



# PERFIL GENÉTICO, EPIGENÉTICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN LOS CÁNCERES DE MAMA ESPORÁDICOS Y HEREDITARIOS

TESIS DOCTORAL



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
**Programa de Doctorado de Bioquímica Clínica-Médica e Inmunología**

Rosa M<sup>a</sup> Murria Estal

Directores: Dr. Pascual Bolufer Gilabert  
Dra. Sarai Palanca Suela

Valencia, 2015





**Lafe**  
Hospital  
Universitari  
i Politiènic



Título de la Tesis Doctoral

**Perfil genético, epigenético e inmunohistoquímico en los cánceres de mama esporádicos y hereditarios**

Programa de doctorado  
Bioquímica Clínico-Médica e Inmunología (30-E)

Directores de la Tesis  
Dr. Pascual Bolufer Gilabert  
Dra. Sarai Palanca Suela

Realizada por

Rosa M<sup>a</sup> Murria Estal



**D. PASCUAL BOLUFER GILABERT, Doctor en Medicina y Cirugía, y Jefe de Sección del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.**

**INFORMA:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

**“PERFIL GENÉTICO, EPIGENÉTICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN LOS CÁNCERES DE MAMA ESPORÁDICOS Y HEREDITARIOS”**

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. Rosa M<sup>a</sup> Murria Estal.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 27 de Octubre de dos mil quince.

**Fdo: Dr. Pascual Bolufer Gilabert**



**Dña. SARAI PALANCA SUELA, Doctora por la Universidad de Valencia, y facultativo adjunto del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.**

**INFORMA:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

**“PERFIL GENÉTICO, EPIGENÉTICO E INMUNOHISTOQUÍMICO EN LOS CÁNCERES DE MAMA ESPORÁDICOS Y HEREDITARIOS”**

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. Rosa M<sup>a</sup> Murria Estal.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 27 de Octubre de dos mil quince.

**Fdo: Dra. Sarai Palanca Suela**





## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer a mis directores de tesis el Dr. Pascual Bolufer y la Dra. Sarai Palanca el darme la oportunidad de trabajar con ellos, sus buenos consejos y todo lo que me han enseñado. Es admirable su vocación y dedicación a este trabajo y a todo lo que emprenden.

A los doctores Zaida García, Jose Antonio López, Beatriz Sánchez, Ángel Segura, Isabel Chirivella, Ana Santaballa, Ana García, María José Juan y Jacobo Santamaría por su implicación en este trabajo, y especialmente a Cristina Alenda, Cecilia Egoavil y Javier Seguí por su ayuda en las determinaciones inmunohistoquímicas.

A las chicas de laboratorio de Biología Molecular Inma, Marta y Eva, gracias por vuestra inestimable ayuda. También al resto de miembros del laboratorio, en particular a Gema.

No me puedo olvidar de Sonia, por compartir conmigo los momentos de agobio.

Por último, quiero agradecer a mi familia, a mis padres y mi hermano, el apoyo que siempre me han dado. Y en especial a Fran, simplemente por estar ahí, animándome en los malos momentos y disfrutando de los buenos.

Gracias a todos



La presente tesis doctoral ha sido financiada con la ayuda FIS PI10/00347 concedida por el Instituto de Salud Carlos III, y la ayuda para la contratación de personal de los Contratos de Investigación para Post-residentes del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Convocatoria 2011).



# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Epidemiología del cáncer de mama.....	3
2. Cáncer de mama esporádico y hereditario.....	3
3. Clasificación del cáncer de mama.....	6
3.1. Luminal/RE+.....	7
3.2. HER2.....	8
3.3. Basal-Like.....	10
4. Etiopatogénesis del CM hereditario y esporádico.....	12
4.1. Mutaciones en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	12
4.2. Pérdida de heterocigosidad en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	14
4.3. Variación en el número de copias en el cáncer de mama.....	16
4.4. Alteraciones epigenéticas en cáncer de mama.....	19
4.4.1. Metilación en promotores de genes supresores tumorales.....	19
4.4.2. MicroRNAs como reguladores de la expresión génica....	22
4.4.2.1. MicroRNAs y cáncer de mama.....	23
5. Medicina personalizada en cáncer de mama.....	25
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	37
1. Pacientes y muestras.....	39
2. Circuito de trabajo.....	40
3. Mutaciones en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	42
4. Características demográficas y patológicas de las pacientes estudiadas.....	42
5. Determinaciones inmunohistoquímicas.....	43
6. Extracción de ácidos nucleicos.....	45
6.1. Extracción de ADN.....	45
6.2. Extracción de ARN.....	46
6.3. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos.....	46
7. Estudios moleculares efectuados en ADN.....	47

7.1. Detección de la VNC mediante amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación (MLPA).....	48
7.1.1. Fundamento del método de MLPA.....	48
7.1.2. Protocolo de trabajo y reactivos empleados.....	48
7.1.3. Análisis de fragmentos por electroforesis capilar e interpretación de los resultados.....	49
7.2. Detección de la metilación de promotores mediante amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación sensible a metilación (MS-MLPA).....	50
7.2.1. Fundamento del método de MS-MLPA.....	50
7.2.2. Protocolo de trabajo y reactivos empleados.....	51
7.2.3. Interpretación de los resultados.....	52
8. Expresión de miRs.....	53
8.1. Arrays de expresión de miRs.....	53
8.1.1. Protocolo de trabajo.....	54
8.1.2. Interpretación de los resultados.....	54
8.2. Cuantificación relativa de la expresión de miRs mediante RT-qPCR.....	55
8.2.1. Fundamentos del procedimiento y protocolo de trabajo.....	56
8.2.2. Interpretación de los resultados.....	56
9. Identificación de dianas de miRs.....	57
10. Análisis estadístico.....	58
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>I. Caracterización inmunohistoquímica y molecular de los grupos de estudio.....</b>	<b>63</b>
1. Parámetros Inmunohistoquímicos e Inmunofenotipo.....	63
2. Parámetros Moleculares.....	65
2.1. Variación en el número de copias.....	65
2.2. Metilación de genes supresores tumorales.....	67
<b>II. Expresión de miRs en los grupos de estudio.....</b>	<b>71</b>
1. Estudio de expresión de miRs.....	71
2. Selección y validación de los miRs mediante RT-qPCR.....	76

---

3. Expresión de los miRs seleccionados en los grupos de estudio.....	77
4. Relación de la expresión de miRs con los parámetros inmunohistoquímicos e inmunofenotipo.....	79
<b>III. Perfiles inmunohistoquímico y molecular de los grupos de estudio. Resultados de la regresión logística multinomial con los parámetros seleccionados.....</b>	<b>83</b>
<b>IV. Perfiles inmunohistoquímico y molecular en los CMs TN.....</b>	<b>87</b>
1. Parámetros Inmunohistoquímicos.....	87
2. Parámetros Moleculares.....	88
2.1. Variación en el número de copias.....	88
2.2. Metilación en genes supresores tumorales.....	90
2.3. Expresión de miRs.....	91
3. Perfiles inmunohistoquímico y molecular del CM TN. Resultados de la regresión logística con los parámetros seleccionados.....	92
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
I. Caracterización inmunohistoquímica y molecular de los cánceres de mama esporádico y hereditario.....	97
II. Perfiles inmunohistoquímico y molecular de los cánceres de mama triple negativos.....	111
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>DOCUMENTOS ANEXOS.....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>





# **LISTADO DE ABREVIATURAS**

---



**μL:** microlitro

**ng:** nanogramo

**Amp:** Amplificación

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ADNg:** Ácido desoxirribonucleico genómico

**Arg:** Arginina

**BRCA1:** Breast Cancer Susceptibility Gene 1

**BRCA2:** Breast Cancer Susceptibility Gene 2

**BRCA1/2:** BRCA1 y BRCA2

**BRCAness:** Pérdida de función de los genes BRCA1/2

**BRCAX:** CM sin mutación en BRCA1/2

**CDI:** Carcinoma ductal infiltrante

**CDKs:** Ciclinas dependientes de quinasa

**CLI:** Carcinoma Lobulillar infiltrante

**CI:** Caso índice

**CK:** Citoqueratinas

**CM:** Cáncer de mama

**CMB:** Cáncer de mama bilateral

**CME:** Cáncer de mama esporádico

**CMH:** Cáncer de mama hereditario

**CMOH:** Cáncer de mama y ovario hereditario

**CO:** Cáncer de ovario

**CT:** Carboxiterminal

**CV:** Comunidad Valenciana

**DAB:** Diaminobencidina

**DSBs:** Roturas en la doble cadena de ADN

**DT:** Desviación típica

**EC:** Electroforesis capilar

**FANCF:** Fanconi F

**FFPE:** Tejido tumoral incluido en parafina

**FISH:** Hibridación in situ fluorescente

**FT:** Factores de transcripción

**GH:** Grado histológico

**h:** horas

**HRM:** High Resolution Melting

**HDAC2:** Histona desacetilasa 2

**IC:** Intervalo de confianza

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**LGR:** Grandes reordenamientos genómicos

