral, la presencia de células de citoplasma claro, y el alto grado histológico se identificaron como factores independientes asociados a la respuesta. Con estos 4 factores se elaboró un modelo predictivo de respuesta que alcanzó un AUC de 0,777 (98). Por otro lado, se ha estudiado la relación entre el fenotipo basal-like definido por IHQ (RE, RP, HER2 negativos y positividad para CK5/6 y/o EGFR) y respuesta a neoadyuvancia en CMTN, con resultados controvertidos. Li et al y Masuda et al objetivaron una asociación negativa estadísticamente significativa entre este fenotipo IHQ y la respuesta al tratamiento con combinaciones de epirrubicina y taxanos (125,155). Por el contrario, en otro estudio no se objetivó relación entre fenotipo basal y la pCR (160). La expresión de p53 y receptor de andrógeno (AR) a nivel proteico se ha estudiado, asimismo, sin objetivarse un consenso sobre su asociación con la respuesta (121,158,161,162).

Sin duda, el factor que mayor interés está generando en el momento actual es la infiltración por TILs, ya que ha demostrado de forma consistente un valor predictivo de respuesta y valor pronóstico en CMTN (136,137). El análisis de las TILs está además estandarizado, lo que permite

su reproducibilidad y comparación entre estudios (163). Aunque de momento no presentamos datos de TILs y respuesta en nuestra serie, se trata de un análisis en marcha y que sin duda aportará información adicional de gran interés.

Para concluir sobre la predicción de respuesta con factores histopatológicos, consideramos que, aunque el ki67 se asocia a la respuesta al tratamiento, su considerable variabilidad interobservador limita su papel en la toma de decisiones terapéuticas, y parece por tanto que con las herramientas histopatológicas actuales no logramos una adecuada predicción de respuesta a la QTNA. Por consiguiente, es necesario profundizar en la biología del tumor en la búsqueda de predictores de respuesta a neoadyuvancia. Por esta razón, evaluamos la capacidad predictiva de los subtipos intrínsecos por PAM50 (basal frente a no basal) entre otros marcadores moleculares.

5.2. PREDICCIÓN DE RESPUESTA CON EL SUBTIPO INTRÍNSECO DEFINIDO POR PAM50.

El objetivo principal de este estudio es analizar la posible asociación entre el subtipo intrínseco y la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con TCb. Existe evidencia de que los subtipos intrínsecos por PAM50 se asocian a un mayor valor predictivo y pronóstico frente a los factores IHQ clásicos, tanto en cáncer de mama RH-positivos como CMTN (101,164).

5.2.1. DISTRIBUCIÓN DE PAM50.

En primer lugar, analizamos la distribución de los subtipos intrínsecos por PAM50 en nuestra cohorte de pacientes. De nuevo, se pone de manifiesto que la definición TN por IHQ y el subtipo molecular basal-like no son sinónimos, puesto que, aunque los tumores BL representan una mayoría de nuestra muestra (83,0%), encontramos representación de todos los subtipos intrínsecos (12,8% de HER2E, 3,2% de normal-like y 1,1% de luminal B).

Esta distribución está en la línea de lo descrito previamente en las distintas series de tumores TN, con porcentajes de tumores BL que se sitúan entre el 50 y el 88%, según si se incorporan o no los tumores claudin-low a la clasificación. En la tabla 19 se describe la distribución de subtipos intrínsecos en CMTN. Entre los tumores basales definidos por IHQ (triple negatividad y CK5/6+ y/o EGFR +), se objetivó un enriquecimiento en tumores basal-like por PAM50 comparado con la definición de TN (81,2% vs 56,9%, $p < 0,01$) (156). Entre los tumores no-BL predominaron los tumores HER2E, con una menor proporción de luminal B y normal-like, acorde a lo previamente publicado (44).

	N	Basal-like	HER2E	LumB	LumA	Normal	Comentarios
TCGA	90	78,9%	5,6%		5,6%	2,2%	
CALGB40603. Hoadley et al. SABCS 2016	389	88,2%	NA	NA	NA	NA	Mayoría de no-BL HER2E y normal-like
Prat BMC 2015	350	72%	9%	2%	6%	11%	
Prat 2014							
GEICAM/2006-03	69	81,2%	5,8%	NA	NA	2,8%	10,1% CL
MDACC	188	58%	7,4%	3,2%	1,4%	4,8%	25% CL
GEICAM9906	100	55%	29%	10%	4%	2%	
Prat 2013	412	78,6%	7,8%	4,4%	2,2%	7%	
Bayraktar 2014	35	85,7%	15,7%	8,6%			
Lehmann 2016	767	77%	12%	3%	4%	4%	
NCT01560663	94	83,0%	12,8%	1,1%	0,0%	3,2%	

CL: claudin-low.

En nuestra muestra sólo se identificó 1 tumor claudin-low, un porcentaje muy inferior al esperado en una cohorte de TN. Se estima que un 12-14% de los tumores de mama son claudin-low, siendo la mayoría de estos TN. Entre los TN, este porcentaje ascendería hasta el 30%, fundamentalmente entre tumores clasificados como basal-like o normal-like por PAM50 (43). Sin embargo, en varias series de TN se han observado porcentajes bajos de estos tumores, como en el estudio GEICAM/2006-003 con sólo un 10%, y TCGA, en el que sólo se identificaron 8 tumores claudin-low entre los 525 tumores analizados (39).

En cuanto a las características histopatológicas de los tumores según el subtipo intrínseco, objetivamos que los tumores BL se presentaron en pacientes más jóvenes que los no-BL, sin una diferencia en el tamaño tumoral o afectación ganglionar, acorde a lo publicado previamente (48).

5.2.2. PAM50 COMO PREDICTOR DE RESPUESTA A QTNA.

La capacidad predictiva de respuesta de los subtipos intrínsecos ha sido estudiada de manera repetida, aunque generalmente en poblaciones heterogéneas de CM y con terapias basadas en antraciclinas y taxanos (161). En población de CM no seleccionada, se objetivó que los tumores BL se asociaban a la mayor tasa de pCR con combinaciones de antraciclinas y taxanos, alcanzando la pCR en el 43% de las pacientes, seguido por el 37% en las HER2E y el 7-19% en los subtipos luminales (165).

En nuestro caso, objetivamos diferencias estadísticamente significativas en la respuesta a quimioterapia entre los tumores BL (pCR del 51,3% y pCR+RCB-I del 61,6%) frente a los tumores

no-BL (12,5% y 31,3%) respectivamente. Además, objetivamos un enriquecimiento en tumores con enfermedad residual extensa (RCB-III) entre las pacientes no-BL (31,3% vs 9,0%, $p=0,03$). Considerando el impacto pronóstico de la obtención de una pCR o RCB-I frente a RCB-III en supervivencia libre de enfermedad a distancia, se pone en evidencia la importancia de los hallazgos de nuestro estudio.

La mayor parte de la evidencia disponible sobre el valor predictivo de los subtipos intrínsecos en CMTN proviene de análisis retrospectivos, y, en general, con tratamientos basados en combinaciones de antraciclinas y taxanos. En la tabla 20 se encuentran detallados los datos disponibles de pCR en función del subtipo intrínseco en CMTN.

Al analizar un conjunto de pacientes tratados con combinaciones de antraciclinas y taxanos o ixabepilona neoadyuvantes, se objetivó que el subtipo intrínseco era predictivo de respuesta a neoadyuvancia en la muestra global, y en las pacientes con CMTN por separado (N=350) (166). Los tumores BL y HER2E se asociaron de forma significativa a una mejor respuesta al tratamiento, con pCR conjuntas de 38,5% frente a 18,5% de los tumores luminales ($OR_{ajustada} = 2,89$, IC 95% 1,04-8,00). En este caso, y en contraste con nuestros datos, los tumores TN/HER2E obtuvieron una alta tasa de pCR, del 47%, incluso mayor que los tumores BL. En este estudio, la incorporación del subtipo “claudin-low” no mejoró la capacidad predictiva de los subtipos intrínsecos en CMTN. Es interesante recalcar que los tumores BL mantuvieron tasas de pCR por encima del 35% independientemente del fenotipo IHQ (36%, 58% y 38% para los luminales, HER2-positivos y TN respectivamente). Por otro lado, Lehmann et al también analizaron la capacidad predictiva de respuesta de PAM50 en su cohorte de pacientes tratadas con antraciclinas y

taxanos, objetivando que, aunque los tumores basal-like se asociaron a mayores tasas de pCR que los no-BL (36,9% vs 20,0%), no alcanzaba la significación estadística en todos las bases de datos analizadas ($p=0,0175$, $p=0,11$) (48). Se objetivó asimismo que los tumores no-BL por PAM50 tenían una tendencia a una mejor SLE y SG, sin alcanzar la significación estadística. En el análisis combinado de las distintas bases de datos, el ser no-BL se asoció de forma significativa a una menor respuesta a quimioterapia (OR 0,50).

Recientemente se han comunicado los resultados preliminares de los análisis moleculares del ensayo clínico CALGB40603, entre los que se comunicaron los datos de respuesta según el PAM50 (167). Este estudio encuentra resultados contradictorios con lo disponible en la literatura, al objetivar mejores tasas de pCR entre las pacientes no-BL que en las BL. Resulta llamativo las pCR obtenidas en el subgrupo no-BL, en torno al 68% en la rama control, frente a un 30% en las pacientes BL. Estos hallazgos se encuentran muy por encima de lo esperable para este subgrupo de pacientes, tradicionalmente asociados a unas pCR de en torno al 30-35% en CMTN tratado con ese régimen terapéutico. La adición de carboplatino y bevacizumab se asoció a un aumento de la pCR en las pacientes BL, sin objetivarse un beneficio, e incluso un efecto deletéreo de bevacizumab, entre las pacientes no-BL. Sin embargo, la interpretación de estos resultados debe hacerse con cautela debido su escaso tamaño muestral y probable baja representatividad de la muestra.

	Tratamiento	Definición de pCR	Basales		No-basales		p-valor
			N	pCR	N	pCR	
CALGB40603 HOADLEY ET AL.	wP → ddAC wP → ddAC + Bev wP + Cb → ddAC wP + Cb → ddAC + bev	ypT0/is	343	30% 58% 44% 62%	46	68% 24% 68% 70%	NA
PRAT BMC 2015	Combinaciones antraciclinas + taxanos/exabepilona	ypT0/is ypN0	235	37% BL + HER2E 38,5%	57	33,4% 18,5%	0,01
LEHMANN ET AL 2016	Antraciclinas y taxanos N=306	ypT0/is ypN0		36%		20%	0,018
NCT01560663	TCb x 6	ypT0/is ypN0	78	51,3%	16	12,5%	0,005

wP: paclitaxel semanal. ddAC: adriamicina y ciclofosfamida en dosis densas. Cb: carboplatino. Bev: bevacizumab. TCb: docetaxel y carboplatino. YpT0: ausencia de tumor en la mama. ypT0/is: ausencia de tumor invasivo en la mama. YpN0: ausencia de tumor en la axila.

Por tanto, en nuestra cohorte de pacientes, el subtipo intrínseco BL se acompaña de un beneficio franco en la respuesta a QTNA, con una OR de alcanzar la pCR de 7,23. Existe una respuesta diferencial entre las pacientes BL y las no-BL, siendo este último subtipo un potencial marcador de quimio-resistencia. Aunque nuestros datos son firmes en la predicción de respuesta al tratamiento, y la respuesta patológica parece un buen subrogado de supervivencia, es imprescindible un análisis ulterior de supervivencia a largo plazo para evaluar el impacto real de los subtipos intrínsecos por PAM50 en CMTN.

5.2.2.1. Subtipos intrínsecos y respuesta a distintos fármacos:

Sin embargo, definir predictores de respuesta a combinaciones de fármacos es un objetivo complejo, ya que no es posible distinguir la contribución individual de cada fármaco a la respuesta

en un paciente concreto. Por ello, diversos estudios han tratado de evaluar la respuesta diferencial de estos subtipos intrínsecos a distintos fármacos en monoterapia (101). El estudio TNT, por ejemplo, objetivó diferencias claras en la respuesta a carboplatino y docetaxel según el subtipo intrínseco (BL y no-BL), en una cohorte de CMTN metastásico. En el caso de los tumores BL, se alcanzaron pCR similares con ambos fármacos, 32,6% y 35,2% con carboplatino y docetaxel respectivamente ($p=0,75$); mientras que en tumores no-BL, se objetiva una respuesta significativamente mayor con docetaxel que con carboplatino (73,7% vs 16,7%, $p<0,01$). Estas diferencias son mayores al considerar el subtipo basal por PAM50 que por la definición IHQ. Por otro lado, se objetivó que en CM metastásico el subtipo intrínseco basal-like se asociaba a una mayor respuesta a docetaxel que a doxorubicina (56% frente a 0% de pCR+RCB-I, respectivamente) (95).

Aunque ambos estudios se realizaron en CMTN metastásico, se evidencia que los tumores BL y no-BL tienen un sustrato biológico distinto, traducido en una respuesta diferencial a los fármacos. Con estos resultados, y con la distinta tasa de pCR obtenida en nuestro trabajo según el subtipo intrínseco, postulamos que las diferencias en pCR se deben a un escaso beneficio de carboplatino entre las pacientes no-BL. Sin embargo, los mecanismos de acción complementarios de carboplatino y docetaxel permitirían una acción sinérgica y el rescate de pacientes con uno u otro fármaco.