**LOH:** Pérdida de heterocigosidad

**Min:** minutos

**M:** Presencia de metástasis

**MREs:** Elementos de Reconocimiento de microRNAs

**MicroRNA:** miR

**MLPA:** Amplificación múltiple mediante sonda dependiente de ligación

**Mut:** mutación

**MS-MLPA:** Amplificación múltiple mediante sonda dependiente de ligación sensible a metilación

**N:** Afectación ganglionar

**NT:** Aminoterminal

**NCCN:** National Comprehensive Cancer Network

**NGS:** Secuenciación de última generación

**NHEJ:** Non-homologous end-joining

**OM:** Oncología Médica

**ON:** Óxido nítrico

**PARP:** Poli-ADP-ribosa polimerasa

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PCGCCV:** Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa

**qPCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa

**RB1:** Retinoblastoma

**RE:** Receptores de estrógeno

**RH:** Recombinación homóloga

**RP:** Receptores de progesterona

**RT:** Transcripción reversa

**SNPs:** Polimorfismos de un solo nucleótido

**sPLS-DA:** Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis

**T:** Tamaño tumoral

**TCGA:** Atlas del Genoma del Cáncer

**TN:** Triple negativo

**TE:** Tris Edta

**UCGC:** Unidades de Consejo Genético en Cáncer

**VNC:** Variación del número de copias



Rosa Vacas



# INTRODUCCIÓN

---





## 1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es el tumor más frecuente en la población femenina, siendo la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. El CM en España presenta una incidencia de unos 26,000 nuevos casos, representando entre el 20-30% de los tumores femeninos en nuestro país<sup>1</sup>. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y 80 años, con un máximo entre los 45 y 65<sup>2</sup> años, y solo un 6% se diagnostican antes de los 35 años<sup>3</sup>.

La tasa de mortalidad por CM es de las más bajas de Europa. En 2012 la tasa global española se situó en 16,7 fallecimientos por cada cien mil habitantes, con una tasa mínima en Soria (11,5) y máxima en Badajoz (25,1). En la Comunidad Valenciana, la tasa de mortalidad se sitúa en torno a la media española con tasas de 15,9, 17,0 y 16,7, para las provincias de Castellón, Valencia y Alicante respectivamente<sup>4</sup>. La edad media de defunción por CM en la población española se sitúa en 67,48 años, muy próxima a la media valenciana, situada en 67,41 años<sup>4</sup>.

A pesar del incremento anual de 1-2% observado en la tasa de incidencia de CM en la población española<sup>2</sup>, desde los años 90 se advierte una reducción progresiva en la tasa de mortalidad<sup>4</sup>, principalmente debido a la implantación de programas de cribado de CM, avances en el diagnóstico, disminución en el empleo de terapia hormonal sustitutiva e instauración de tratamientos más efectivos basados en las características específicas del tumor<sup>1</sup>.

## 2. Cáncer de mama esporádico y hereditario

El CM es una enfermedad heterogénea y, en la mayoría de los casos, de etiología desconocida<sup>5</sup>. Se han descrito numerosos factores de riesgo

asociados con la aparición y desarrollo de la enfermedad, siendo los más importantes el sexo femenino, la edad y la historia familiar<sup>6</sup>.

Se estima que un 90% de los CMs son de naturaleza esporádica y el 10% restante se asocia con un componente hereditario que tiene un patrón de herencia autosómica dominante<sup>7</sup>.

En 1866, Paul Broca fue el primero en describir una familia con una alta prevalencia de CM<sup>8</sup>. Su esposa sufrió CM a una edad temprana, encontrando miembros afectados por CM en cuatro generaciones. El informe "Broca"<sup>8</sup> fue el primero en señalar que el CM puede heredarse transmitiéndose entre varias generaciones.

Actualmente se sabe que la presencia de antecedentes familiares de CM es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad<sup>9</sup>. El componente genético de la enfermedad se refleja en una tendencia a agruparse en ciertas familias<sup>10</sup> y la predisposición a desarrollar el tumor incrementa progresivamente con el número de familiares afectados<sup>9</sup>.

Las variantes genéticas asociadas con el riesgo de CM pueden ser clasificadas según su penetrancia. Las mutaciones detectadas se han catalogado como **mutaciones de alta penetrancia**, que son poco frecuentes en la población, pero se asocian con un riesgo muy alto. La presencia de mutaciones en línea germinal en el gen *BRCA1* confiere un riesgo del 65% y 39% de desarrollo de CM y cáncer de ovario (CO), respectivamente<sup>11</sup>. Mientras que las mutaciones en *BRCA2* confieren un riesgo menor, del 45% para el CM, y del 11% para el CO<sup>11</sup>. Las mutaciones en *BRCA2* en varones además de conferir riesgo de CM también incrementan el riesgo de cáncer de próstata de aparición en edad temprana y de cáncer de páncreas<sup>12</sup>. En su conjunto las

mutaciones en estos dos genes explican entre el 30-70% de los CMs familiares<sup>13</sup>. No obstante, existen otros casos de CM familiar asociados con síndromes poco frecuentes, como Li-Fraumeni, Cowden o Peutz-Jeghers, y que están causados por mutaciones en otros genes de alta penetrancia como *TP53*, *PTEN* o *LKB1-STK11*, respectivamente<sup>9,15</sup>.

En los últimos años, con el desarrollo de tecnologías de secuenciación de última generación (NGS) se han identificado otros *loci* de susceptibilidad genética al CM<sup>14</sup>. Las **variantes de penetrancia moderada**, confieren aumentos moderados en el riesgo y entre ellas se incluyen mutaciones en genes implicados en la reparación del ADN (*ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2* y *RAD50*). Asimismo, se han identificado **polimorfismos de baja penetrancia** (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), que son comunes y se asocian con un aumento discreto del riesgo<sup>15</sup>, detectándose en los genes *FGFR2*, *TNRC9*, *LSP1*, *MAP3K1*, *TGFB1* y en regiones intergénicas (*rs13387042* en 2q35, *rs313281615* en 8q24 y *rs10941679* en 5p12)<sup>16</sup>. Algunos de estos polimorfismos se conoce que pueden actuar como modificadores del riesgo en portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*<sup>17</sup>. Tal es el caso del polimorfismo D302H en el gen *CASPASA8* que disminuye el riesgo conferido por la presencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*<sup>18</sup>. Sin embargo, estos estudios sugieren que gran parte del componente genético del riesgo de CM está sin caracterizar<sup>19,14</sup>.

En la inmensa mayoría de los CMs no se encuentran alteraciones genéticas asociadas a la transmisión hereditaria de la enfermedad, son de naturaleza esporádica. La etiopatogénesis de estos tumores se explica por la acumulación gradual de mutaciones activadoras en oncogenes implicados en el desarrollo del CM esporádico (CME) entre las que destacan *MYC*, *CCND1* y

*ERBB2* que a menudo se acompañan de la inactivación de genes supresores entre los que destacan *BRCA1* y *BRCA2*<sup>20</sup>.

El perfil clínico de los CMs hereditarios difiere de los CMEs. Los primeros suelen presentar una edad de aparición más temprana, bilateralidad, alto grado histológico e índices de proliferación celular elevados; características asociadas con una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico<sup>21</sup>.

### **3. Clasificación del cáncer de mama**

El CM es una enfermedad heterogénea tanto a nivel molecular como histológico, mostrando los distintos subtipos diferencias en sus características morfológicas, comportamiento clínico y respuesta a tratamientos específicos<sup>22</sup>.

Tradicionalmente el pronóstico del CM y su indicación terapéutica se ha basado en la clasificación TNM. Sin embargo, esta clasificación no es adecuada para la aplicación de una medicina personalizada acorde a las posibilidades terapéuticas actuales<sup>23</sup>. Así, se ha observado que tumores morfológicamente similares presentan patrones evolutivos y respuesta a tratamientos muy diferentes<sup>24</sup>. Este hecho puede deberse a que CMs con el mismo patrón morfológico presentan perfiles moleculares diferentes<sup>22</sup>.

En los últimos años el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento que integran el análisis del genoma, exoma, metiloma y proteoma, ha permitido identificar subtipos moleculares con patrones de expresión génica diferente, así como marcadores moleculares que pueden ser dianas terapéuticas<sup>25,26</sup>. Esta clasificación molecular se ajusta más que la histopatológica convencional en la predicción de respuesta a diferentes

tratamientos, y en la selección de terapias más específicas y eficaces que la quimioterapia convencional, a la vez que contribuye a reducir la toxicidad<sup>27</sup>.