5.2.2.2. Valor predictivo de respuesta de PAM50 en otros subtipos de cáncer de mama:

Aunque en el caso de este trabajo nos centramos en el valor predictivo del PAM50 en CMTN, el beneficio de esta herramienta predictiva y pronóstica no se limita a este grupo de pacientes, y en el último año se han publicado numerosos estudios al respecto. En cáncer de mama HER2-positivo, por ejemplo, el estudio CALGB40601, que comparaba el tratamiento neoadyuvante con paclitaxel asociado a trastuzumab, lapatinib o la combinación de ambos, objetivó que los tumores HER2E por PAM50 alcanzaban unas tasas de pCR del 70% independientemente de la rama de tratamiento, frente a un 35% en los tumores luminales (168). Un análisis molecular del estudio NOAH también puso de manifiesto un incremento en las pCR entre las pacientes HER2-positivas/HER2E, así como en aquellas con un ROR alto (169,170). El subtipo HER2E identifica incluso a un subgrupo de pacientes en las que se alcanzan pCR del 41% con doble bloqueo, sin quimioterapia (33). En este estudio, se objetivó que, al realizar una nueva biopsia y determinación del subtipo intrínseco a los 14 días del tratamiento, hasta el 49% de los tumores se reclasificaron como normal-like. Estos tumores reconvertidos a normal-like obtuvieron pCR significativamente mayores, siendo esta conversión un reflejo de respuesta precoz al tratamiento con mayor porcentaje de tejido mamario normal en la muestra.

Además de este valor predictivo de respuesta a neoadyuvancia, los subtipos intrínsecos han demostrado un valor pronóstico, tanto en enfermedad localizada como metastásica (171,172). Sin embargo, el dato que mayor interés está cobrando es el potencial papel de PAM50 frente a la IHQ en la selección de terapias, al objetivarse beneficio de lapatinib en pacientes HER2-negativas por IHQ y con subtipo intrínseco HER2E por PAM50 (172).

5.2.3. CORRELACIÓN A LOS CENTROIDES Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

El análisis del PAM50, además de la asignación a un subtipo intrínseco, nos aporta información adicional sobre la proximidad de nuestras muestras a cada uno de los centroides.

En nuestra cohorte de pacientes, objetivamos una asociación entre la expresión de las firmas genéticas basal, “proliferation score” y luminal A, y la respuesta al tratamiento (asociación positiva y negativa respectivamente). Estas firmas sólo presentan una asociación significativa al considerar la muestra global de CMTN, y no al considerar las pacientes TN/BL. Nuestros datos difieren del análisis retrospectivo de dos cohortes de pacientes TN, en el que se objetivó una asociación entre la firma luminal A, PS y ROR con la respuesta al tratamiento, únicamente al considerar los tumores TN y BL por PAM50. El ROR y PS se asociaron asimismo a un efecto deletéreo en la SLED, al contrario que la firma génica luminal A (173,174)

Dado que la expresión de estas firmas génicas está relacionada con la asignación a los subtipos intrínsecos, parece más plausible que su expresión tenga un mayor valor predictivo en la población global de CMTN que en las pacientes BL por separado. De todos modos, la capacidad predictiva de estas firmas génicas es limitada, con AUC por debajo del 0.60 en la mayoría de los casos.

5.2.4. TN/BL Y TN/no-BL:

La mayoría de los estudios moleculares en CMTN se realizan en base a la clasificación dicotómica entre tumores BL y no-BL (44). Esto se fundamenta en que la expresión génica es

altamente concordante entre tumores BL, independientemente de su perfil IHQ (TN o no-TN), mientras que se objetivan diferencias significativas entre tumores TN de distinto subtipo intrínseco (fundamentalmente entre basal y no-basal) (44). Además, la baja proporción de tumores TN/no-BL (en torno al 15-25% de los CMTN), dificulta la realización de los análisis en cada subtipo por separado. Parece por tanto razonable la agrupación de los subtipos no-basales como entidad única.

La clasificación entre basal y no-basal no se limita a la clasificación por PAM50, sino que es un pilar de todas las aproximaciones genómicas al CMTN. De acuerdo a lo previamente expuesto, Rody et al identificó un metagen basal-like, con una distribución bimodal de los CMTN, clasificando en torno al 70% de estos tumores como BL (175). Estos tumores clasificados como basal-like se asociaban a la sobreexpresión de genes de proliferación y angiogénesis, y, al contrario, presentaban una correlación inversa con la expresión del metagen apocrino y de la señalización por la vía del receptor de andrógenos. Por otro lado, todas las clasificaciones moleculares surgidas en CMTN han identificado un subgrupo de pacientes basales, con implicaciones en la respuesta al tratamiento y pronóstico a largo plazo (48,51,52).

Por tanto, el CMTN parece englobar dos entidades con una base biológica distinta, los tumores basales y no-basales. Obviar esta clasificación al analizar los datos podría sesgar nuestros resultados, puesto que los factores predictivos de respuesta tienen un valor distinto entre tumores TN en global o TN/BL, como se ha puesto de manifiesto en este trabajo.

5.2.5. pCR o pCR+RCB-I:

Aunque tradicionalmente los estudios de neoadyuvancia se han centrado en la consecución de una pCR, existe cada vez mayor evidencia de que la enfermedad residual mínima (RCB-I) tiene un pronóstico a largo plazo equiparable al de la pCR. De hecho, en la actualización de los datos de supervivencia a largo plazo de Symmans et al, se confirma que en pacientes con CMTN, se obtienen supervivencias superponibles entre las pacientes con pCR y RCB-I, con una SLE a 10 años de 86% y 81% respectivamente ($p=0,58$). Por el contrario, las pacientes con enfermedad residual RCB-II y RCB-III presentan SLE significativamente menores, del 55% y 23% a 10 años ($p<0,01$ para ambas) (87). A la luz de estos datos, tiene sentido considerar ambos grupos en común, ya que comparten un mismo pronóstico favorable a largo plazo, objetivo final para nuestras pacientes. Además, considerar pCR frente a enfermedad residual podría diluir las diferencias entre pacientes, al mezclar en el grupo de enfermedad residual pacientes de buen y mal pronóstico. Por ello, en este trabajo presentamos en todo momento los datos en función de pCR frente a enfermedad residual (escenario R1) y pCR-RCB-I frente a RCB-II y RCB-III (escenario R2), obteniendo resultados similares en todos los análisis realizados. De la misma manera, el subgrupo RCB-II es un grupo de pronóstico incierto, con un 50% de las pacientes con larga supervivencia y la otra mitad con una recaída posterior y muerte debida al tumor.

5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR RNAseq:

Los CMTN presentan importante desregulación en su perfil de expresión génica comparado con el tejido mamario normal adyacente (“caos transcripcional”), lo que podría estar en la base de la distinta respuesta a fármacos. En este trabajo, evaluamos la expresión génica diferencial entre pacientes respondedoras y no respondedoras. El resultado principal derivado de este análisis es la asociación entre la sobreexpresión de genes de respuesta inmune y una mejor respuesta a la quimioterapia, independientemente del escenario analizado, al igual que la sobreexpresión de un grupo de genes de histonas.

5.3.1. Expresión génica inmune y respuesta a quimioterapia basada en TCb:

La asociación entre inmunidad y respuesta al tratamiento es uno de los temas que mayor interés está generando en el momento actual, ya sea mediante la evaluación de los infiltrados inmunes a nivel histológico como por la expresión de genes de respuesta inmune (176). El CMTN tiene una mayor carga mutacional que el resto de subtipos de cáncer de mama, y, de forma secundaria, una mayor producción de neoantígenos y mayor activación del sistema inmune e infiltración por TILs (39).

Esta interrelación entre inmunidad y respuesta en CMTN resulta evidente al revisar las nuevas clasificaciones moleculares del CMTN basadas en perfiles de expresión génica. En la clasificación de Jézéquel et al, se identifican 3 subtipos de CMTN: C1-LAR, C2-BL-LIR y C3-BL-HIR, estando el subtipo C3 caracterizado por la sobreexpresión de todos los metagenes de respuesta inmune

descritos por Rody (52). De la misma manera, Burstein et al clasificó el CMTN en 4 subtipos principales, siendo dos de ellos BL, uno inmunoactivado (BLIA) y el otro inmunosuprimido (BLIS), asociados al mejor y peor pronóstico respectivamente (51).

Hace una década Palmer ya describió firmas génicas representativas de las distintas células inmunes (177). Multitud de estudios han demostrado de forma consistente una mejor respuesta al tratamiento en aquellas mujeres con una sobreexpresión de genes de respuesta inmune, además de un valor pronóstico. Callari et al, por ejemplo, identificó un metagen inmune (CXCL13, PRF1, IRF1, IKZF1, GZMB y HLA-E) en 179 pacientes con CMTN tratadas con antraciclinas y taxanos, cuya expresión se asociaba a SLED a 5 años del 85,4% frente al 43,9% ($p=0,009$) (178). Alguno de los genes que conforman este metagen, como el HLA-E, se encuentra diferencialmente expresados en nuestra cohorte de pacientes. Recientemente se ha publicado nueva evidencia sobre el valor pronóstico favorable de la sobreexpresión de genes relacionados con el CMH en tumores basales (179). Por otro lado, la sobreexpresión de genes de células B y T ha demostrado asimismo una capacidad predictiva y pronóstica (127,180). La sobreexpresión de genes asociados a los neutrófilos, por el contrario, se ha asociado a enfermedad residual tras neoadyuvancia (127). Rody et al, por su parte, identificó 2 metagenes de respuesta inmune, B-cell e IL-8, asociados a buen y mal pronóstico respectivamente. Se desarrolló un índice pronóstico basado en el cociente B-cell/IL-8, objetivando que las pacientes del grupo de buen pronóstico (32% de las pacientes) tenían una SLE a 5 años del 84% frente al 59% del resto de pacientes (175). Además, se ha visto que los tumores basal-like tienen una mayor expresión de las firmas genómicas de linfocitos B, con un impacto pronóstico secundario. Se vio asimismo que la expresión de firmas inmunes B se asociaba de forma significativa con la expresión de otras firmas inmunes como

células T, y macrófagos (181) Esta sobreexpresión genómica y asociación pronóstica se ha validado asimismo en IHQ (182).

Diversos grupos han intentado desarrollar firmas génicas predictoras de respuesta. La construcción de una firma génica inmune formada por 23 genes demostró una capacidad predictiva de respuesta en cáncer de mama global y en tumores TN (41% vs 17% alto vs bajo, $p < 0.01$) y basal-like por PAM50 respectivamente (39% vs 19%, $p < 0.01$) (183).

Los últimos ensayos clínicos que evalúan la adición del carboplatino al tratamiento del CMTN también han realizado estudios de correlación inmune. Denkert et al analizaron la expresión de varios genes tanto inmunoactivadores como inmunosupresores dentro del ensayo clínico GEPARSIXTO (137). Al analizar 12 genes inmunes objetivaron una asociación con la respuesta a la quimioterapia (56,2% vs 24,0% entre los tumores con sobreexpresión de estos genes frente a los de menor expresión), existiendo una correlación entre los niveles de expresión y la infiltración por TILs. En este estudio, PDL1 y CCL5 fueron los genes con una mayor asociación con la pCR. Se vio que incluso marcadores de inmunosupresión (PD1, PD-L1, CTLA4 e IDO1) mostraron una asociación positiva con la respuesta. Esta sobreexpresión de PD-L1 a nivel de mRNA ya se había descrito en tejido de cáncer de mama, asociada a una mayor infiltración linfocitaria tumoral y mejor SLE, y con una mayor presencia en CMTN y basal-like (39,176,184). En nuestra muestra, objetivamos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD1 a nivel de mRNA y la respuesta a la quimioterapia ($p = 0,04$). En el caso de PD-L1, CTLA4 y FOXP3, aunque existe esta misma tendencia, no se alcanza la significación estadística. Por otra parte, se han presentado recientemente datos preliminares del estudio de predictores genómicos de

respuesta del CALGB40603, objetivando varias firmas inmunes, incluyendo células B, inmunoglobulinas y células T, asociadas a la pCR, aunque con una capacidad predictiva moderada (167).

5.3.2. Correlación de perfiles génicos inmunes y TILs:

Hay evidencia clara sobre la correlación entre la expresión de genes relacionados con los procesos inmunes y la infiltración por TILs a nivel histológico (127,137). Sin embargo, es importante distinguir si esta expresión génica proviene del propio tumor o del estroma, puesto que esto puede ser fuente de confusión. La clasificación inicial de CMTN por Lehmann, por ejemplo, identificó 2 subtipos (IM y MSL), cuyo origen se debía más a la expresión génica del estroma que de las células tumorales, procediéndose a su eliminación ulterior de la clasificación (46,48). Sin embargo, se ha visto que, aunque la expresión de genes inmunes pueda provenir en parte del estroma, la capacidad pronóstica de la sobreexpresión de genes de respuesta inmune se mantiene independientemente de la infiltración linfocitaria del tumor (185).

En el estudio GEPARSIXTO, además de la expresión de genes inmunes, se objetivó un valor predictivo de las TILs. Las pacientes con tumores de predominio linfocítico (LPBC), definido como la infiltración de $\geq 60\%$ por TILs intratumorales o estromales y que representan el 28,6% de los CMTN, presentaron unas tasas de pCR del 74% (137). Además del valor de las TILs pretratamiento, existe evidencia creciente de que las TILs post-tratamiento tienen un valor pronóstico clave. En efecto, se ha visto que, tras la quimioterapia, puede producirse un cambio en el microambiente inmune de los tumores, pasando de ser tumores “fríos” (con baja infiltración por TILs) a tumores “calientes” (infiltrados por TILs), teniendo esto una importante repercusión

pronóstica. En CMTN, y en especial en las pacientes con enfermedad residual extensa tras QTNA (tumor ≥ 2 cm y/o afectación ganglionar), se objetivó que una alta infiltración por TILs post-neoadyuvancia se asociaba a un pronóstico excelente (SLED a 5 años de 84% vs 36%, $p < 0,01$) (186,187). Además de un cambio cuantitativo en las TILs tras el tratamiento, se puede observar un cambio cualitativo en las células inmunes que infiltran los tumores en función de la respuesta obtenida. En tumores con pCR se objetiva una desaparición de linfocitos T reguladores FOXP3, con una estabilidad de CD8 (aumento del cociente CD8/FOXP3), mientras que en aquellas con enfermedad residual no hay modificaciones en su patrón de infiltración por FOXP3 ni CD8 (cociente CD8/FOXP3 estable) (188). La infiltración por TILs parece asimismo estar regulada por la expresión de la vía de las MAPK (187).

Existe evidencia de que los fármacos quimioterápicos convencionales también pueden inducir cambios en el microambiente inmune, y que parte de su actividad antitumoral tendría un mecanismo inmunológico. Parece que el carboplatino podría estimular el HLA, además de reducir la inmunosupresión por células dentríticas y células tumorales. Por su parte, los taxanos se han relacionado con la disfunción de linfocitos T reguladores FOXP3 y con el aumento de la permeabilidad de las células tumorales a la granzima B. Docetaxel se ha asociado asimismo con la depleción de células mieloides supresoras (MDSC) y con el aumento secundario de la respuesta antitumoral citotóxica (189).

Para concluir, los datos obtenidos en nuestra cohorte son, por tanto, consistentes con lo previamente descrito en la literatura, objetivando un enriquecimiento en la expresión de genes de respuesta inmune en las pacientes respondedoras. La relevancia del microambiente inmune

ha propiciado el desarrollo de ensayos clínicos de inmunoterapia en CMTN metastásico, todavía en fases iniciales (190). No obstante, quedan aún puntos por dilucidar, como por ejemplo el impacto de la expresión de genes de respuesta inmune en los distintos subgrupos moleculares de CMTN, o la respuesta a inmunoterapia en función del perfil de expresión génica.

5.3.3. Genes de proliferación y respuesta a QTNA:

Además de la sobreexpresión de genes de respuesta inmune en las pacientes respondedoras, objetivamos firmas génicas de proliferación, ciclo celular e histonas asociadas a la respuesta al tratamiento neoadyuvante.

Stover et al, en un metaanálisis de estudios neoadyuvantes con datos de expresión génica disponibles, evidenciaron que en todos los subtipos por IHQ, así como subtipos intrínsecos por PAM50, las firmas génicas de proliferación se asociaban de forma significativa a la respuesta a neoadyuvancia (174). En CMTN, específicamente, representaban un 63,3% de las firmas génicas asociadas a respuesta, además de una variedad de firmas génicas representando distintos procesos intratumorales (firmas inmunes, reparación del daño al DNA, vías de señalización intracelular, células madre...). Además, se ha objetivado que de forma precoz (24-96 horas tras la quimioterapia), se produce un descenso en la expresión de genes implicados en el ciclo celular y proliferación, así como de los genes de respuesta inmune (inmunosupresión inicial), asociado a la respuesta patológica (191).

Los hallazgos más relevantes en nuestros análisis de expresión diferencial es la sobreexpresión de un número significativo de genes de histonas en todos los escenarios analizados. En condiciones normales, la expresión de histonas se centra en la fase S del ciclo celular, para dar soporte a la replicación del DNA, con un aumento de hasta 5 veces en su transcripción en esta fase. Estos procesos están regulados por el complejo ciclina E-CDK2 (192,193). A su vez, la sobreexpresión de ciclina E es frecuente en cáncer de mama, y en especial en CMTN, asociada a un peor pronóstico (194,195). La asociación de expresión de genes de histonas a la respuesta a quimioterapia es sin embargo menos conocida. Rody et al, en una cohorte de CMTN, identificó un metagen de histonas, correlacionado de forma positiva con el “cluster” de IL8, ambos asociados a un peor pronóstico (175). No describen sin embargo asociación del metagen de histonas con los metagenes de proliferación.

5.3.4. Otras firmas génicas relacionadas con la respuesta:

Además de las firmas génicas previamente descritas, objetivamos una asociación entre menor expresión de FOXA1 y la respuesta a QTNA, aunque únicamente al tomar la muestra en global. Jiang et al evidenciaron que las mutaciones en AR/FOXA1 se asociaban de forma muy significativa a la pCR (94% vs 17%) tras neoadyuvancia con ACT, asociado además a una excelente supervivencia al extrapolar los datos a TCGA (196). El hecho de que esta asociación entre expresión de FOXA1 y AR sólo se objetive en la muestra global es probablemente un reflejo del enriquecimiento en la expresión de FOXA y AR en tumores no-BL, asociados a su vez a una baja tasa de pCR.

Se han descrito multitud de firmas génicas asociadas a la respuesta a QTNA, representando una amplia muestra de procesos celulares, como firmas de inestabilidad cromosómica, pérdida de PTEN, índices de grado histológico, factores de transcripción y firmas de riesgo de Mammaprint (197–199). Se ha descrito asimismo una asociación entre subtipo basal-like y la sobreexpresión de una firma génica de hipoxia, asociado a un mal pronóstico y alto riesgo de metástasis a distancia (200).

Además de los esfuerzos para identificar predictores de respuesta a neoadyuvancia mediante análisis de expresión génica, también se está estudiando a nivel mutacional en DNA tumoral. Sin embargo, el perfil mutacional del CMTN es muy heterogéneo y pocas mutaciones son recurrentes, no encontrándose diferencias entre las mutaciones y respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Por el contrario, una mayor alteración en el número de copias sí se asoció a una peor respuesta a neoadyuvancia (201).

5.3.5. Expresión génica en enfermedad residual:

La expresión génica tumoral es un proceso dinámico, que sufre modificaciones con la evolución y tratamientos recibidos. Además del valor predictivo y pronóstico de la expresión génica basal, el perfil de expresión en la enfermedad residual tras neoadyuvancia tiene un importante potencial pronóstico, y permite la identificación de dianas terapéuticas (141). Se ha objetivado que en pacientes no respondedores se produce un enriquecimiento en genes de supervivencia y motilidad celular (191,202). Pinto et al desarrollaron una firma génica basada en

3 únicos genes (CCL5, DDIT4 y POLR1C), asociada a distintas tasas de SLED según su expresión en la enfermedad residual tras neoadyuvancia (203).

5.4. CORRELACIÓN DE PAM50 por nCounter y RNAseq:

En este estudio se realizó la determinación del subtipo intrínseco mediante dos plataformas, nCounter (Nanostring Technologies) y RNAseq. Se obtiene una alta concordancia entre ambas técnicas, tanto para la asignación del subtipo intrínseco (94,6%), como para cada uno de los centroides (>90%).

La reproducibilidad de los análisis de expresión génica sobre muestras parafinadas por RNAseq y Nanostring nCounter, se ha visto confirmada tanto en patología tumoral como en enfermedades no tumorales (204–206). En concreto, en cáncer de mama, se objetivó una buena correlación entre Nanostring y RNAseq, apoyando el papel de Nanostring como validador de los hallazgos encontrados por RNAseq (207).

Sin embargo, no existen datos todavía publicados sobre la correlación del PAM50 entre ambas plataformas. Desde su desarrollo inicial en microarrays, la determinación del PAM50 se ha trasladado a qRT-PCR y plataforma Nanostring (25,164,208). Esta última ya demostró una mayor sensibilidad que las técnicas basadas en PCR, y una alta reproducibilidad (209,210).

La alta correlación entre el PAM50 realizado por Nanostring y RNAseq pone de manifiesto la robustez de la clasificación, así como la validez e intercambiabilidad de las dos plataformas

utilizadas. Esto último supone que los hallazgos del RNAseq puedan trasladarse a plataformas de nCounter, mucho más accesibles en la práctica clínica habitual. La secuenciación de RNA requiere una tecnología que no está al alcance de muchos centros, y una importante inversión de tiempo y dinero, tanto para su realización como para la interpretación de sus datos. Por el contrario, Nanostring permite el diseño de paneles de expresión génica con aplicabilidad y resultados de manera casi inmediata, optimizando el tiempo y los recursos. El RNAseq es por tanto una herramienta de investigación generadora de hipótesis, mientras que Nanostring representa la aplicación práctica.

5.5. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LEHMANN (TNBCtype-4) Y RESPUESTA A QTNA:

La clasificación genómica del CMTN de Lehmann et al ha sido una de las que ha tenido mayor impacto en la literatura. A partir de nuestros datos de RNAseq, evaluamos la distribución y capacidad predictiva de respuesta de la clasificación actualizada de Lehmann en nuestra serie.

5.5.1. Distribución de los subtipos:

La distribución de subtipos del TNBCtype-4 en nuestra cohorte fue muy similar a la descrita por Lehmann et al (48). Objetivamos que el subtipo BL1 era el más frecuente, representando el 34,0% de las pacientes, y la combinación de ambos subtipos basales, BL1 y BL2, alcanzó el 50-55% de las pacientes. Por el momento, existen pocos estudios con la clasificación actualizada de

TNBCtype, y la mayor parte de la literatura disponible utiliza la clasificación inicial en 6 subtipos (46). En efecto, el análisis de más de 350 tumores TN objetivó que la siguiente distribución: 15% BL1, 6% BL2, 20% IM, 8% LAR, 17% M y 7% MSL. Esta distribución es muy similar a la obtenida entre las pacientes TN y basales por IHQ incluidas en el ensayo clínico GEICAM/2006-03 (173,211).

Cabe resaltar que un 7% de nuestros tumores se clasificaron como ER-positivos según los niveles de expresión del gen ESR1, a pesar de la definición de TN utilizada para el reclutamiento de nuestras pacientes, con <1% de expresión de RE y RP. Estos tumores clasificados como ER-positivos no presentaron una asociación a ningún subtipo específico por PAM50. En otras series se ha descrito hasta un 17% de tumores descartados por la herramienta TNBCtype tool en base a los niveles de ESR1 (173).

Comparamos además la clasificación mediante las dos plataformas génicas, PAM50 y TNBCtype-4, objetivando que los tumores BL por PAM50 se correspondían a BL1, BL2 y M por TNBCtype, mientras que los tumores no-basales se correspondían en su mayoría a tumores LAR, en acuerdo con lo previamente publicado (173,212). Se ha visto de forma repetida que el subtipo LAR se compone principalmente de los tumores HER2E por PAM50, y es que a nivel de expresión génica la expresión de HER2 se correlaciona con la expresión de genes de respuesta esteroidea, encontrándose en un mismo cluster expresión ERBB2 y AR (185).

5.5.2. Respuesta a la QTNA:

En nuestra serie de pacientes, objetivamos una asociación estadísticamente significativa entre el TNBCtype y la respuesta a la quimioterapia, siendo el subtipo BL1 el que alcanzó mayores tasas de pCR (65,6%). Además, al considerar de forma conjunta pCR y RCB-I, se mantenía esta tendencia, con BL1 alcanzando un 75% de respuesta. Aunque no todos los estudios coinciden en encontrar un valor predictivo de respuesta del TNBCtype, el beneficio del subtipo BL1 en términos de pCR sí se ha descrito de forma consistente (173), aunque cabe resaltar que las pacientes de nuestras cohortes obtuvieron mayores tasas de pCR que las descritas en otras series (65,6% vs 40-55% con distintas combinaciones) (48,122). Parece además que este subtipo BL1 es el que se asocia a una mejor supervivencia a largo plazo, con una SLE a 10 años de alrededor del 60% (48).

Mientras que los datos sobre la mejor respuesta y supervivencia de las pacientes BL1 son consistentes en la literatura, los datos para BL2 y LAR son más controvertidos. En cuanto al BL2, los datos iniciales indicaban que este subtipo de tumores podía ser un subtipo con una especial quimiorresistencia, al presentar un 0% de pCR en los primeros estudios realizados (47). Por el contrario, en nuestra serie, las pacientes BL2 alcanzan una pCR de 47,4%, la segunda más alta en nuestra cohorte de pacientes. Nuestros datos están respaldados por varios estudios, en los que la pCR se sitúan en torno al 35-40% (122,211). En cuanto al subtipo LAR, aunque todos los estudios coinciden en que es un subtipo con pobre respuesta al tratamiento, los datos sobre la supervivencia a largo plazo son contradictorios, con algunos estudios situándolo como el de mejor y peor pronóstico respectivamente (47,48,212).

Además de haber pocos datos sobre la respuesta al tratamiento con la nueva clasificación TNBCtype-4, hay muy poca evidencia sobre la capacidad predictiva de TNBCtype en CMTN tratado sin antraciclinas y con sales de platino. En un ensayo clínico fase 2 que evaluaba la adición de everolimus a cisplatino y paclitaxel neoadyuvante, se realizó el TNBCtype en 48 de sus pacientes, obteniendo unas tasas de pCR similares a las nuestras a pesar de su pequeño tamaño muestra y de incluir el subtipo MSL, retirado de la nueva clasificación (122). Tabla 21.

	N	Treatment	TNBCtype-4	%	pCR rates
LEHMANN 2016 (COMBINED ANALYSIS)	306	AT	BL1	110 (35,9%)	46 (41,8%)
			BL2	67 (21,9%)	12 (17,9%)
			M	77 (25,2%)	29 (37,7%)
			LAR	52 (17,0%)	15 (28,8%)
JOVANOVIC 2017	48	CDDP- Paclitaxel +/- Everolimus	BL1	15 (31%)	8 (53%)
			BL2	3 (6%)	1 (33%)
			M	15 (31%)	7 (47%)
			MSL	9 (19%)	1 (33%)
			LAR	4 (8%)	1 (33%)
NCT 01560663	94	TCb x 6	BL1	32 (34,0%)	(65,6%)
			BL2	19 (20,2%)	(47,4%)
			M	23 (23,4%)	(36,4%)
			LAR	14 (14,7%)	(21,4%)
			ER+	7 (7,4%)	(14,3%)

5.6. RESPUESTA A QTNA SEGÚN MUTACIÓN EN GENES DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA:

5.6.1. Frecuencia y características de las pacientes con mutación:

En nuestro estudio evidenciamos un 11.7% de mutaciones entre nuestras pacientes TN, una frecuencia de mutaciones algo menor de la descrita en la literatura.

A nivel genómico, objetivamos que las pacientes portadoras de mutación en BRCA1/2 eran todas basales por PAM50 (58), mientras encontrábamos una mayor heterogeneidad al aplicar la el TNBCtype-4, con 30% de las pacientes BL1, 40% BL2 y 30% M .