En el año 2012, el gran consorcio de grupos de estudio del Atlas del Genoma del Cáncer [*The Cancer Genome Atlas (TCGA)*]<sup>28</sup>, recopiló datos de 825 CMEs e integró la información obtenida de plataformas de secuenciación de exomas y microRNAs (miRs), y de arrays genómicos, de metilación, de RNAm, y de proteínas en fase reversa. Al combinar toda esta información se identificaron cuatro subtipos moleculares de CM, (*Luminal A, Luminal B, Her2* y *Basal-like*) que muestran diferentes patrones de expresión inmunohistoquímica, anomalías genéticas y epigenéticas (Tabla 1). Esta clasificación corrobora la gran heterogeneidad molecular del CM, no sólo entre grupos establecidos sino también dentro de los mismos y plantea su relevancia para establecer tratamientos individualizados acorde con las opciones terapéuticas propias de cada grupo.

### **3.1. Luminal/RE+**

La clasificación inmunofenotípica de este grupo se basa en la expresión de receptores hormonales y marcadores inmunohistoquímicos (IHQs) del epitelio luminal, citoqueratinas 8 y 18<sup>29</sup>.

Los CMs Luminal/RE+ son los más heterogéneos en términos de expresión génica, espectro de mutaciones, variación en el número de copias (VNC) y pronóstico de las pacientes. Este grupo presenta el mayor número de genes mutados, siendo muy comunes las mutaciones en *PIK3CA*<sup>30,31</sup>. Una de las características más destacadas es la elevada expresión de las proteínas ESR1, GATA3, FOXA1, XBP1 y MYB<sup>28</sup>.

En este grupo se distinguen los subgrupos Luminal A y Luminal B que muestran diferencias en la inactivación de la vía de TP53. En la mayoría de los CMs Luminal A la vía TP53 permanece activa, mientras que suele estar inactivada en los Luminal B, presentando los CMs Luminal A menor frecuencia de mutaciones en *TP53* que los Luminal B (12% versus 32%; Tabla 1)<sup>28</sup>.

También se observan diferencias entre ambos subtipos en la vía del Retinoblastoma (RB1), presentando los CMs Luminal B más frecuentemente amplificación del oncogén *CCND1*<sup>32</sup> (29% vs 58%; Tabla 1), además se encuentra mayor expresión de la proteína RB1 en los CMs Luminal A<sup>28</sup>.

En cuanto a las alteraciones epigenéticas, se observa mayor incidencia de metilaciones en los CMs Luminal B<sup>28,33</sup>.

El fenotipo Luminal A presenta un mejor pronóstico ya que suele mantener la actividad de genes supresores tumorales tan relevantes como *RB1* y *TP53*, en tanto que el Luminal B presenta mayor proliferación y peor pronóstico<sup>34</sup>. A nivel clínico, la característica diferencial de los fenotipos luminales es la expresión de receptores hormonales. El bloqueo de esta diana y de su cascada molecular con antiestrógenos, como el Tamoxifeno, así como el bloqueo de la producción de estradiol mediante inhibidores de la Aromatasa, son tratamientos indicados en este grupo de tumores<sup>29</sup>.

### **3.2. HER2**

Este subtipo se caracteriza por la amplificación del gen *ERBB2* que codifica para el receptor HER2, detectado en el 25-30% de los CMs ductales

**Tabla 1.** Características inmunohistoquímicas y genómicas de los subtipos de C

SUBTIPO	LUMINAL A	LUMINAL B	BASAL-LIKE	HER2
<b>RE<sup>+</sup>/HER<sup>-</sup> (%)</b>	87	82	10	20
<b>HER2<sup>+</sup> (%)</b>	7	15	2	68
<b>RE<sup>-</sup>/RP<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup></b>	2	1	80	9
<b>Vía TP53</b>	<i>TP53</i> mut (12%); Ganancia <i>MDM2</i> (14%)	<i>TP53</i> mut (32%); Ganancia <i>MDM2</i> (31%)	<i>TP53</i> mut (84%); Ganancia <i>MDM2</i> (14%)	<i>TP53</i> mut (75%); Ganancia <i>MDM2</i> (30%)
<b>Vía PIK3CA/PTEN</b>	<i>PIK3CA</i> mut (49%); <i>PTEN</i> mut/pérdida (13%); <i>INPP4B</i> pérdida (9%)	<i>PIK3CA</i> mut (32%); <i>PTEN</i> mut/pérdida (24%); <i>INPP4B</i> pérdida (16%)	<i>PIK3CA</i> mut (7%); <i>PTEN</i> mut/pérdida (35%); <i>INPP4B</i> pérdida (30%)	<i>PIK3CA</i> mut (42%); <i>PTEN</i> mut/pérdida (19%); <i>INPP4B</i> pérdida (30%)
<b>Vía Retinoblastoma</b>	Ciclina D1 Amp (29%); <i>CDK4</i> Ganancia (14%); Baja expresión de <i>CDKN2C</i> ; Alta expresión de <i>RB1</i>	Ciclina D1 Amp (58%); <i>CDK4</i> Ganancia (25%)	<i>RB1</i> mut/pérdida (20%); Ciclina E1 Amp (9%); Alta expresión de <i>CDKN2A</i> ; Baja expresión de <i>RB1</i>	Ciclina D1 Amp (38%); <i>CDK4</i> Ganancia (24%)
<b>Expresión ARNm</b>	ER cluster; baja proliferación	ER cluster; alta proliferación	Perfil basal; alta proliferación	Perfil HER2; alta proliferación
<b>Análisis VNC</b>	Dipodía frecuente; Ganancias 1q, 8q y 8p11; Pérdidas 8p y 16q; amp 11q13.3 (24%)	Aneuploidía frecuente; Ganancias 1q, 8q y 8p11; Pérdidas 8p y 16q; amp 11q13.3 (51%) y 8p11.23 (28%)	Aneuploidía frecuente; Inestabilidad genómica; Ganancias en 1q y 10p; Pérdidas en 8p y 5q; Ganancias en <i>MYC</i> (40%)	Aneuploidía frecuente; Inestabilidad genómica; Ganancias en 1q y 8q; Pérdidas en 8p; amp <i>ERBB2</i> (71%)
<b>Mutaciones</b>	<i>PIK3CA</i> (49%) <i>GATA</i> (14%) <i>MAP3K1</i> (14%) <i>TP53</i> (12%)	<i>PIK3CA</i> (32%) <i>TP53</i> (32%) <i>MAP3K1</i> (5%)	<i>TP53</i> (84%) <i>PIK3CA</i> (7%)	<i>TP53</i> (75%) <i>PIK3CA</i> (42%) <i>PIK3R1</i> (8%)
<b>Metilación ADN</b>	-	Hipermetilado un subgrupo	Hipometilado	-
<b>Expresión proteica</b>	Alta expresión de estrógenos y MYB	Baja expresión de estrógenos y alta de FOXM1 y MYC	Alta expresión de proteínas de reparación ADN, PTEN e INPP4B; Pérdida de pAKT	Alta expresión de HER2 y EGFR

Porcentajes calculados sobre 466 tumores; mut: mutación; amp: amplificación.

Tomado de The Cancer Genome Atlas Network (2012)<sup>28</sup>.

invasivos<sup>35</sup>. La presencia del receptor en la superficie de las células tumorales se puede detectar mediante procedimientos IHQs y confirmarse mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) del oncogén *ERBB2*<sup>36</sup>.

Este subtipo presenta dos patrones de expresión claramente diferenciados. En el 50% de estos tumores la amplificación de *ERBB2* se acompaña de la sobreexpresión de múltiples genes localizados en regiones cromosómicas cercanas, mayor expresión de los receptores tirosina quinasa FGFR4 y EGFR, así como mayor frecuencia de mutación en *TP53* y *PIK3CA*, y amplificación de *CDK4* y *CCND1*<sup>28</sup> (Tabla 1). Sin embargo, el resto de tumores HER2+ presentan patrones de expresión propios de los subtipos luminales (elevada expresión de los genes *GATA3* y *ESR1*, y baja tasa de mutaciones en *TP53*)<sup>28</sup>.

La sobreexpresión de ERBB2 activa múltiples vías de señalización que promueven la proliferación celular, la supervivencia, invasión y metástasis. Todo ello confiere a este subgrupo de tumores una gran agresividad y un mal pronóstico clínico<sup>37</sup>. Asimismo la sobreexpresión de HER2 es la diana terapéutica de los tratamientos con Trastuzumab y Lapatinib, entre otros<sup>38</sup>.