Existen pocos datos en la literatura sobre el subtipo molecular de las pacientes portadoras de mutación. En una cohorte de pacientes con CMTN, se objetivó que entre las portadoras de mutación en BRCA, un 71.4% (5/7) tenían tumores basales por PAM50; y un 42,9% de BL1, 28,6% de M y 14,3% de MSL e inestables según el TNBCtype-4, respectivamente (130). Por su parte, Telli et al, entre 11 pacientes con CMTN y mutación en BRCA1/2, encontraron la siguiente distribución: 9,1% BL1, 36,4% IM, 18,2% M, 9,1% MSL y 27,3% inestables (117). Al igual que al considerarlo de forma global, no objetivamos diferencias en la respuesta patológica dentro de cada uno de los subtipos en función del estado mutacional.

Existe además evidencia de que los tumores con mayor carga mutacional se asocian a mejores pCR. Se ha objetivado que los tumores con deficiencias en BRCA se asocian a mayor carga mutacional y mayor infiltración linfocitaria secundaria (196).

5.6.2. Respuesta al tratamiento según estado mutacional:

En nuestra cohorte de pacientes analizamos la respuesta a QT en función del estado mutacional de un panel de 7 genes implicados en reparación homóloga. No identificamos diferencias en la respuesta entre estos dos grupos de pacientes, con una tasa de pCR de 50% para

las pacientes portadoras y 47,3% para las no mutadas, aunque el bajo número de mutaciones en la muestra (n=10) podría dificultar encontrar diferencias significativas.

La respuesta diferencial a fármacos quimioterápicos según el estado mutacional de BRCA se conoce desde hace tiempo, y, en especial, la especial quimiosensibilidad de los tumores BRCA mutados a las sales de platino. Dos estudios avalan la mayor respuesta de los CMTN metastásicos asociados a mutación en BRCA a las sales de platino en monoterapia. En el estudio TNT, se evidenciaron unas tasas de respuesta significativamente mayores con carboplatino frente a docetaxel en pacientes portadoras de mutación (68,0% vs 33,3%, $p=0,03$), sin diferencias significativas en la respuesta a dichos fármacos en pacientes sin mutación (28,1% vs 36,6% para carboplatino y docetaxel respectivamente, $p=0,16$). En este estudio no se objetivaron sin embargo diferencias en la respuesta a estos fármacos en función de la escala de recombinación homóloga (101). De la misma manera, en un estudio con carboplatino o cisplatino en 1ª o 2ª línea de enfermedad avanzada, se objetivó una mayor respuesta a tratamiento entre las pacientes portadoras de mutación (54,5% vs 19,7%, $p=0,022$), aunque este beneficio no se trasladó a SLP ni SG. En este caso, sí se objetivó un aumento de las respuestas en las pacientes con alteraciones de las vías de reparación homóloga (130). Por el contrario, se ha objetivado que los tumores TN con rasgos “BRCAness” se asociaban a una peor respuesta a quimioterapia neoadyuvante con taxanos, objetivándose tasas de pCR del 14,3% en las TN/BRCAness frente al 77,8% de las TN/no-BRCAness ($p=0,007$) (213).

Estos hallazgos se trasladan al escenario neoadyuvante, al objetivar tasas de pCR altas en pacientes tratadas con sales de platino en monoterapia. En efecto, al administrar cisplatino en

monoterapia en CMTN, se objetivó que, aunque la tasa global de pCR era del 22%, las 2 pacientes incluidas con mutación en BRCA la alcanzaron (102). Estos resultados propiciaron la realización de un estudio centrado en pacientes con CMTN y portadoras de mutación, en las que se alcanzó una pCR del 61% (103). Estas tasas de pCR son significativamente mayores que las obtenidas con esquemas de QT sin sales de platino en pacientes portadoras de mutación (104).

Sin embargo, en la mayor parte de los casos, las sales de platino no se usan en monoterapia sino en combinación con otros fármacos. Los datos sobre la respuesta diferencial en portadoras de mutación son aquí más controvertidos.

Por un lado, en varios estudios no se ha objetivado un beneficio del tratamiento con carboplatino en pacientes portadoras de mutación frente a pacientes sin mutación. En primer lugar, en un análisis conjunto de esta cohorte de pacientes y pacientes de la Universidad de Kansas (n=190 pacientes), no se identificaron diferencias en la respuesta a carboplatino y docetaxel, con una pCR de 59% y 56% para las pacientes BRCA-mutadas y BRCA-nativas (p=0,83) (111). Por su parte, en el ensayo GEPARSIXTO, la adición de carboplatino aumentó de forma significativa la pCR en las pacientes BRCA-nativas (50,8% vs 33,1%, p=0,005), sin lograr alcanzar la significación en las portadoras de mutación (61,5% vs 50,0%, p=0,41) (109). La combinación de carboplatino y eribulina neoadyuvantes no encontró diferencias significativas en las tasas de pCR entre pacientes mutadas y no mutadas, aunque el bajo tamaño muestral dificulta la interpretación de este estudio. Por el contrario, la escala de recombinación homóloga (HRD score) sí se asoció de forma significativa a la consecución de una pCR en estas pacientes (121).

No obstante, en otros estudios sí se ha objetivado un mayor beneficio del tratamiento neoadyuvante en pacientes portadoras de mutación. En el ensayo PrECOG0105 de combinación de carboplatino, gemcitabina e iniparib neoadyuvante, la mutación en BRCA1/2 se asoció a un incremento significativo de las tasas de pCR (50% vs 24%, $p=0,04$) y pCR+RCB-I (75% vs 48%, $p=0,037$). En este ensayo se evidenció además una mayor tasa de respuestas en las pacientes con valores altos en el HRD score: 66% pCR+RCB-I en pacientes con niveles altos de la escala o mutación en BRCA vs 8% en aquellas con valores bajos y sin mutación (117). Telli et al evaluó este HRD score en varios estudios, objetivando pCR significativamente mayores en aquellas pacientes con deficiencia en la recombinación homóloga, tanto en pacientes tratadas con cisplatino en monoterapia como en combinación e independientemente del estado mutacional de BRCA. El HRD score demostró un alto valor predictivo de pCR en estas pacientes, con unas AUC en torno a 0,75. Se ha evidenciado además una alta correlación entre el HRD score y la presencia de mutación (129). Jovanovic et al, en su estudio de cisplatino, taxol con o sin everolimus, evidenciaron un enriquecimiento de mutaciones en línea germinal de genes implicados en reparación homóloga en pacientes respondedoras (pCR y casi-pCR) que en las no respondedoras, 71% vs 31%, ($p<0,01$) (122). Se ha objetivado asimismo un beneficio en supervivencia de la adición de agentes alquilantes a dosis densas (carboplatino, ciclofosfamida y thiotepa) a quimioterapias convencionales en las pacientes con fenotipo BRCA (214). Se ha descrito la adquisición de una nueva mutación en BRCA1 durante el tratamiento, que reinstauraba el marco de lectura y restablecía la función de BRCA1, como mecanismo de resistencia adquirida al tratamiento (215).

Se ha visto de forma repetida que no hay diferencias en la pCR o supervivencia en pacientes con CMTN tratadas con antraciclinas y taxanos en función de su estado mutacional o fenotipo BRCA-like (216). Sí se ha descrito un beneficio de antraciclinas y taxanos a dosis densas (61% vs 39% en las no mutadas, $p=0,007$), sin diferencias en SLE (217). Lo que sí que se vio es que aquellos tumores cuya enfermedad residual mantenía el fenotipo BRCA1-Like asociaban un peor pronóstico que los tumores esporádicos (218).

En cuanto al impacto pronóstico de las mutaciones en BRCA1/2 en pacientes TN, no se objetivaron diferencias en el patrón de recidivas a distancia, SLED y SG entre pacientes portadoras y no portadoras (57).

Por tanto, hay datos controvertidos sobre el potencial valor predictivo de las mutaciones en BRCA o genes relacionados. En nuestro caso y otras series parecidas tratadas con la combinación de docetaxel y carboplatino, no objetivamos diferencias en la respuesta a QTNA según el estado mutacional de estos genes (111). Esta ausencia de diferencias en la respuesta podría explicarse por la complementariedad del mecanismo de acción de docetaxel y carboplatino, que rescatarían tanto a las pacientes portadoras de mutación como a las no portadoras, ya que docetaxel parece más activo en pacientes sin mutación, y, al contrario, carboplatino en las pacientes portadoras de mutación. Además, parece que hasta un 40-50% de los tumores BRCA-nativos pueden conllevar deficiencias en la recombinación homóloga, por lo que el beneficio de los platinos podría extenderse asimismo a esta población de pacientes.

5.7. PUNTOS FUERTE Y LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO:

Este estudio demuestra por tanto el valor predictivo de respuesta del subtipo intrínseco por PAM50 en una serie de pacientes tratadas homogéneamente con carboplatino y docetaxel neoadyuvante. Estos datos son novedosos y relevantes, puesto que no existe apenas información sobre el papel del PAM50 y los factores predictivos de respuesta a QTNA en CMTN tratado con esta combinación. El análisis de expresión génica diferencial aporta información importante, con el enriquecimiento de genes de respuesta inmune y proliferación en las pacientes respondedoras. Presentamos además datos novedosos sobre el valor predictivo de respuesta de la clasificación actualizada de Lehmann (TNBCtype-4) y de su distribución en pacientes con mutación en genes de recombinación homóloga.

Sin embargo, este estudio también tiene sus limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral es limitado, lo que limita la potencia para los análisis, sobre todo para aquellos con distribuciones más desiguales de los comparadores, como los análisis de quimio-resistencia (n=12), comparaciones entre portadoras (n=10) y no-portadoras de mutación, pero, sobre todo, para los análisis de expresión génica. El análisis de una cohorte posterior de validación aportará sin duda mayor robustez a los hallazgos de esta tesis doctoral. Por otro lado, aunque realizamos un análisis en profundidad de la transcriptómica de los tumores, sabemos que hay muchos otros factores implicados en la carcinogénesis y respuesta al tratamiento, como las mutaciones a nivel somático, alteración en número de copias y regulación epigenética entre otros. El análisis mutacional de este panel de genes de recombinación homóloga es asimismo limitado.

5.8. PLANES FUTUROS:

Aunque con este trabajo objetivamos el valor predictivo de respuesta de PAM50 (BL vs no-BL), quedan aún muchas cuestiones por resolver:

- En primer lugar, valorar el impacto pronóstico a largo plazo de la clasificación molecular por PAM50. Aunque la pCR es un buen subrogado de supervivencia, sabemos que no todas las pacientes con pCR se van a encontrar libres de enfermedad, y, por el contrario, no todas las pacientes con enfermedad residual van a tener mal pronóstico. Lograr identificar a las pacientes libres de enfermedad a distancia a largo plazo es sin duda el objetivo con una mayor validez en la práctica clínica. En nuestro caso, con una mediana de seguimiento de 35 meses, no podemos todavía realizar estos análisis, pero el análisis futuro de estos datos aportará sin duda información de gran utilidad.
- Por otro lado, el valor predictivo y pronóstico de la infiltración por TILs, así como su correlación con la expresión de firmas génicas inmunes ofrecerán información de gran interés. Estos análisis ya están en marcha.
- El análisis de expresión diferencial de isoformas, es decir, variantes del splicing alternativo, asociados a respuesta o resistencia a tratamiento, aportará asimismo información adicional.
- La evaluación de la enfermedad residual tras neoadyuvancia, tanto a nivel de PAM50, expresión génica, ki67 y TILs, y su asociación con el pronóstico a largo plazo es otro análisis que podría tener un gran impacto en la búsqueda de nuevas dianas en las pacientes en las que se concentra el mayor número de futuras recaídas.

- Por último, será interesante evaluar la concordancia del subtipo intrínseco y perfil de expresión génica entre tumor primario y enfermedad residual tras neoadyuvancia, con el fin de evaluar los cambios genómicos ocurridos en el tumor tras la exposición a QTNA.

6. CONCLUSIONES

1. El subtipo intrínseco basal-like se asocia de forma significativa a una mayor tasa de respuestas completas patológicas con el tratamiento neoadyuvante basado en carboplatino y docetaxel en cáncer de mama triple negativo. La determinación del PAM50 incrementa el poder predictivo de los factores histopatológicos.
2. La correlación a los centroides basal y luminal A, presenta una asociación estadísticamente significativa positiva y negativa respectivamente, con la respuesta completa patológica tras quimioterapia neoadyuvante basada en TCb. No se objetiva por el contrario valor predictivo en la población BL por separado.
3. El “Proliferation Score” (PS) y “Risk of Recurrence” (ROR) se asocian de forma positiva estadísticamente significativa a la respuesta a QTNA con TCb en la población de CMTN global, perdiendo este valor predictivo al considerar los tumores BL por separado.
4. El subtipo intrínseco no-basal y la correlación al centroide basal son los únicos factores asociados a la quimiorresistencia (RCB-III) a QTNA con TCb.
5. Existe una alta correlación entre el PAM50 determinado por nCounter (Nanostring Technologies) y RNAseq, pudiéndose considerar ambas técnicas equiparables a nivel técnico y siendo el nCounter una plataforma mucho más práctica.
6. Existen diferencias en el perfil de expresión génica entre pacientes respondedoras y no-respondedoras, con un enriquecimiento en genes de respuesta inmune y proliferación entre las pacientes que alcanzan la pCR.
7. La clasificación molecular de Lehmann et al tiene valor predictivo de respuesta, siendo el subtipo BL1 el que alcanza una mayor tasa de pCR en pacientes tratadas con QTNA con TCb.

8. La mutación en genes de recombinación homóloga no se asocia a diferencias en la respuesta a QTNA con TCb en nuestra serie.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017. Atlanta GA Am Cancer Soc 2017.
2. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2784–95.
3. Iwamoto T, Booser D, Valero V, Murray JL, Koenig K, Esteva FJ, et al. Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-Related Gene Expression in Breast Cancers That Are 1% to 10% ER-Positive by Immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 1;30(7):729–34.
4. Raghav KPS, Hernandez-Aya LF, Lei X, Chavez-MacGregor M, Meric-Bernstam F, Buchholz TA, et al. Impact of low estrogen/progesterone receptor expression on survival outcomes in breast cancers previously classified as triple negative breast cancers. *Cancer*. 2012 Mar 15;118(6):1498–506.
5. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.
6. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 31;25(1):118–45.
7. Penault-Llorca F, Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol*. 2012 Aug 1;23(suppl 6):vi19-vi22.
8. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol*. 2012 Aug 1;23(suppl 6):vi7-vi12.
9. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492.
10. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1721–8.
11. Huo D, Ikpatt F, Khramtsov A, Dangou J-M, Nanda R, Dignam J, et al. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4515–21.

12. Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, Chi DD, Westrup JL, Charlot M, et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11(2):R18.
13. Phipps AI, Chlebowski RT, Prentice R, McTiernan A, Wactawski-Wende J, Kuller LH, et al. Reproductive History and Oral Contraceptive Use in Relation to Risk of Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2011 Mar 16;103(6):470–7.
14. Dolle JM, Daling JR, White E, Brinton LA, Doody DR, Porter PL, et al. Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2009 Apr;18(4):1157–66.
15. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS, et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11(3):R31.
16. Kabat GC, Kim M, Phipps AI, Li CI, Messina CR, Wactawski-Wende J, et al. Smoking and alcohol consumption in relation to risk of triple-negative breast cancer in a cohort of postmenopausal women. *Cancer Causes Control CCC*. 2011 May;22(5):775–83.
17. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15):4429–34.
18. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938–48.
19. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368–76.
20. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Apr 28;106(5).
21. Collett K, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Wang H, Eide GE, et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2005 May;14(5):1108–12.
22. Ribelles N, Perez-Villa L, Jerez J, Pajares B, Vicioso L, Jimenez B, et al. Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. *Breast Cancer Res*. 2013;15(5):R98.
23. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 May;115(2):423–8.

24. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.
25. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
26. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
27. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68.
28. Heng YJ, Lester SC, Tse GMK, Factor RE, Allison KH, Collins LC, et al. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes. *J Pathol*. 2016 Nov 14;
29. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
30. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014 Feb;25(2):339–45.
31. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Clin Oncol*. 2013 Aug 1;31(22):2783–90.
32. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, Lopez-Knowles E, Filipits M, Dubsky P, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 10;33(8):916–22.
33. Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017 Feb [cited 2017 Mar 28]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204517300219>

34. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2011 Feb;24(2):157–67.
35. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367–74.
36. Gazinska P, Grigoriadis A, Brown JP, Millis RR, Mera A, Gillett CE, et al. Comparison of basal-like triple-negative breast cancer defined by morphology, immunohistochemistry and transcriptional profiles. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2013 Jul;26(7):955–66.
37. Cheang MCU, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *The Oncologist.* 2015 May;20(5):474–82.
38. Bastien RR, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MT, Prat A, Munárriz B, Rowe L, et al. PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-qPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers. *BMC Med Genomics.* 2012;5(1):44.
39. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012 Sep 23;490(7418):61–70.
40. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature [Internet].* 2012 Apr 4 [cited 2015 Sep 10]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10933>
41. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, et al. Multiplatform Analysis of 12 Cancer Types Reveals Molecular Classification within and across Tissues of Origin. *Cell.* 2014 Aug;158(4):929–44.
42. Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist.* 2011 Jan 1;16(Supplement 1):61–70.
43. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011 Feb;5(1):5–23.
44. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist.* 2013 Feb 1;18(2):123–33.
45. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2016 Sep;19(3):223–30.

46. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2750–67.
47. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5533–40.
48. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. Sapino A, editor. *PLOS ONE*. 2016 Jun 16;11(6):e0157368.
49. Ring BZ, Hout DR, Morris SW, Lawrence K, Schweitzer BL, Bailey DB, et al. Generation of an algorithm based on minimal gene sets to clinically subtype triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 Dec [cited 2016 Oct 16];16(1). Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2198-0>
50. Chen X, Li J, Gray WH, Lehmann BD, Bauer JA, Shyr Y, et al. TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Inform*. 2012;11:147–56.
51. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Apr 1;21(7):1688–98.
52. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 Feb 15];17(1). Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/17/1/43>
53. Liu Y-R, Jiang Y-Z, Xu X-E, Yu K-D, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2016;18(1):33.
54. Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, Qu W, Nair SS, Locke WJ, et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun*. 2015;6:5899.
55. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* [Internet]. 2012 Apr 18 [cited 2017 Jan 27]; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature10983>
56. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Sep;27(suppl 5):v103–10.

57. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited Mutations in 17 Breast Cancer Susceptibility Genes Among a Large Triple-Negative Breast Cancer Cohort Unselected for Family History of Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 1;33(4):304–11.
58. González-Rivera M, Lobo M, López-Tarruella S, Jerez Y, del Monte-Millán M, Massarrah T, et al. Frequency of germline DNA genetic findings in an unselected prospective cohort of triple-negative breast cancer patients participating in a platinum-based neoadjuvant chemotherapy trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Apr;156(3):507–15.
59. Hartman A-R, Kaldete RR, Sailer LM, Painter L, Grier CE, Endsley RR, et al. Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2012 Jun 1;118(11):2787–95.
60. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 2015 The NCCN clinical practice guidelines in oncology TM 2010. Genetic/familial high risk assessment: breast and ovarian v2.2015. www.nccn.com.
61. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, et al. Clinical and Pathologic Characteristics of Patients With BRCA-Positive and BRCA-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 10;26(26):4282–8.
62. Tung N, Gaughan E, Hacker MR, Lee LJ, Alexander B, Poles E, et al. Outcome of triple negative breast cancer: comparison of sporadic and BRCA1-associated cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jul;146(1):175–82.
63. Heemskerk-Gerritsen BAM, Seynaeve C, van Asperen CJ, Ausems MGEM, Collee JM, van Doorn HC, et al. Breast Cancer Risk After Salpingo-Oophorectomy in Healthy BRCA1/2 Mutation Carriers: Revisiting the Evidence for Risk Reduction. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2015 Mar 18;107(5):dju033-dju033.
64. Foulkes WD, Shuen AY. In Brief: *BRCA1* and *BRCA2*: In Brief: *BRCA1* and *BRCA2*. *J Pathol*. 2013 Aug;230(4):347–9.
65. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet Lond Engl*. 2010 Jul 24;376(9737):235–44.
66. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from *BRCA* Mutation Carriers. *N Engl J Med*. 2009 Jul 9;361(2):123–34.
67. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):814–9.
68. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016 Feb;16(2):110–20.

-
69. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz ALT, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer*. 2013 May 28;108(10):2172–7.
 70. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):793–802.
 71. Lohrisch C, Paltiel C, Gelmon K, Speers C, Taylor S, Barnett J, et al. Impact on survival of time from definitive surgery to initiation of adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Oct 20;24(30):4888–94.
 72. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant Versus Adjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005 Feb 2;97(3):188–94.
 73. van der Hage JH, van de Velde CC, Mieog SJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. In: *The Cochrane Collaboration, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2007 [cited 2017 Jan 20]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD005002.pub2>*
 74. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*. 2014 Jul;384(9938):164–72.
 75. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26(suppl 5):v8–30.
 76. Prowell TM, Pazdur R. Pathological Complete Response and Accelerated Drug Approval in Early Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2438–41.
 77. Berry DA, Hudis CA. Neoadjuvant Therapy in Breast Cancer as a Basis for Drug Approval. *JAMA Oncol*. 2015 Oct 1;1(7):875.
 78. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet*. 2012 Feb;379(9816):633–40.
 79. Piccart-Gebhart M, Holmes E, Baselga J, de Azambuja E, Dueck AC, Viale G, et al. Adjuvant Lapatinib and Trastuzumab for Early Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization Trial. *J Clin Oncol [Internet]*. 2015 Nov 23 [cited 2015 Dec 9]; Available from: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2015.62.1797>
 80. Choi M, Park YH, Ahn JS, Im Y-H, Nam SJ, Cho SY, et al. Assessment of pathologic response and long-term outcome in locally advanced breast cancers after neoadjuvant
-

- chemotherapy: comparison of pathologic classification systems. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Dec;160(3):475–89.
81. Carey LA, Metzger R, Dees EC, Collichio F, Sartor CI, Ollila DW, et al. American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Aug 3;97(15):1137–42.
 82. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 4;25(28):4414–22.
 83. Peintinger F, Sinn B, Hatzis C, Albarracin C, Downs-Kelly E, Morkowski J, et al. Reproducibility of residual cancer burden for prognostic assessment of breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2015 Jul;28(7):913–20.
 84. Esserman LJ, Berry DA, DeMichele A, Carey L, Davis SE, Buxton M, et al. Pathologic Complete Response Predicts Recurrence-Free Survival More Effectively by Cancer Subset: Results From the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J Clin Oncol.* 2012 Sep 10;30(26):3242–9.
 85. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
 86. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet.* 2014 Jul;384(9938):164–72.
 87. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, et al. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *J Clin Oncol.* 2017 Jan 30;JCO.2015.63.101.
 88. Hatzis C, Symmans WF, Zhang Y, Gould RE, Moulder SL, Hunt KK, et al. Relationship between Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy and Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 Jan 1;22(1):26–33.
 89. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329–34.
 90. Fornier M, Fumoleau P. The paradox of triple negative breast cancer: novel approaches to treatment. *Breast J.* 2012 Feb;18(1):41–51.
 91. von Minckwitz G, Martin M. Neoadjuvant treatments for triple-negative breast cancer (TNBC). *Ann Oncol.* 2012 Aug 1;23(suppl 6):vi35-vi39.

92. von Minckwitz G, Untch M, Nüesch E, Loibl S, Kaufmann M, Kümmel S, et al. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jan;125(1):145–56.
93. Nahleh ZA, Barlow WE, Hayes DF, Schott AF, Gralow JR, Sikov WM, et al. SWOG S0800 (NCI CDR0000636131): addition of bevacizumab to neoadjuvant nab-paclitaxel with dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide improves pathologic complete response (pCR) rates in inflammatory or locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Aug;158(3):485–95.
94. Giacchetti S, Porcher R, Lehmann-Che J, Hamy A-S, de Roquancourt A, Cuvier C, et al. Long-term survival of advanced triple-negative breast cancers with a dose-intense cyclophosphamide/anthracycline neoadjuvant regimen. *Br J Cancer.* 2014 Mar 18;110(6):1413–9.
95. Martin M, Romero A, Cheang MCU, López García-Asenjo JA, García-Saenz JA, Oliva B, et al. Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jul;128(1):127–36.
96. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5678–85.
97. Llombart-Cussac A, Bermejo B, Villanueva C, Delaloge S, Morales S, Balmaña J, et al. SOLTI NeoPARP: a phase II randomized study of two schedules of iniparib plus paclitaxel versus paclitaxel alone as neoadjuvant therapy in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Nov;154(2):351–7.
98. Jung YY, Hyun CL, Jin M-S, Park IA, Chung YR, Shim B, et al. Histomorphological Factors Predicting the Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2016 Sep;19(3):261–7.
99. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015 Jan 1;33(1):13–21.
100. Ando M, Yamauchi H, Aogi K, Shimizu S, Iwata H, Masuda N, et al. Randomized phase II study of weekly paclitaxel with and without carboplatin followed by cyclophosphamide/epirubicin/5-fluorouracil as neoadjuvant chemotherapy for stage II/IIIA breast cancer without HER2 overexpression. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jun;145(2):401–9.

101. Andrew Tutt. A Randomized Phase III Trial of Carboplatin compared with Docetaxel for Patients with Metastatic or Recurrent Locally Advanced Triple Negative or BRCA 1/2 Breast Cancer. In San Antonio, Texas; 2014.
102. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1145–53.
103. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Marczyk E, Jasiowka M, Gronwald J, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Sep;147(2):401–5.
104. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, et al. Pathologic Complete Response Rates in Young Women With BRCA1-Positive Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):375–9.
105. Wang L-Y, Xie H, Zhou H, Yao W-X, Zhao X, Wang Y. Efficacy of carboplatin-based preoperative chemotherapy for triple-negative breast cancer. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Saudi Med J*. 2017 Jan;38(1):18–23.
106. Petrelli F, Coiru A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, et al. The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Apr;144(2):223–32.
107. Sikov W, Berry D, Perou C, Singh B, Cirrincione C, Tolaney S, et al. Abstract S2-05: Event-free and overall survival following neoadjuvant weekly paclitaxel and dose-dense AC +/- carboplatin and/or bevacizumab in triple-negative breast cancer: Outcomes from CALGB 40603 (Alliance). *Cancer Res*. 2016 Feb 15;76(4 Supplement):S2-5-S2-5.
108. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jun;15(7):747–56.
109. von Minckwitz G, Loibl S, Schneeweiss A, Salat C, Rezai M, Zahm D-M, et al. Abstract S2-04: Early survival analysis of the randomized phase II trial investigating the addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto). *Cancer Res*. 2016 Feb 15;76(4 Supplement):S2-4-S2-4.
110. Alba E, Chacon JI, Lluch A, Anton A, Estevez L, Cirauqui B, et al. A randomized phase II trial of platinum salts in basal-like breast cancer patients in the neoadjuvant setting. Results from the GEICAM/2006-03, multicenter study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Nov;136(2):487–93.
111. Sharma P, Lopez-Tarruella S, Garcia-Saenz JA, Ward C, Connor C, Gomez HL, et al. Efficacy of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel in triple negative breast cancer: Combined analysis of two cohorts. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 Jun 14 [cited 2016 Sep 25];

- Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-16-0162>
112. Kern P, Kalisch A, Kolberg H-C, Kimmig R, Otterbach F, von Minckwitz G, et al. Neoadjuvant, anthracycline-free chemotherapy with carboplatin and docetaxel in triple-negative, early-stage breast cancer: a multicentric analysis of feasibility and rates of pathologic complete response. *Chemotherapy*. 2013;59(5):387–94.
 113. Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, et al. Frequent pathologic complete responses in aggressive stages II to III breast cancers with every-4-week carboplatin and weekly paclitaxel with or without trastuzumab: a Brown University Oncology Group Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4693–700.
 114. Zhu T, Liu CL, Zhang YF, Liu YH, Xu FP, Zu J, et al. A phase II trial of dose-dense (biweekly) paclitaxel plus carboplatin as neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Feb;156(1):117–24.
 115. Zhang P, Yin Y, Mo H, Zhang B, Wang X, Li Q, et al. Better pathologic complete response and relapse-free survival after carboplatin plus paclitaxel compared with epirubicin plus paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced triple-negative breast cancer: a randomized phase 2 trial. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):60647–56.
 116. Ryan PD, Tung NM, Isakoff SJ, Golshan M, Richardson A, Corben AD, et al. Neoadjuvant cisplatin and bevacizumab in triple negative breast cancer (TNBC): Safety and efficacy. In Chicago, USA: *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 551);
 117. Telli ML, Jensen KC, Vinayak S, Kurian AW, Lipson JA, Flaherty PJ, et al. Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 10;33(17):1895–901.
 118. Hurley J, Reis IM, Rodgers SE, Gomez-Fernandez C, Wright J, Leone JP, et al. The use of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in locally advanced breast cancer that is triple negative: retrospective analysis of 144 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Apr;138(3):783–94.
 119. Gluz O, Nitz U, Liedtke C, Christgen M, Sotlar K, Grischke E, et al. Abstract S6-07: Comparison of 12 weeks neoadjuvant Nab-paclitaxel combined with carboplatinum vs. gemcitabine in triple-negative breast cancer: WSG-ADAPT TN randomized phase II trial. *Cancer Res*. 2016 Feb 15;76(4 Supplement):S6-7-S6-7.
 120. Rugo HS, Olopade OI, DeMichele A, Yau C, van 't Veer LJ, Buxton MB, et al. Adaptive Randomization of Veliparib–Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Jul 7;375(1):23–34.