### **3.3. Basal-Like**

Los tumores incluidos en este grupo presentan un patrón de expresión característico de las células del epitelio basal de la mama que consiste en la expresión elevada de citoqueratinas basales (5/6, 14 y 17), p-Cadherina y Caveolina1<sup>39</sup>. Este subgrupo representa el 15% de los CMs, mostrando un comportamiento muy agresivo<sup>40</sup>. Suele tratarse de tumores de gran tamaño, indiferenciados, con afectación ganglionar y de presentación temprana. Morfológicamente se caracterizan por presentar elevado índice mitótico,



necrosis tumoral e infiltrado linfocitario. Estos tumores han cobrado un destacado interés a raíz de estudios moleculares en arrays de expresión desarrollados en la última década<sup>25,26</sup>. Suele tratarse de tumores triples negativos (TN) para la expresión de RE, RP y HER2. Sin embargo, solo el 75% de los CMs TN presentan patrones de expresión basal-like mientras que el 25% restante presentan otros patrones de expresión<sup>41</sup>.

A nivel molecular los CMs basal-like se caracterizan por la elevada expresión de los genes *FOXM1* y *MYC*, asociados con proliferación celular<sup>28</sup>. Otro rasgo característico de este grupo es la elevada prevalencia de mutaciones en *TP53* y, en menor medida, en *PIK3CA*. Asimismo un 20% de los tumores presentan mutaciones somáticas o germinales en *BRCA1* o *BRCA2*, hecho que conferiría sensibilidad al tratamiento con inhibidores de Poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP)<sup>28</sup>. Estos tumores son altamente proliferativos, presentan niveles altos de aneuploidia, gran número de traslocaciones y pérdidas cromosómicas, debido en gran medida a la inestabilidad cromosómica que generan las mutaciones en los genes *RB1*, *P53* y *BRCA1*<sup>31,41</sup>.

Este grupo de pacientes carece de tratamientos específicos, siendo la quimioterapia el único tratamiento disponible, y desafortunadamente, el nivel de respuesta patológica completa solo se alcanza en el 20% de las pacientes<sup>22,29</sup>. En estos casos la identificación de CMs portadores de mutaciones en los genes *BRCAs*, que se detecta en el 15-20% de los CMs TN, podría ayudar a la selección de pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de PARP. De hecho, la presencia del inmunofenotipo TN es actualmente uno de los criterios incluidos en la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guideline* del año 2014<sup>42</sup>, y también se incluirá en breve en la guía de consejo genético de la Comunidad

Valenciana<sup>43</sup>. Igualmente la presencia de mutaciones en *PIK3CA* o la pérdida de *PTEN* posibilitaría el empleo de fármacos inhibidores de la ruta *PIK3CA*<sup>28</sup>.

### **4. Etiopatogénesis del CM hereditario y esporádico**

El CM es una patología multifactorial caracterizada por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas. La mejor comprensión de los mecanismos que intervienen en el desarrollo del cáncer está teniendo un importante papel en el diagnóstico, pronóstico y en el diseño de nuevas estrategias de tratamiento en CM<sup>44</sup>.

#### **4.1. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2***

Los estudios de ligamiento realizados en la década de 1990 mostraron que las mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* confieren un alto riesgo de desarrollo de CM y CO<sup>45,46,47</sup>. Como se ha comentado, las familias que agregan un porcentaje elevado de estos tumores suelen presentar una mayor incidencia de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* que los que carecen de historia familiar<sup>48</sup>.

Los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan como rasgo característico la elevada incidencia de CM TN<sup>49</sup>. Por el contrario, los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA2* presentan características similares a los CMEs.

La mayoría de las mutaciones encontradas en *BRCA1* o *BRCA2* son sustituciones o pequeñas deleciones e inserciones, y en menor medida, grandes reordenamientos<sup>50</sup>, que conllevan a la traducción de una proteína truncada no funcional, causante de una disfunción de la proteína codificada por el gen afecto.

Las proteínas codificadas por los genes *BRCA1* y *BRCA2* están implicadas en múltiples procesos celulares entre los que destaca la reparación de lesiones en la doble cadena de ADN (DSB) y la regulación de la transcripción y del control del ciclo celular<sup>7,51</sup>. Desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad genómica, tal como sugiere la inestabilidad cromosómica observada en células haploinsuficientes en *BRCA1* o *BRCA2*<sup>52,53</sup>. Este hecho se debe a que participan en el mecanismo de reparación de lesiones en el ADN llamado Recombinación Homóloga (RH)<sup>54</sup>. Se trata de un proceso muy fiable y exento de errores, en el que las hebras dañadas son reparadas tomando como molde la secuencia de ADN homóloga contenida en la cromátida hermana<sup>55</sup>. Existen otros mecanismos reparadores, como es la unión de extremos no homólogos (NHEJ), pero a diferencia de la RH este es un mecanismo no exento de errores<sup>54</sup>.

Las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* junto con *RAD51* co-localizan en los lugares de la lesión. La función de *BRCA1* en el mecanismo de RH parece limitarse a la etapa inicial del proceso, resultando imprescindible para la localización y señalización de los lugares de lesión<sup>7</sup>. *BRCA1* interactúa con el complejo proteico *MRE11/RAD50/Nbs1*, regulando la generación o persistencia de ADN de simple cadena (ADNsc) necesario para iniciar la RH<sup>7,56</sup>.

*BRCA2* tiene un papel más directo en el mecanismo de reparación, relacionado con la ejecución del proceso reclutando nuevas moléculas de *RAD51* en el punto de lesión a través de su interacción con el dominio *BRCT*<sup>57</sup>. *RAD51* tiene una actividad catalítica central en el proceso de RH, recubre el ADNsc lesionado formando filamentos nucleoproteicos que median el emparejamiento homólogo de las hebras dañadas<sup>7</sup>. *BRCA2*, a través de su extremo CT, también media la estabilización de estos filamentos

nucleoproteicos<sup>58</sup>. Finalmente BRCA2 por su extremo NT interacciona con la proteína PALB2, interacción que es necesaria para que se acumulen las proteínas BRCA2 y RAD51 en el punto de rotura<sup>59</sup>.

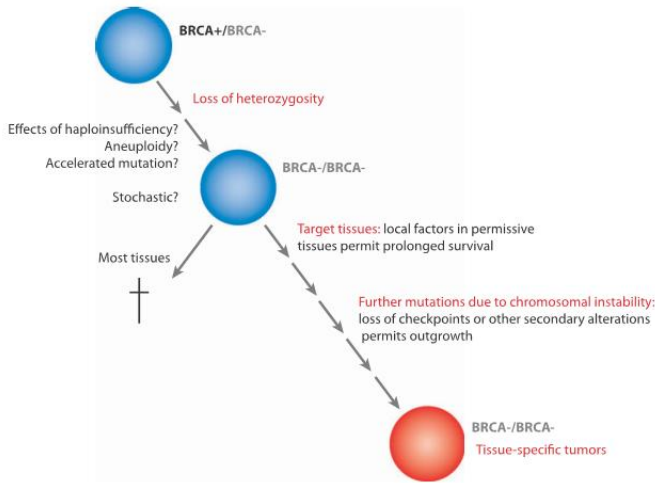
En el CME la inactivación de *BRCA1* y *BRCA2* debido a mutaciones es un evento raro<sup>60</sup>. Sin embargo, la disminución en los niveles de expresión de *BRCA1* en los CMEs es un hecho común, que se corresponde con características más agresivas de la enfermedad<sup>61</sup>, y que puede llegar a alcanzar la pérdida total de la proteína BRCA1 hasta en un 20% de CMEs<sup>62</sup>. En estos casos la pérdida de función de *BRCA1* se debe a otros mecanismos, principalmente la hipermetilación de su promotor<sup>63</sup>.

### **4.2. Pérdida de heterocigosidad en los genes *BRCA1* y *BRCA2***

En las pacientes portadoras de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* en línea germinal, la pérdida del alelo no mutado, pérdida de heterocigosidad (LOH), es el mecanismo de inactivación del gen más común a nivel somático<sup>64</sup>. Portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan LOH en hasta el 90% de los casos<sup>65</sup>. A este respecto, la hipótesis de Knudson<sup>66</sup> postula que el proceso de carcinogénesis requiere dos eventos independientes, el primero serían las mutaciones heredadas en *BRCA1* o *BRCA2* presentes en las células germinales, y el segundo sería la inactivación del alelo sano del gen mediante el mecanismo de LOH. Ante esta situación, las células afectadas entrarían en apoptosis, sin embargo el tejido mamario y el ovario al estar sometidos a estímulos hormonales proliferativos intensos podrían escapar al mecanismo de apoptosis y continuar dividiéndose, acumulando mayor inestabilidad cromosómica, que al no poder ser reparada induciría a la transformación tumoral<sup>56</sup> (Figura 1).

En los CMEs la LOH es un fenómeno menos frecuente que en los CMs hereditarios<sup>67</sup>, encontrándose LOH en *BRCA1* en el 32-38% de los CMEs invasivos ductales y 21-42% de los invasivos lobulillares; la LOH en *BRCA2* se ha descrito en el 30-38% de los CMEs invasivos ductales y entre 17-39% de los invasivos lobulillares, sin que se haya observado en tumores benignos de mama<sup>67</sup>.

En los CMEs, los dos eventos de Knudson se producirían en las células somáticas del tejido mamario. En *BRCA1*, la metilación en el promotor de un alelo se acompaña frecuentemente de la LOH del otro alelo<sup>68</sup>. Mientras que en *BRCA2*, otro mecanismo que provoca su inactivación es la amplificación de *EMSY*, detectada en el 13% de los CMEs y asociada con mal pronóstico, especialmente en CMs con nódulos linfáticos negativos<sup>69</sup>. La proteína codificada por *EMSY* interacciona con el exón 3 de *BRCA2* que está implicado en su regulación transcripcional, de manera que cuando *EMSY* está sobreexpresado inhibe la transcripción de *BRCA2*<sup>68</sup>.



**Figura 1. Modelo de carcinogénesis del CM hereditario del basado en la hipótesis de Knudson.** En azul se señalan las células precancerosas y en rojo las cancerosas. Tomado de Venkitaraman (2009)<sup>56</sup>

### 4.3. Variación en el número de copias en el cáncer de mama

Las variaciones en el número de copias (VNC) de genes en las células tumorales son un mecanismo importante para la activación de oncogenes y un punto clave en el desarrollo y progresión del CM<sup>70</sup>. Estas alteraciones pueden ser de utilidad como biomarcadores pronósticos, siendo algunos de ellos dianas terapéuticas<sup>71</sup>. Entre los genes que más frecuentemente muestran VNC en CM cabe destacar *ERBB2*<sup>72</sup>, *AURKA*<sup>73</sup>, *EGFR*<sup>74</sup>, *CCND1*<sup>75</sup>, *FGFR1*<sup>76</sup>, *TOP2A*<sup>77, 78</sup>, *ESR1*<sup>79</sup> y *MYC*<sup>80</sup>; todos ellos con implicaciones pronósticas y terapéuticas<sup>71</sup>.

La amplificación del oncogén *ERBB2*, detectada entre 15-30% de los CMs, se asocia con grados histológicos avanzados, ausencia de expresión de receptores hormonales, y baja supervivencia. Relacionándose además con resistencia a la quimioterapia en adyuvancia con tamoxifeno<sup>71</sup>. No obstante, a

pesar del mal pronóstico que otorga la presencia de *ERBB2*, presenta la ventaja de ser diana terapéutica del tratamiento con trastuzumab<sup>81</sup>.

La proteína AURKA es una serina/treonina quinasa que participa en la mitosis y en la meiosis, regula la participación de BRCA1 en la transición G2-M del ciclo celular<sup>82</sup> y participa en el proceso de reparación de lesiones en la doble cadena de ADN<sup>83</sup>. Las alteraciones de *AURKA*, principalmente amplificaciones, se han detectado en el 21% de los CMEs<sup>84</sup>, y en el 33% en los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA2*<sup>85</sup>. Su sobreexpresión provoca una segregación cromosómica anormal generando aneuploidia y predisposición al cáncer, asociándose con mal pronóstico en CMs RE positivo<sup>73</sup>. Las VNC de *AURKA* alteran la vía de la RH a través de la inhibición de RAD51 y la hipoxpresión de *BRCA2*, lo que confiere una mayor sensibilidad a inhibidores del PARP, tal como se ha comprobado en estudios experimentales efectuados en ratones<sup>83</sup>.

El gen *EGFR* codifica un receptor transmembrana que presenta actividad tirosina quinasa<sup>74</sup>. El 80% de los CMs TN presentan hiperexpresión del receptor<sup>86,87</sup>. La amplificación del gen, uno de los mecanismos que conduce a la sobreexpresión de la proteína, ha sido reportada en hasta el 25% de los CMs TN<sup>88</sup>, mientras que en el resto de inmunofenotipos esta prevalencia se sitúa entre 0.8%-14.0%<sup>89,90</sup>. La amplificación de *EGFR* se asocia con tumores de mayor tamaño, escasamente diferenciados y mal pronóstico clínico<sup>88</sup>. Este grupo de pacientes pueden ser candidatos a tratamientos específicos anti-EGFR, entre los que se incluyen inhibidores tirosina quinasa y anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor<sup>87,74</sup>.

El gen *CCND1* codifica la proteína Ciclina D1, implicada en la transición de G1-S del ciclo celular<sup>75</sup>. Ciclina D1 es una de las proteínas más comúnmente

hiperexpresada en CM, con un prevalencia de entre 40-90%<sup>91</sup>, aunque esta sobreexpresión no siempre es secundaria a la amplificación del gen, encontrada en el 5-20% de los CMs<sup>91</sup>. La amplificación se asocia con la expresión de RE<sup>91</sup>, y es un factor de mal pronóstico en pacientes postmenopáusicas tratadas con Anastrozol o Tamoxifeno<sup>92</sup>.

La amplificación de *FGFR1* se ha reportado en el 10-15% de los CMs<sup>93</sup>, siendo el subtipo Luminal B el que presenta una mayor prevalencia, entre 16-27%<sup>76</sup>. Las deleciones del gen se han descrito en aproximadamente el 10% de los CMs<sup>90</sup>. Tanto las amplificaciones como las deleciones del gen se asocian con elevadas tasas de proliferación y un mal pronóstico<sup>76,90</sup>.

La amplificación de *TOP2A* se ha encontrado en el 30-90% de los CMs que presentan *ERBB2* amplificado y solamente en el 3-8% de los tumores que no presentan amplificación de *ERBB2*<sup>86</sup>. La amplificación del gen es predictiva de respuesta a inhibidores de Topoisomerasa, entre los que se encuentran las antraciclinas, en tanto que las deleciones del gen suponen una resistencia a este tratamiento<sup>86</sup>, sin embargo, estos resultados son controvertidos<sup>94</sup> y exigen su confirmación en nuevos estudios efectuados en series más amplias.

La prevalencia de amplificación de *ESR1* en el CM varía ampliamente entre 6-37%<sup>95,96,90</sup> en función de los métodos empleados en su detección y los diferentes puntos de corte adoptados. La amplificación de este gen se ha asociado con elevados índices mitóticos<sup>90</sup>, aunque su significado clínico no está esclarecido. No obstante, Holst *et al*<sup>97</sup> sugieren que la amplificación del gen sería un evento muy temprano en el desarrollo de la enfermedad.

El gen *MYC* codifica una proteína nuclear de unión al DNA involucrada en la regulación de más de 1500 genes<sup>86</sup>. Su amplificación se detecta



preferentemente en CM invasivo y ductal *in situ* de alto grado, no habiéndose encontrado amplificaciones en lesiones benignas o hiperplásicas; lo que sugiere que es un evento tardío en la progresión del CM<sup>98</sup>. La amplificación de *MYC* es un evento asociado con mal pronóstico, con CMs de gran tamaño, de aparición temprana y que no expresan RE y RP<sup>86</sup>. La amplificación de *MYC* es frecuente en los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1*, detectándose en el 53% de los CMs de este grupo frente al 23% encontrado en los CMEs<sup>99</sup>. Asimismo, es un fenómeno frecuente en los CMs TN, detectándose en el 63% de los mismos<sup>100</sup>.

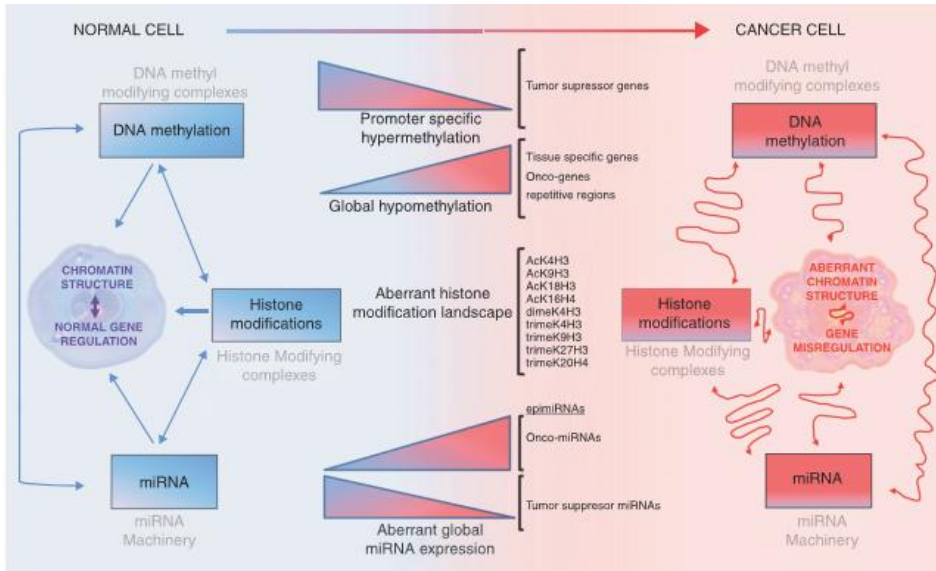
#### **4.4. Alteraciones epigenética en cáncer de mama**

La epigenética se define como los cambios en la expresión génica que no se deben a ninguna alteración en la secuencia de ADN<sup>101</sup>. Entre las diversas alteraciones epigenéticas que afectan a la expresión génica, la metilación de las islas CpG de los promotores génicos es el principal mecanismo implicado en el cáncer, al que hay que añadir los miRs por su especial relevancia como reguladores de la expresión génica<sup>102</sup> (Figura 2).