121. Kaklamani VG, Jeruss JS, Hughes E, Sziopikou K, Timms KM, Gutin A, et al. Phase II neoadjuvant clinical trial of carboplatin and eribulin in women with triple negative early-stage breast cancer (NCT01372579). *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Jun;151(3):629–38.
122. Jovanovic B, Mayer IA, Mayer EL, Abramson VG, Bardia A, Sanders M, et al. A randomized phase II neoadjuvant study of cisplatin, paclitaxel with or without everolimus in patients with stage II/III triple-negative breast cancer (TNBC). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Mar 7;
123. Carey LA. Directed Therapy of Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist.* 2011 Jan 1;16(Supplement 1):71–8.
124. Alba E, Lluch A, Ribelles N, Anton-Torres A, Sanchez-Rovira P, Albanell J, et al. High Proliferation Predicts Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Early Breast Cancer. *The Oncologist.* 2016 Feb 1;21(2):150–5.
125. Masuda H, Masuda N, Kodama Y, Ogawa M, Karita M, Yamamura J, et al. Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Apr;67(4):911–7.
126. Criscitiello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2012 Aug 1;23(suppl 6):vi13-vi18.
127. Lee HJ, Lee J-J, Song IH, Park IA, Kang J, Yu JH, et al. Prognostic and predictive value of NanoString-based immune-related gene signatures in a neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer: relationship to tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Jun;151(3):619–27.
128. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LFA, Schmidt MK, van Beers EH, et al. An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2011 Jul;22(7):1561–70.
129. Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2016 Aug 1;22(15):3764–73.
130. Isakoff SJ, Mayer EL, He L, Traina TA, Carey LA, Krag KJ, et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2015 Jun 10;33(17):1902–9.
131. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Dec 15;13(4):228–41.

132. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb 1;26(2):259–71.
133. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 1;28(1):105–13.
134. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F, et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 1;31(7):860–7.
135. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*. 2014 Jul 28;JCO.2013.55.0491.
136. Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V, Rotmensz N, De Rose A, Palazzo A, et al. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2016 Feb;27(2):249–56.
137. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive and Triple-Negative Primary Breast Cancers. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 20;33(9):983–91.
138. O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MHZ, Weiner-Gorzel K, et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin*. 2015 Jun;3:257–75.
139. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Aug 18;106(33):13820–5.
140. Gómez-Miragaya J, Palafox M, Paré L, Yoldi G, Ferrer I, Vila S, et al. Resistance to Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer Associates with the Dynamics of a CD49f+ Tumor-Initiating Population. *Stem Cell Rep [Internet]*. 2017 Apr [cited 2017 May 8]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671117301339>
141. Balko JM, Giltnane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS, et al. Molecular Profiling of the Residual Disease of Triple-Negative Breast Cancers after Neoadjuvant Chemotherapy Identifies Actionable Therapeutic Targets. *Cancer Discov*. 2014 Feb 1;4(2):232–45.

-
142. Sohn J, Do KA, Liu S, Chen H, Mills GB, Hortobagyi GN, et al. Functional proteomics characterization of residual triple-negative breast cancer after standard neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2013 Oct 1;24(10):2522–6.
 143. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17(6):1471–4.
 144. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer*. 2005 Aug 22;93(4):387–91.
 145. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008 Mar;26(3):317–25.
 146. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Feb 5];8(1). Available from: <http://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-015-0129-6>
 147. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6567–72.
 148. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009 Jan;10(1):57–63.
 149. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014;15(2):R29.
 150. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47.
 151. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015 Dec 23;1(6):417–25.
 152. Von Minckwitz G, Hahnen E, Fasching PA, Hauke J, Schneeweiss A, Salat C, et al. Pathological complete response (pCR) rates after carboplatin-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with germline BRCA (gBRCA) mutation and triple-negative breast cancer (TNBC): Results from GeparSixto. In Chicago, USA: *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 1005);
-

-
153. Davis SL, Eckhardt SG, Tentler JJ, Diamond JR. Triple-negative breast cancer: bridging the gap from cancer genomics to predictive biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*. 2014 May;6(3):88–100.
 154. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, et al. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol* [Internet]. 2017 Jan 11 [cited 2017 Feb 27]; Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon-2016-0420>
 155. Li X, Liu M, Zhang Y, Wang J, Zheng Y, Li J, et al. CK5/6, EGFR, Ki-67, cyclin D1, and nm23-H1 protein expressions as predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2011 Dec;28 Suppl 1:S129-134.
 156. Prat A, Lluch A, Albanell J, Barry WT, Fan C, Chacón JI, et al. Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2014 Oct 14;111(8):1532–41.
 157. Wang R-X, Chen S, Jin X, Shao Z-M. Value of Ki-67 expression in triple-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy with weekly paclitaxel plus carboplatin. *Sci Rep*. 2016 Jul 18;6:30091.
 158. Kim T, Han W, Kim MK, Lee JW, Kim J, Ahn SK, et al. Predictive Significance of p53, Ki-67, and Bcl-2 Expression for Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2015;18(1):16.
 159. Polley M-YC, Leung SCY, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Dec 18;105(24):1897–906.
 160. Kraus JA, Beriwal S, Dabbs DJ, Ahrendt GM, McGuire KP, Johnson RR, et al. Predictors of Pathologic Complete Response After Standard Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-negative Breast Carcinoma: *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012 Jul;20(4):334–9.
 161. Bayraktar S, Royce M, Stork-Sloots L, de Snoo F, Glück S. Molecular subtyping predicts pathologic tumor response in early-stage breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus capecitabine with or without trastuzumab chemotherapy. *Med Oncol* [Internet]. 2014 Oct [cited 2017 Feb 18];31(10). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-014-0163-9>
 162. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A, Salat C, Sinn B, Schem C, et al. Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget* [Internet]. 2014 Nov 9 [cited 2017 Jan 29]; Available from: <http://www.oncotarget.com/abstract/11891>
-

-
163. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb 1;26(2):259–71.
 164. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A Comparison of PAM50 Intrinsic Subtyping with Immunohistochemistry and Clinical Prognostic Factors in Tamoxifen-Treated Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5222–32.
 165. Parker J, Prat A, Cheang M, Lenburg M, Paik S, Perou C. Breast Cancer Molecular Subtypes Predict Response to Anthracycline/Taxane-Based Chemotherapy. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24 Supplement):2019–2019.
 166. Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med*. 2015;13:303.
 167. Hoadley K, Hyslop T, Fan C, Berry D, Hahn O, Tolaney S, et al. Abstract PD1-03: Multivariate analysis of subtype and gene expression signatures predictive of pathologic complete response (pCR) in triple-negative breast cancer (TNBC): CALGB 40603 (Alliance). *Cancer Res*. 2017 Feb 15;77(4 Supplement):PD1-03-PD1-03.
 168. Carey LA, Berry DA, Cirincione CT, Barry WT, Pitcher BN, Harris LN, et al. Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Nov 2 [cited 2015 Dec 3]; Available from: <http://jco.ascpubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2015.62.1268>
 169. Prat A, Bianchini G, Thomas M, Belousov A, Cheang MCU, Koehler A, et al. Research-Based PAM50 Subtype Predictor Identifies Higher Responses and Improved Survival Outcomes in HER2-Positive Breast Cancer in the NOAH Study. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):511–21.
 170. Dieci MV, Prat A, Tagliafico E, Paré L, Ficarra G, Bisagni G, et al. Integrated evaluation of PAM50 subtypes and immune modulation of pCR in HER2-positive breast cancer patients treated with chemotherapy and HER2-targeted agents in the CherLOB trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Oct;27(10):1867–73.
 171. Liu MC, Pitcher BN, Mardis ER, Davies SR, Friedman PN, Snider JE, et al. PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance). *Npj Breast Cancer*. 2016 Jan 6;2:15023.
-

-
172. Prat A, Cheang MCU, Galván P, Nuciforo P, Paré L, Adamo B, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncol*. 2016 Oct 1;2(10):1287.
 173. Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med*. 2015;13:303.
 174. Stover DG, Coloff JL, Barry WT, Brugge JS, Winer EP, Selfors LM. The Role of Proliferation in Determining Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Gene Expression-Based Meta-Analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Dec 15;22(24):6039–50.
 175. Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5):R97.
 176. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 May 17;
 177. Palmer C, Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO. Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics*. 2006 May 16;7:115.
 178. Callari M, Cappelletti V, D’Aiuto F, Musella V, Lembo A, Petel F, et al. Subtype-Specific Metagene-Based Prediction of Outcome after Neoadjuvant and Adjuvant Treatment in Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Jan 15;22(2):337–45.
 179. Martínez-Canales S, Cifuentes F, López De Rodas Gregorio M, Serrano-Oviedo L, Galán-Moya EM, Amir E, et al. Transcriptomic immunologic signature associated with favorable clinical outcome in basal-like breast tumors. Perez-Martinez A, editor. *PLOS ONE*. 2017 May 4;12(5):e0175128.
 180. Bonsang-Kitzis H, Sadacca B, Hamy-Petit AS, Moarii M, Pinheiro A, Laurent C, et al. Biological network-driven gene selection identifies a stromal immune module as a key determinant of triple-negative breast carcinoma prognosis. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1061176.
 181. Iglesia MD, Vincent BG, Parker JS, Hoadley KA, Carey LA, Perou CM, et al. Prognostic B-cell Signatures Using mRNA-Seq in Patients with Subtype-Specific Breast and Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Jul 15;20(14):3818–29.
 182. Mahmoud SMA, Lee AHS, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(2):545–53.
-

-
183. Sota Y, Naoi Y, Tsunashima R, Kagara N, Shimazu K, Maruyama N, et al. Construction of novel immune-related signature for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Ann Oncol*. 2014 Jan 1;25(1):100–6.
 184. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In Situ Tumor PD-L1 mRNA Expression Is Associated with Increased TILs and Better Outcome in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014 May 15;20(10):2773–82.
 185. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol*. 2007;8(8):R157.
 186. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2014 Mar 1;25(3):611–8.
 187. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Mar 15;22(6):1499–509.
 188. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Apr 15;14(8):2413–20.
 189. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Feb 3;11(3):215–33.
 190. Nanda R, Chow LQM, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 20;34(21):2460–7.
 191. I-SPY 1 TRIAL Investigators, Magbanua MJM, Wolf DM, Yau C, Davis SE, Crothers J, et al. Serial expression analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy reveals changes in cell cycle and immune pathways associated with recurrence and response. *Breast Cancer Res [Internet]*. 2015 Dec [cited 2017 Apr 8];17(1). Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0582-3>
 192. Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB. Histone gene transcription: a model for responsiveness to an integrated series of regulatory signals mediating cell cycle control and proliferation/differentiation interrelationships. *J Cell Biochem*. 1994 Apr;54(4):393–404.
-

193. Rattray AMJ, Müller B. The control of histone gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug 1;40(4):880–5.
194. Boström P, Söderström M, Palokangas T, Vahlberg T, Collan Y, Carpen O, et al. Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Res Notes.* 2009;2(1):140.
195. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, et al. Cyclin E and Survival in Patients with Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2002 Nov 14;347(20):1566–75.
196. Jiang T, Shi W, Wali VB, Pongor LS, Li C, Lau R, et al. Predictors of Chemosensitivity in Triple Negative Breast Cancer: An Integrated Genomic Analysis. *Ladanyi M, editor. PLOS Med.* 2016 Dec 13;13(12):e1002193.
197. Ignatiadis M, Singhal SK, Desmedt C, Haibe-Kains B, Criscitiello C, Andre F, et al. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2012 Jun 1;30(16):1996–2004.
198. Liedtke C, Hatzis C, Symmans WF, Desmedt C, Haibe-Kains B, Valero V, et al. Genomic grade index is associated with response to chemotherapy in patients with breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Jul 1;27(19):3185–91.
199. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJT, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Feb;119(3):551–8.
200. Hu Z, Fan C, Livasy C, He X, Oh DS, Ewend MG, et al. A compact VEGF signature associated with distant metastases and poor outcomes. *BMC Med.* 2009;7:9.
201. On behalf of the Center for Personalized Cancer Treatment, Lips EH, Michaut M, Hoogstraat M, Mulder L, Besselink NJ, et al. Next generation sequencing of triple negative breast cancer to find predictors for chemotherapy response. *Breast Cancer Res [Internet].* 2015 Dec [cited 2016 Feb 15];17(1). Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/17/1/134>
202. Gonzalez-Angulo AM, Iwamoto T, Liu S, Chen H, Do K-A, Hortobagyi GN, et al. Gene Expression, Molecular Class Changes, and Pathway Analysis after Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2012 Feb 15;18(4):1109–19.
203. Pinto JA, Araujo J, Cardenas NK, Morante Z, Doimi F, Vidaurre T, et al. A prognostic signature based on three-genes expression in triple-negative breast tumours with residual disease. *Npj Genomic Med.* 2016 Feb 3;1:15015.
204. Vukmirovic M, Herazo-Maya JD, Blackmon J, Skodric-Trifunovic V, Jovanovic D, Pavlovic S, et al. Identification and validation of differentially expressed transcripts by RNA-sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) lung tissue from patients with

- Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2017 Dec [cited 2017 Mar 23];17(1). Available from: <http://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-016-0356-4>
205. Kasthuber ER, Huse JT, Berman SH, Pedraza A, Zhang J, Suehara Y, et al. Quantitative assessment of intragenic receptor tyrosine kinase deletions in primary glioblastomas: their prevalence and molecular correlates. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2014 May;127(5):747–59.
206. Smallridge RC, Chindris A-M, Asmann YW, Casler JD, Serie DJ, Reddi HV, et al. RNA Sequencing Identifies Multiple Fusion Transcripts, Differentially Expressed Genes, and Reduced Expression of Immune Function Genes in *BRAF* (V600E) Mutant vs *BRAF* Wild-Type Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Feb;99(2):E338–47.
207. Norton N, Sun Z, Asmann YW, Serie DJ, Necela BM, Bhagwate A, et al. Gene Expression, Single Nucleotide Variant and Fusion Transcript Discovery in Archival Material from Breast Tumors. Dadrás SS, editor. *PLoS ONE*. 2013 Nov 22;8(11):e81925.
208. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S, Gao D, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Jan 16];14(1). Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-177>
209. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics*. 2015 Aug 22;8:54.
210. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordóñez B, et al. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. *BMC Biotechnol*. 2011 May 9;11:46.
211. Chica-Parrado MR, Santonja A, Lluch-Hernández A, Albanell J, Sánchez-Muñoz A, Chacón I, et al. Luminal androgen receptor role and pathological complete response rate to neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2017 Mar 12];27(suppl_6). Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article/2798914/Luminal>
212. Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New Strategies for Triple-Negative Breast Cancer--Deciphering the Heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):782–90.
213. Akashi-Tanaka S, Watanabe C, Takamaru T, Kuwayama T, Ikeda M, Ohyama H, et al. BRCAness Predicts Resistance to Taxane-Containing Regimens in Triple Negative Breast Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Breast Cancer*. 2015 Feb;15(1):80–5.

214. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LF, Wesseling J, vd Vijver MJ, et al. Genomic patterns resembling BRCA1- and BRCA2-mutated breast cancers predict benefit of intensified carboplatin-based chemotherapy. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 Mar 22];16(3). Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3655>
215. Afghahi A, Timms KM, Vinayak S, Jensen KC, Kurian AW, Carlson RW, et al. Tumor BRCA1 Reversion Mutation Arising During Neoadjuvant Platinum-Based Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with Therapy Resistance. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Jan 13;
216. Arun B, Bayraktar S, Liu DD, Gutierrez Barrera AM, Atchley D, Pusztai L, et al. Response to neoadjuvant systemic therapy for breast cancer in BRCA mutation carriers and noncarriers: a single-institution experience. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3739–46.
217. Paluch-Shimon S, Friedman E, Berger R, Papa MZ, Dadiani M, Friedman N, et al. Does pathologic complete response predict for outcome in BRCA mutation carriers with triple-negative breast cancer? In Chicago, USA: *J Clin Oncol* 32, no. 15_suppl (May 2014) 1023-1023.; 2014. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.1023
218. Tanino H, Kosaka Y, Nishimiya H, Tanaka Y, Minatani N, Kikuchi M, et al. BRCAness and Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. Coleman WB, editor. *PLOS ONE*. 2016 Dec 9;11(12):e0165721.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Tabla de genes de PAM50.

ACTR3B	Actin-related protein 3-beta
ANLN	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)
BAG1	BCL2-associated athanogene
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
BLVRA	Biliverdin reductase A
CCNB1	Cyclin B1
CCNE1	Cyclin E1
CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
CDCA1	Cell division cycle associated 1 (S. cerevisiae)
CDH3	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
CENPF	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
CEP55	Chromosome 10 open reading frame 3
CXXC5	CXXC finger 5
EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ESR1	Estrogen receptor 1
EXO1	Exonuclease 1
FGFR4	Fibroblast Growth Factor Receptor 4
FOXA1	Forkhead box A1
FOXC1	Forkhead box C1
GPR160	G protein-coupled receptor 160
GRB7	Growth Factor Receptor Bound Protein 7
KIF2C	Kinesin family member 2C
KNTC2	Kinetochore associated 2
KRT14	Keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)
KRT17	Keratin 17
KRT5	Keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)
MELK	Maternal embryonic leucine zipper kinase
MIA	Melanoma inhibitory activity
MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
MLPH	Melanophilin
MMP11	Matrix Metalloproteinase 11
MYBL2	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NAT1	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
ORC6L	Origin recognition complex, subunit 6 homolog-like (yeast)
PGR	Progesterone receptor
PHGDH	Phosphoglycerate dehydrogenase
PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1
RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SLC39A6	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6

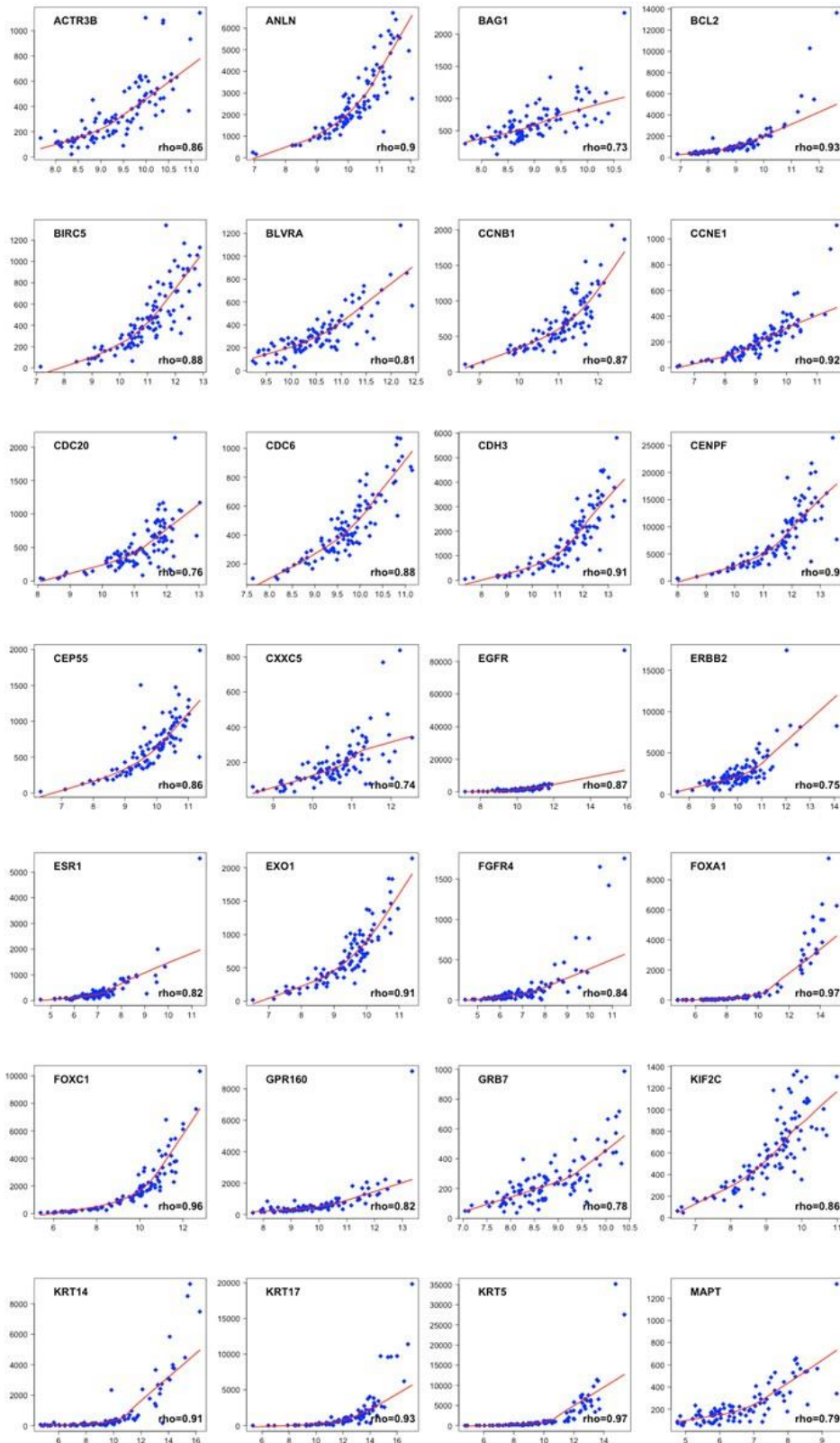
TMEM45B	Transmembrane Protein 45B
TYMS	Thymidylate synthetase
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C
UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)

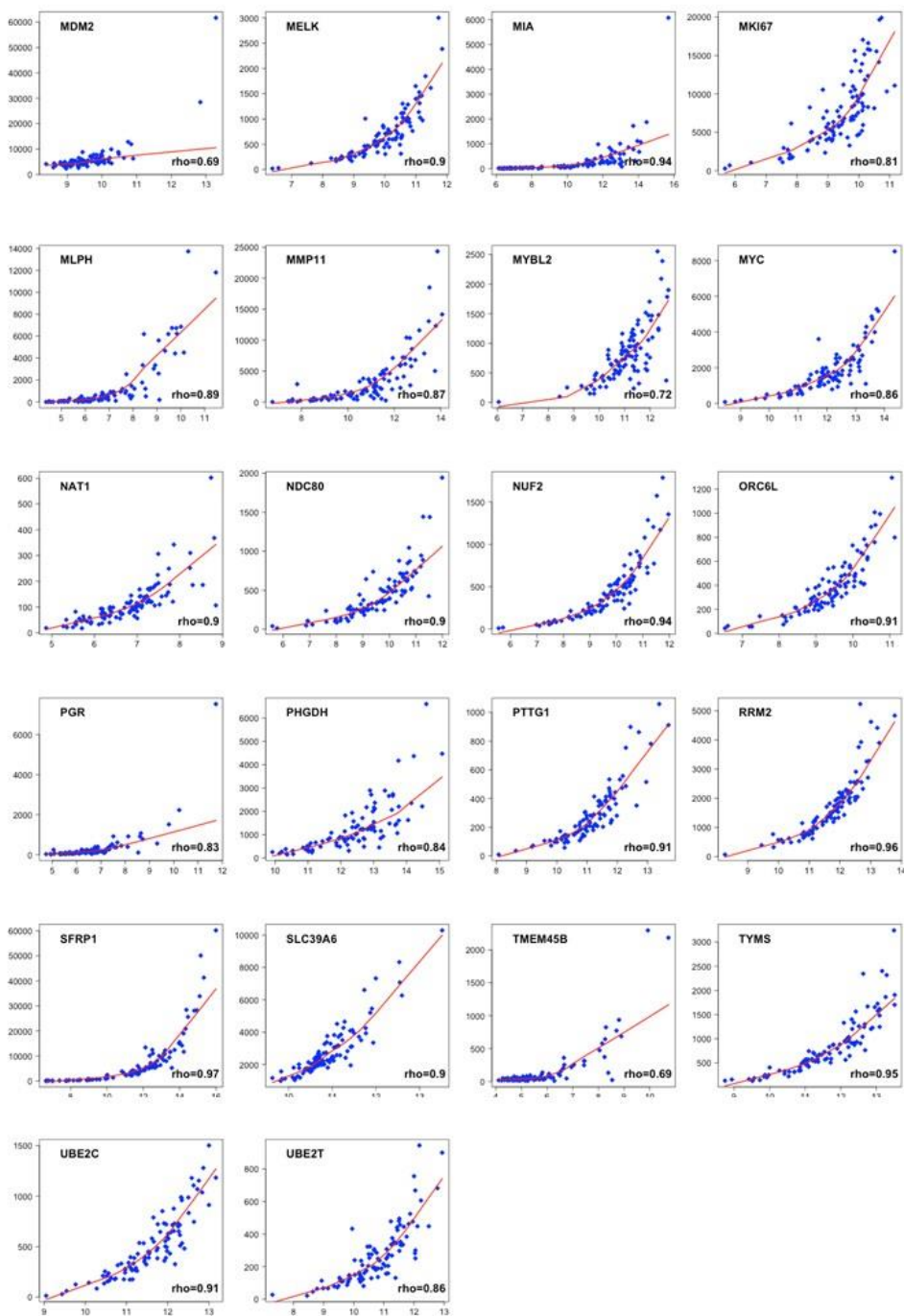
8.2. Vías génicas diferencialmente expresadas entre pacientes con pCR y RD.