##### **4.4.1. Metilación en promotores de genes supresores tumorales**

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo en la posición C5 de las citosinas ubicadas en las islas CpG de los promotores génicos, lo que conduce al silenciamiento del gen<sup>103</sup>. El silenciamiento de la expresión génica se ha explicado por la incapacidad de algunos factores de transcripción (FT) de reconocer la zona metilada<sup>104</sup>, de manera que alteraciones en los patrones de metilación conllevan a un patrón de expresión génica alterado. Se han identificado perfiles de metilación que permiten diferenciar el tejido mamario sano del CM<sup>105,106</sup>. Los inmunofenotipos Luminal B y Basal presentan patrones de metilación diferentes<sup>107</sup>, presentando

los CMs Luminal B un patrón de hipermetilación mientras que los tumores Basal-like están escasamente metilados<sup>107,28</sup>. Así mismo, la metilación de promotores se asociada con los parámetros evolutivos, presentando los CMs hipermetilados mayor riesgo de mortalidad<sup>108</sup>.



**Figura 2. Principales alteraciones epigenéticas durante el proceso de oncogénesis.** Tomado de Sandoval *et al* (2012)<sup>44</sup>.

Los patrones de metilación de los CMs hereditarios y esporádicos se han estudiado escasamente y los resultados han sido dispares. Así, Suijkerbuijk *et al*<sup>109</sup> encontraron que los tumores portadores de mutaciones en *BRCA1* mostraban menor grado de metilación que los CMEs, por el contrario, Esteller *et al*<sup>110</sup> describen un grado de metilación similar para ambos grupos de tumores.

Dentro del CM familiar se han identificado diferentes patrones de metilación<sup>111</sup>. Los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan

menor grado de metilación que los CMs BRCA2 y los BRCA1. Además los CMs BRCA1 son un grupo muy heterogéneo en el que se diferencian dos subgrupos en base a su perfil de metilación<sup>111</sup>.

La pérdida de expresión consecuencia de la hipermetilación de los promotores de *CDKN2A*, *ESR1*, *RP*, *RARB2*, *BRCA1*, *GSTP1*, *Cadherina-E* y *TIMP3* descrita en los CMs, puede considerarse un mecanismo etiopatogénico muy relevante en la carcinogénesis mamaria. Ya que estos genes presentan un papel relevante en las vías de la regulación del ciclo celular, señalización hormonal, reparación del ADN, detoxificación de sustancias carcinogénicas, adhesión y migración celular<sup>112, 100</sup>.

Tiene especial interés la hipermetilación en el promotor de *BRCA1*, que se encuentra entre el 11–30% de los CMs y entre el 42-51% de los CMs BRCA1<sup>10</sup>, en estos casos la metilación se suele asociar con la LOH en el otro alelo de *BRCA1*<sup>113</sup>. Estos CMs que presentan un patrón BRCAness y deficiencia de la proteína BRCA1 suelen ser más agresivos, tener gran número de mitosis, y RE negativos<sup>68</sup>. Por el contrario, raramente se observa metilación del promotor de *BRCA1* en CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*<sup>10</sup>.

En el caso de la metilación del promotor de *BRCA2* la incidencia reportada varía del 15-69%<sup>114</sup>, así mismo, no se ha encontrado metilación de los promotores de *BRCA1* o *BRCA2* en tejido mamario sano<sup>68</sup>.

La metilación en el promotor del gen de la Anemia de Fanconi F (*FANCF*) también está implicada en la etiopatogénesis del CM. Este gen forma parte de una familia de genes que participan en el mecanismo de RH<sup>55</sup>. Según algunos estudios la metilación del promotor del gen *FANCF* es un fenómeno frecuente en el CM con una prevalencia del 17%<sup>68</sup>. Sin embargo estos resultados son controvertidos ya que en otros estudios la prevalencia no

supera el 1%<sup>115</sup>. Además de la proteína FANCF, también se ha identificado una menor expresión de las proteínas FANCA, FANCD2 y FANCC en células con RH deficiente<sup>116</sup>.

Los procesos de metilación juegan un papel importante en la iniciación y en las primeras etapas del desarrollo tumoral, además son potencialmente reversibles, lo que los convierte en atractivos como biomarcadores de detección precoz de la enfermedad así como posibles dianas terapéuticas.

### **4.4.2. MicroRNAs como reguladores de la expresión génica**

En los últimos años el descubrimiento de los miRs ha añadido un nivel de complejidad al estudio de los mecanismos moleculares implicados en el cáncer. Los miRs son moléculas de ARN monocatenario de pequeño tamaño que no codifican para proteína y que participan en procesos de regulación de la expresión génica. El grado de complementariedad entre la secuencia del miR y la del ARNm diana define el tipo de acción que ejerce el miR sobre éste. Si la complementariedad entre las dos secuencias es perfecta se produce una escisión específica de sitio en el ARNm; mientras que si la complementariedad no es perfecta se produce la inhibición de su traducción<sup>117</sup>.

Según la versión más actualizada de la miRbase<sup>118</sup> el genoma humano codifica para 2588 miRs maduros. Aproximadamente la mitad de los genes que codifican para miRs se localizan en regiones que suelen presentar traslocaciones, amplificaciones o deleciones, lo que conduce a la expresión aberrante del miR durante la patogénesis<sup>119</sup>. Los miRs cuya expresión está aumentada en el tumor se denominan OncomiRs, y promueven el desarrollo del tumor al inhibir la expresión de genes supresores tumorales y/o genes que controlan el ciclo celular, la diferenciación o la apoptosis. El caso contrario son los miRs considerados supresores tumorales, cuya expresión está disminuida

en el tumor, y regulan la expresión de oncogenes, de manera que estos oncogenes presentan una expresión aumentada en el tumor<sup>120,121,122</sup>.

El empleo de tecnologías basadas en microarrays ha permitido el estudio del microRNAoma, permitiendo reconocer firmas de expresión de miRs asociadas no solo con los tipos tumorales sino también con características anatomopatológicas propias de cada tumor.

#### **4.4.2.1. MicroRNAs y cáncer de mama**

Son numerosos los estudios de expresión de miRs que ponen de manifiesto la existencia de perfiles de expresión asociados con CM y más concretamente con los diferentes subtipos moleculares<sup>123,124,125,126</sup>. Además su expresión se correlaciona con características anatomopatológicas (presencia de RE y RP, amplificación de *ERBB2*) y clínicas (invasividad, grado histológico, estadio tumoral, metástasis o supervivencia)<sup>123,127,124,128</sup>.

En términos generales existe una buena concordancia entre estudios que analizan la asociación entre la expresión de miRs y la expresión de RE y RP<sup>123,124,127</sup>. Sin embargo, la correspondencia entre los diferentes estudios de expresión de miRs con las características clínicas es escasa<sup>123,124</sup>.

La mayoría de estudios que comparan perfiles de expresión de miRs entre tejido mamario sano y CM se han realizado en CME. Aunque los perfiles de expresión de miRs que seleccionan estos estudios son muy amplios, casi todos coinciden en encontrar en el CME una mayor expresión del miR-21 y una menor expresión de los miRs let-7a, miR-125 y miR-145 respecto al tejido mamario sano<sup>124</sup>.

Son escasos los estudios que analizan los perfiles de expresión de miRs atendiendo al carácter hereditario del CM. En este sentido Tanic *et al*<sup>129</sup> identificaron un conjunto de 19 miRs hiperexpresados en CM hereditario en comparación con tejido mamario sano. Once de los miRs se habían reportado previamente desregulados en CME<sup>124,128</sup>, por lo que solo restan ocho miRs (miR-99a, miR-195, miR-300, miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d y miR-335) asociados específicamente con los CMs hereditarios, que incluían tumores portadores de mutaciones en *BRCA1*, en *BRCA2* y *BRCAX*<sup>129</sup>. Este mismo grupo encuentra que los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* presentan patrones de expresión de miRs similares y claramente diferentes de los patrones de expresión mostrados por los CMs *BRCAX* y *Esporádicos*<sup>130,131</sup>. Además, describen que los CMs *BRCAX* muestran una gran heterogeneidad, llegando a identificarse cuatro subgrupos que presentan cada uno de ellos una firma específica de miRs<sup>130</sup>.

La desregulación en la expresión de los miRs no solo afecta a procesos celulares implicados en la carcinogénesis, sino que también puede repercutir en la respuesta al tratamiento<sup>132</sup>. El miR-21 se ha asociado con la resistencia a trastuzumab mediada a través de la regulación inversa de *P TEN*<sup>133</sup>. El miR-182 está involucrado en la respuesta a la radioterapia y a los inhibidores de PARP<sup>134</sup>. También se ha reportado que los miR-221/222 actúan como reguladores de la resistencia al tamoxifeno a través de la regulación negativa del REalfa<sup>135</sup>.

Los perfiles de expresión de miRNAs pueden ayudar a una mejor subclasificación de los tumores según sus características clínico-patológicas, además muestran un gran potencial como marcadores pronósticos y

predictivos de respuesta a tratamiento<sup>123</sup> e incluso como dianas terapéuticas<sup>136, 137</sup>.

## 5. Medicina personalizada en cáncer de mama

Durante muchos años, el tratamiento del CM se ha basado en regímenes de quimioterapia, provocando numerosos efectos secundarios<sup>138</sup>. Sin embargo, en los últimos años la caracterización de los subtipos moleculares de CM y las rutas de señalización implicadas en la enfermedad, así como la identificación de alteraciones oncogénicas o *driver*, ha conducido al desarrollo de una terapia personalizada<sup>28</sup> (Tabla 2).

La información genética en combinación con las variables clínico-patológicas puede emplearse para estimar el riesgo de recurrencia y predecir la eficiencia de una terapéutica concreta<sup>139</sup>. Las guías terapéuticas más recientes han incorporado las firmas genómicas en sus algoritmos, siendo actualmente una herramienta pronóstica, y en algunos casos, también predictiva. Actualmente plataformas genómicas comerciales, tales como *OncotypeDX*, *MammaPrint*, *PAM50*, *Mapquant*, *GGI* y *La firma de Rotterdam*, permiten realizar una estimación pronóstica y una orientación terapéutica precisa del CM en estadios precoces<sup>139</sup>. La mayoría de estas pruebas proporcionan un riesgo estimado de recurrencia, categorizando a las pacientes en función de su riesgo de recaída, y aunque estos ensayos no se han diseñado para seleccionar pacientes que se beneficien de un régimen terapéutico específico, si que se asume que las pacientes clasificadas de alto riesgo presentaran beneficio de tratamiento con quimioterapia adyuvante<sup>139</sup>.

Entre los tratamientos con terapias diana, cabe mencionar los inhibidores tirosina quinasa dirigidos frente a gran número de dianas (HER1,

HER2, HER3, IGFR, c-MET, EGFR), inhibidores de rutas de señalización intracelular (PI3K, AKT, mTOR, ERK), inhibidores de angiogénesis (VEGF) o agentes que intervienen en la reparación del ADN<sup>140</sup>; todos ellos, tratamientos más selectivos y, por tanto, más eficaces y menos tóxicos.

**Tabla 2.** Relación de las posibles dianas farmacológicas basadas en la presencia de alteraciones genéticas.

Gen	Fármaco
<b>Tirosina Quinasas</b>	
EGFR	Gefitinib, Cetuximab, otros
ERBB2	Lapatinib, Trastuzumab, otros
ERBB3	MM-121, MM-111, AMG888
ERBB4	Lapatinib, Neratinib
KIT, PDGFRA, PDGFRB	Imatinib, Masitinib (AB1010)
ABL1, ABL2	Imatinib, Dasatinib, Nilotinib
DDR2, DDR1	Imatinib, Nilotinib y Bafetinib (INNO-406)
FGFR2, FGFR3, FGFR4	Dovitinib, AZD4547
JAK1, JAK2, JAK3, TYK2	Tofacitinib, Ruxolitinib
ALK, ROS1, LTK	Crizotinib
MET, MST1R	Foretinib, Tivantinib, MetMab (PRO143966)
<b>Ser/Thr Quinasas</b>	
AKT1, AKT2, AKT3	MK2206
BRAF	Vemurafenib
CDK4, CDK2, Cyclin D1	PD0332991
<b>Vía PIK3CA</b>	
PIK3CA, PIK3R1, PIK3R3, PTEN, INPP4B	BKM120, GDC-0941, otros
<b>BRCA1 o 2</b>	
BRCA1, BRCA2	Cisplatin, Carboplatin, PARP inhibidores

Modificado de The Cancer Genome Atlas Network<sup>28</sup> (2012)

El ejemplo más representativo es el subgrupo de CM que presenta amplificación de *ERBB2*, en el que un número cada vez mayor de fármacos



dirigidos están cambiando la historia natural de esta enfermedad agresiva<sup>141</sup>. De manera similar los CMs con pérdida de función en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, ya sea por causa hereditaria como esporádica, muestran sensibilidad al tratamiento con inhibidores de PARP<sup>142</sup>. La deficiencia en el mecanismo de RH en este grupo de tumores, les confiere también mayor sensibilidad a agentes que generan uniones cruzadas con el ADN, como son las sales de platino<sup>143</sup>.

Especial interés presenta el subgrupo de CM TN, donde en ausencia de tratamientos específicos, la quimioterapia es la única opción disponible<sup>86</sup>. En estos casos la identificación de mutaciones *driver*, tal como son las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2*, muy frecuentes en los CMs TN, o las mutaciones de *PIK3CA* o de *EGFR* abre nuevas perspectivas para el empleo de tratamientos con inhibidores de PARP, de EGFR, de la ruta PIK3CA o de la angiogénesis<sup>144</sup>.

El tratamiento con agentes hipometilantes como la azacitidina o la decitabina resulta prometedor, aunque por el momento su aplicación se ha limitado a pacientes con síndrome mielodisplásico de alto riesgo<sup>145</sup>. No obstante, cabe confiar que cuando se conozca mejor el papel de la metilación en el cáncer, los ensayos clínicos afiancen su utilidad<sup>146</sup>, pudiendo extenderse estos ensayos a un mayor número de neoplasias. En concreto, en CM se ha visto que el tratamiento con agentes hipometilantes en líneas celulares que presentaban el RE metilado conseguía restaurar la expresión del RE y la consiguiente producción de proteína funcional<sup>147</sup>.

De igual manera, la potencial utilidad de los miRs como terapia en cáncer está actualmente bajo exploración, siendo numerosos los estudios que sugieren que el empleo los miRs pueden ser una opción viable en el

tratamiento del CM dirigida frente a dianas moleculares o como agentes antineoplásicos<sup>148,149,150,136,137</sup>.

Todo ello demanda la urgente necesidad de identificar los mecanismos etiopatogénicos involucrados en el desarrollo del CM, para con ello impulsar el desarrollo de fármacos específicos que permitan adoptar una opción terapéutica más ajustada a las características tumorales de cada paciente.

La mejora en el entendimiento de las bases moleculares del CM ha proporcionado posibles dianas para el desarrollo de nuevas terapias basadas en las características moleculares de los tumores que podrían mejorar el beneficio de las terapias actuales. Por ello el uso de paneles de biomarcadores podría guiarnos en la identificación de pacientes no solo que se vayan a beneficiar de una terapia concreta, sino también aquellos para los que no suponga un beneficio, evitando sobretratamientos innecesarios, minimizando las toxicidades derivadas del tratamiento, así como los costes que representan para el sistema sanitario.







## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---



El CM es una de las principales causas de muerte por cáncer en la mujer en todo el mundo. En la actualidad el CM se entiende como una enfermedad heterogénea que abarca una serie de entidades definidas por sus diferentes características biológicas y comportamientos clínicos<sup>151</sup>. Todo ello ha llevado a la búsqueda de biomarcadores que, a nivel individual o en combinación con otros marcadores (perfiles), ofrezcan a una mayor precisión diagnóstica, en el comportamiento evolutivo y en la predicción de la respuesta terapéutica<sup>139</sup>.