	NGenes	Correlation	Direction	PValue	FDR
KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	116	0.01	Up	4.19E-20	7.80E-18
KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	32	0.01	Up	3.97E-13	3.69E-11
KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	32	0.01	Up	2.48E-11	1.54E-09
KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	32	0.01	Up	1.81E-10	8.43E-09
KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	39	0.01	Up	3.46E-10	1.29E-08
KEGG_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY	31	0.01	Up	1.26E-09	3.90E-08
KEGG_DNA_REPLICATION	36	0.01	Up	3.55E-09	9.43E-08
KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	61	0.01	Up	1.07E-08	2.48E-07
KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS	38	0.01	Up	1.22E-08	2.51E-07
KEGG_LEISHMANIA_INFECTION	69	0.01	Up	6.28E-08	1.17E-06
BIOCARTA_TCRA_PATHWAY	11	0.01	Up	4.24E-08	9.20E-06
BIOCARTA_NO2IL12_PATHWAY	17	0.01	Up	1.96E-07	2.12E-05
KEGG_ASTHMA	21	0.01	Up	1.61E-06	2.73E-05
BIOCARTA_CTL_PATHWAY	13	0.01	Up	5.00E-07	3.62E-05
BIOCARTA_THELPER_PATHWAY	12	0.01	Up	3.45E-06	0.00019
BIOCARTA_TCYTOTOXIC_PATHWAY	12	0.01	Up	5.31E-06	0.00023
BIOCARTA_BLYMPHOCYTE_PATHWAY	11	0.01	Up	1.59E-05	0.00050
BIOCARTA_CTLA4_PATHWAY	18	0.01	Up	1.62E-05	0.00050
BIOCARTA_TH1TH2_PATHWAY	17	0.01	Up	1.98E-05	0.00054
BIOCARTA_NKT_PATHWAY	25	0.01	Up	2.23E-05	0.00054
BIOCARTA_IL12_PATHWAY	21	0.01	Up	4.47E-05	0.00097
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	41	0.01	Up	7.87E-05	0.00113
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	169	0.01	Up	8.69E-05	0.00116
KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	97	0.01	Up	0.00014	0.00170
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	102	0.01	Up	0.00015	0.00171
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	124	0.01	Up	0.00017	0.00171
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	65	0.01	Up	0.00018	0.00174
BIOCARTA_DC_PATHWAY	15	0.01	Up	9.40E-05	0.00186
KEGG_CELL_CYCLE	124	0.01	Up	0.00020	0.00189
BIOCARTA_TCAPOPTOSIS_PATHWAY	9	0.01	Up	0.00011	0.00192
KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	104	0.01	Up	0.00022	0.00194
BIOCARTA_ASBCCELL_PATHWAY	10	0.01	Up	0.00012	0.00198
KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	73	0.01	Up	0.00026	0.00211

KEGG_PROTEASOME	42	0.01	Up	0.00033	0.00251
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	208	0.01	Up	0.00034	0.00251
KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	28	0.01	Up	0.00044	0.00314
BIOCARTA_MCM_PATHWAY	18	0.01	Up	0.00021	0.00320
KEGG_SPLICEOSOME	126	0.01	Up	0.00067	0.00445
BIOCARTA_IL2_PATHWAY	21	0.01	Up	0.00034	0.00496
BIOCARTA_IL2RB_PATHWAY	38	0.01	Up	0.00072	0.00971
BIOCARTA_TALL1_PATHWAY	15	0.01	Up	0.00093	0.01185
BIOCARTA_SET_PATHWAY	11	0.01	Up	0.00105	0.01200
BIOCARTA_CSK_PATHWAY	20	0.01	Up	0.00100	0.01200
BIOCARTA_RANMS_PATHWAY	10	0.01	Up	0.00141	0.01527
BIOCARTA_IL5_PATHWAY	7	0.01	Up	0.0017	0.01881
BIOCARTA_GRANULOCYTES_PATHWAY	13	0.01	Up	0.00199	0.01881
BIOCARTA_IL22BP_PATHWAY	15	0.01	Up	0.00197	0.01881
BIOCARTA_SRCRPTP_PATHWAY	11	0.01	Up	0.00253	0.02289
BIOCARTA_IL3_PATHWAY	14	0.01	Up	0.00363	0.03149
BIOCARTA_MONOCYTE_PATHWAY	11	0.01	Up	0.00485	0.04051
BIOCARTA_IL10_PATHWAY	17	0.01	Up	0.00511	0.04104
BIOCARTA_CYTOKINE_PATHWAY	12	0.01	Up	0.00577	0.04474

8.3. Anexo 3. Correlación de genes individuales de PAM0 entre RNAseq y Nanostring.





8.4. Anexo 4. Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral

- "Intrinsic subtype and response to neoadjuvant chemotherapy with carboplatin and docetaxel in triple-negative breast cancer". **I. Echavarría Díaz-Guardamino**, S. López-Tarruella, J. A. García-Sáenz, H. Gómez Moreno, F. Moreno, Y. Jerez, H. Fuentes, I. Márquez-Rodas, M. Cebollero, M. del Monte-Millán, A. Picornell, T. Massarrah, A. Barnadas, A. Prat, A. Ballesteros García, R. Colomer Bosch, B. Peláez, M. González-Rivera, C. M. Perou, M. Martin. ESMO 2016, October 7-11, 2016. Copenhagen, Denmark. Ann Oncol 2016;27:suppl 6-188P.

Envío de comunicaciones a próximos congresos:

Congreso de la Sociedad Europea de Oncología Médica 2017 (ESMO 2017):

- Pathological response in a triple-negative breast cancer cohort treated with neoadjuvant carboplatin and docetaxel according to Lehmann's refined classification (TNBCtype-4). **I. Echavarría Díaz-Guardamino**, A.C. Picornell, S. López-Tarruella, Y. Jerez, K. Hoadley, E. Alvarez, M. del Monte-Millán, J. Gayarre, R. Ramos-Medina, T. Massarrah, I. Ocaña, M. Cebollero, F. Moreno Antón, J.A. García-Saenz, H. Gomez Moreno, H. Fuentes, A.I. Ballesteros Garcia, U. Bohn Sarmiento, C. Perou, M. Martin.
- Breast cancer PAM50 subtypes: correlation between RNA-Seq and multiplexed gene expression platforms. A. C. Picornell, **I. Echavarría Díaz-Guardamino**, E. Alvarez, S. López-Tarruella, Y. Jerez, K. Hoadley, J. Parker, M. del Monte-Millán, R. Ramos-Medina, J. Gayarre, I. Ocañan, M. Cebollero, T. Massarrah, F. Moreno, J. A. García-Sáenz, H. Gómez, A. Ballesteros, M. Ruiz Borrego, C. M. Perou, M. Martin.

Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM 2017):

- "Análisis de expresión génica diferencial tras quimioterapia neoadyuvante con carboplatino y docetaxel en cáncer de mama triple negativo". **Isabel Echavarría Díaz-**

Guardamino, Sara López-Tarruella, Antonio Picornell, Yolanda Jerez, José Ángel García-Sáenz, Fernando Moreno, Enrique Álvarez, María del Monte Millán, Charles M. Perou, Miguel Martin.

ÍNDICE ANALÍTICO

A

andrógenos, 13, 38, 113, 137
 angiogénesis, 137
 antraciclinas, 46, 49, 88, 126, 130, 131, 133, 140, 151, 156
 apocrino, 29, 43, 137
 apoptosis, 41, 52
 AR, 10, 35, 36, 113, 115, 127, 145, 149
 AUC, 18, 19, 22, 23, 62, 84, 91, 92, 93, 98, 101, 125, 126, 127, 136, 155

B

BARD1, 19, 22, 120, 121
 bevacizumab, 48, 50, 88, 132, 133
 BL, 10, 13, 14, 21, 23, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 106, 117, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 149, 158, 163
BL1, 10, 20, 23, 35, 36, 37, 38, 80, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 148, 149, 150, 151, 152, 163
BL2, 10, 20, 23, 35, 36, 38, 80, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 148, 149, 150, 151, 152
 BRCA1, 19, 22, 33, 39, 40, 41, 47, 48, 49, 50, 80, 81, 112, 120, 121, 152, 155, 156
 BRCA2, 19, 22, 33, 39, 40, 80, 81, 120, 121
 BRCAness, 42, 51, 153
 BSGC, 10, 88

C

CALGB40603, 48, 49, 129, 132, 133, 142
 carboplatino, 18, 20, 47, 48, 49, 50, 62, 125, 126, 132, 133, 134, 141, 143, 153, 154, 155, 156, 157, 163
 CD8, 111, 143
 centroides, 13, 14, 73, 74, 80, 98, 99, 100, 106, 107, 108, 136, 147, 163
 ciclina, 33, 145
 ciclo celular, 35, 36, 37, 38, 41, 111, 114, 116, 144, 145
 cisplatino, 50, 151, 153, 155
 citoquinas, 38, 111
 CK, 10, 30, 32, 38
 claudin-low, 31, 34, 37, 52, 74, 94, 129, 130, 131
 complemento, 111, 114, 116
 CTLA4, 113, 141, 189

D

docetaxel, 18, 20, 21, 22, 24, 47, 48, 49, 50, 62, 125, 133, 134, 153, 154, 156, 157, 163

dosis densas, 46, 47, 50, 133, 155, 156

E

EGFR, 127, 129, 188
 ESR1, 79, 116, 149, 188

F

firmas génicas, 51, 115, 136, 140, 141, 144, 145, 146, 158
 FOXA, 145
 FOXP3, 113, 141, 143

G

gemcitabina, 88, 155
 Geparsixto, 50, 52, 142
 grado histológico, 29, 52, 63, 91, 94, 118, 125, 127, 146

H

HER2E, 10, 30, 32, 33, 36, 38, 94, 105, 106, 107, 117, 129, 130, 131, 133, 135, 149
 histonas, 19, 110, 111, 114, 116, 139, 144
 historia familiar, 39, 82, 91, 121
 HLA, 111, 114, 115, 116, 140, 143
 HRD score, 154, 155

I

IM, 10, 35, 36, 37, 38, 80, 142, 149, 152
 índice proliferativo, 37, 38, 51, 82, 87, 91, 93, 127
 inmunoglobulinas, 111, 142
 inmunoterapia, 143
 interleuquinas, 111, 116

K

Ki67, 23, 37, 63, 82, 87, 91, 92, 94, 95, 100, 101, 102, 118, 125, 126, 127

L

lapatinib, 32, 43, 135
LAR, 10, 20, 23, 35, 36, 37, 38, 80, 116, 117, 118, 119, 120, 139, 149, 150, 151
 Lehmann, 10, 11, 13, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 35, 36, 37, 38, 57, 79, 116, 117, 118, 129, 131, 133, 142, 148, 151, 157, 163
 linfocitos B, 52, 111, 140

linfocitos T, 51, 143
 linfocitos T reguladores, 52, 143
 LPBC, 52, 142
LumA, 10, 30, 38, 74, 98, 99, 101, 105, 106, 107, 129
LumB, 11, 30, 74, 105, 107, 129

M

M, 1, 11, 20, 23, 35, 36, 37, 38, 74, 80, 117, 118, 119, 120, 122, 149, 151, 152
 macrófagos, 37, 38, 52, 141
 metagen, 137, 140, 145
 microarrays, 30, 72, 75, 147
MSL, 11, 35, 37, 80, 142, 149, 151, 152
 mutación germinal, 33, 47

N

Nanostring, 13, 14, 18, 19, 22, 23, 56, 71, 73, 90, 94, 105, 106, 107, 108, 147, 163, 191
 natural-killer, 52
 nCounter, 13, 19, 20, 22, 70, 71, 72, 73, 94, 105, 147, 148, 163
 no-BL, 13, 14, 34, 36, 94, 95, 99, 100, 101, 102, 117, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 145, 158

P

paclitaxel, 47, 48, 49, 50, 126, 133, 135, 151
 PALB2, 19, 22, 40, 42, 80, 120, 121
 PAM110, 70, 73, 74, 94
 PAM50, 10, 11, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 55, 56, 71, 73, 74, 79, 83, 94, 97, 99, 100, 102, 105, 106, 107, 115, 116, 117, 122, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 141, 144, 147, 149, 152, 157, 158, 163, 188
 PARP, 11, 41, 50
 PD1, 113, 141
 PD-L1, 141
 predictivo, 14, 18, 20, 44, 52, 84, 92, 99, 101, 126, 127, 128, 131, 135, 136, 142, 146, 150, 155, 156, 157, 158, 163
 proliferación, 19, 30, 32, 35, 38, 125, 137, 144, 145, 157, 163
 pronóstico, 17, 30, 31, 35, 36, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 55, 101, 125, 126, 127, 128, 131, 135, 137, 138, 140, 142, 145, 146, 150, 156, 158

Q

QTNA, 11, 14, 17, 18, 20, 35, 43, 47, 49, 51, 55, 56, 57, 120, 125, 126, 128, 130, 133, 142, 144, 145, 146, 148, 150, 151, 156, 159, 163, 164

R

RAD50, 19, 22, 80, 120, 121
 RAD51C, 19, 22, 42, 80, 120, 121
 RAD51D, 19, 22, 42, 80, 121
 radioterapia, 18, 62, 89
 RCB-III, 44, 45, 56, 64, 83, 88, 89, 90, 91, 95, 96, 97, 99, 101, 102, 103, 114, 115, 119, 120, 121, 131, 138, 163
 recidiva, 30, 32, 45, 51, 52
 recombinación homóloga, 13, 17, 18, 19, 20, 40, 51, 55, 111, 120, 153, 154, 155, 156, 157, 164
 respuesta inmune, 13, 19, 31, 35, 37, 38, 114, 139, 140, 142, 143, 144, 157, 163
 RNAseq, 13, 14, 18, 19, 20, 22, 23, 56, 70, 74, 75, 76, 77, 79, 90, 103, 105, 106, 107, 108, 139, 147, 148, 163, 191
ROR, 11, 13, 56, 74, 97, 98, 99, 100, 102, 107, 135, 136, 163

S

sales de platino, 14, 17, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 126, 151, 153, 154
SLE, 11, 29, 31, 42, 43, 45, 48, 49, 132, 138, 140, 141, 150, 156
 SLED, 12, 39, 43, 136, 140, 143, 147, 156
SLP, 12, 48, 153
SNC, 11, 29

T

Tabla 2. Respuesta a QTNA con esquemas clásicos., 47
 tamaño tumoral, 19, 42, 43, 87, 91, 93, 94, 100, 101, 118, 119, 125, 126, 130
 taxanos, 46, 47, 49, 50, 126, 127, 130, 131, 133, 140, 143, 153, 156
 TCGA, 33, 129, 130, 145
TILs, 12, 52, 127, 139, 141, 142, 158
 TNBCtype-4, 14, 17, 19, 21, 23, 57, 117, 120, 122, 148, 149, 151, 152, 157
 TP53, 33, 41, 92

V

voom, 13, 77, 104