El presente estudio considera como mecanismo etiopatogénico de referencia del CM las mutaciones en los genes supresores tumorales *BRCA1* y *BRCA2*, características del cáncer de mama hereditario (CMH) y causantes de deficiencias en el mecanismo de RH, uno de los principales mecanismos de reparación de lesiones en la doble cadena del ADN. Los CMH con mutaciones en *BRCA1* suelen presentar fenotipo basal, caracterizado por la triple negatividad (CM TN) para la expresión de RE, RP y HER2<sup>68</sup>. Este fenotipo TN también se presenta en un 25% de los CMEs, en los que la disfunción de los genes *BRCAs* puede ser un mecanismo etiopatogénico importante<sup>68,152</sup>.

- **El objetivo principal** de la presente tesis doctoral es identificar los patrones de parámetros IHQs y alteraciones genéticas y epigenéticas vinculadas a los mecanismos etiopatogénicos del CM y a la progresión tumoral. La caracterización de estos patrones puede ser de gran relevancia para orientar el tratamiento del tumor con agentes antineoplásicos o terapias dirigidas, como es la reciente incorporación de los inhibidores de PARP, que podrían ser la base de una medicina personalizada y de precisión.

Por esta razón, en la presente tesis, se busca caracterizar los patrones IHQs, moleculares y epigenéticos asociados a los CMs portadores de

mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*, CMs familiares no portadores de mutaciones (*BRCAX*) y CMEs. La particular relevancia de los CMs TN justifica que también se caractericen estos patrones en este grupo.

Para alcanzar este objetivo principal se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Identificar los parámetros IHQs y moleculares asociados con cada uno de los cuatro grupos de estudio (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRCAX* y Esporádico).

1.1. Identificar los parámetros IHQs más relevantes para la identificación de cada grupo.

1.2. Determinar el perfil de VNC vinculado a cada uno de los grupos.

1.3. Definir el perfil de metilación en promotores de genes supresores tumorales asociado con cada grupo.

1.4. Identificar miRs diferencialmente expresados en los grupos de estudio y validar su expresión en una serie mayor.

1.5. Establecer los marcadores más relevantes para la clasificación de los cuatro grupos.

2. Asimismo se estudian los perfiles IHQs, moleculares y epigenéticos de los CMs TN y no TN.

2.1. Identificar los parámetros IHQs que permitan la distinción de los CMs TN y no TN.

2.2. Definir el perfil de VNC asociado con los CMs TN y No TN.



2.3. Identificar el perfil de metilación en los promotores de genes supresores tumorales asociados a los CMs TN y no TN.

2.4. Comparar la expresión de miRs en los CMs TN y no TN.

2.5. Establecer los marcadores más relevantes para la identificación de los CMs TN y No TN.





## MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. Pacientes y muestras

El presente estudio incluye un total de 277 pacientes con CM, 162 con CMOH y 115 CMEs. Las 162 pacientes con historia de CMOH fueron atendidas en las Unidades de Consejo Genético en Cáncer (UCGC) dependientes del Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana (PCGCCV)<sup>153,154</sup>: Hospital de Castellón, Hospital Clínico de Valencia, Hospital Universitario y Politécnico La Fe (HUyP La Fe) y Hospital de Elche (Anexo 1). Todas las pacientes del estudio son casos índices (CIs) con CM que cumplen los criterios establecidos en el PCGCCV<sup>43</sup> (Tabla 3).

Las 115 pacientes con CME proceden de los servicios de Oncología Médica (OM) de diversos hospitales de la Comunidad Valenciana [Instituto Valenciano de Oncología (IVO), Hospital de Elche, Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), Hospital Clínico Universitario de Valencia y HUyP La Fe] (Anexo 1).

Las 277 pacientes reclutadas se distribuyen en cuatro grupos de estudio:

a) Grupo *BRCA1* (BRCA1): 48 CIs con CM que portaban mutaciones en *BRCA1*.

b) Grupo *BRCA2* (BRCA2): 40 portadores de mutaciones en *BRCA2*.

c) Grupo BRCAx: 74 CM de pacientes con historia familiar en los que no se detectaron mutaciones ni grandes reordenamientos (LGRs) en los genes *BRCA1/BRCA2*.

d) Grupo Esporádico (CME): 115 pacientes con CM sin historia familiar.

En todos los casos las pacientes han manifestado por escrito su aprobación para participar en el estudio. Este consentimiento informado se ha elaborado de acuerdo con las directrices recogidas en la Declaración de

Derechos Humanos y Conferencia de Helsinki<sup>155</sup> y los requisitos establecidos en la legislación valenciana y española<sup>156,157</sup> en el ámbito de investigación biomédica.

Asimismo, en el mencionado documento se solicita la autorización para incluir muestra tumoral en el estudio y almacenar el excedente de la misma en el Biobanco del Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana.

**Tabla 3.** Criterios de selección de pacientes de alto riesgo de CMOH establecidos en el Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana<sup>43</sup>.

---

### CRITERIOS DE SELECCIÓN

---

#### **Familias con un único caso de CM**

CM diagnosticado antes de los 30 años

CMB diagnosticado antes de los 40 años (al menos uno de los tumores)

Un CM y un CO en la misma paciente

#### **Familias con dos casos en familiares de primer grado<sup>1</sup>**

Dos casos de CM o CMB, al menos uno diagnosticado antes de los 50 años

Dos o más casos de CO (independientemente de la edad)

Un CM y un CO en dos familiares (independientemente de la edad)

Un caso de CM en varón y otro de mama/ovario en mujer (independientemente de la edad)

#### **Familias con tres o más casos afectados por CM, al menos dos en familiares de primer grado**

---

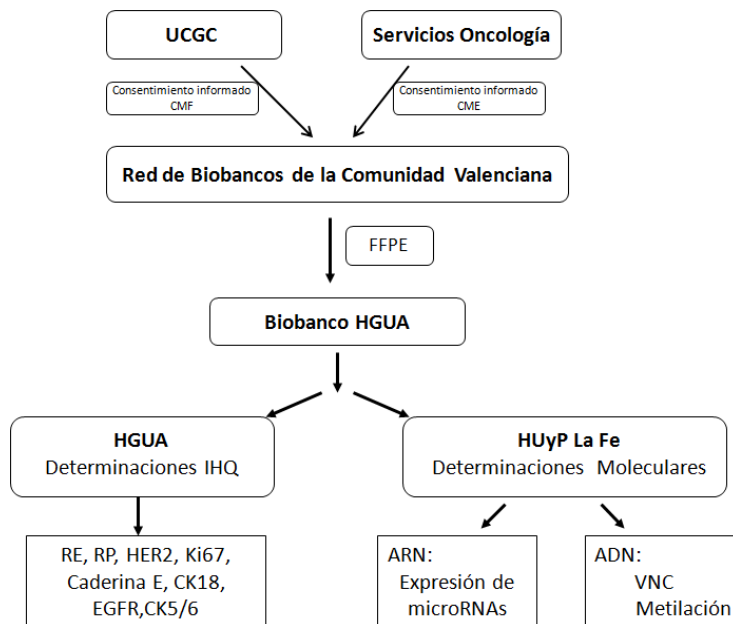
CMB: cáncer de mama bilateral; CO: cáncer de ovario; <sup>1</sup> Familiares de primer grado son madres, hijas y hermanas. No se consideran los varones al considerar el parentesco.

## 2. Circuito de trabajo

La presente tesis se ha realizado gracias a la colaboración de diferentes servicios de Anatomía Patológica (AP) de la Comunidad Valenciana. Los estudios IHQs y moleculares se han realizado en los laboratorios del Servicio de

AP del HGUA y de Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos del HUyP La Fe y en el reclutamiento de las pacientes han participado las UCGC y servicios de OM antes mencionados (Anexo 1).

El circuito de trabajo (Figura 3) se inicia con la recogida de los consentimientos informados por parte de las UCGC y servicios de OM implicados en el proyecto. Estos consentimientos se remiten al coordinador de la Red Valenciana de Biobancos (RVB), que solicita la muestra del tumor primario [tejido tumoral incluido en parafina (FFPE)] a los servicios de AP en donde se almacenan. Los bloques de tejido FFPE son remitidos al servicio de AP del HGUA, encargado de efectuar las determinaciones IHQs y seleccionar el material para su envío al Laboratorio de Biología Molecular del HUyP La Fe, donde se efectúan los estudios moleculares planteados en el proyecto.



**Figura 3. Circuito de trabajo.** UCGC: Unidades de Consejo Genético en Cáncer; CMF: CM con historia familiar; CME: CM Esporádico, VNC: Variación del número de copias.

### 3. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*

Las mutaciones puntuales (substituciones y pequeñas inserciones/deleciones) o LGRs (grandes deleciones e inserciones que comprometen fragmentos de ADNg de entre 0,2 a 400 Kb) en línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* de las 162 pacientes con CM familiar incluidos en el estudio proceden de la base de datos de nuestro laboratorio que es referente para el estudio molecular de las mutaciones en los genes *BRCA1/2* en la Comunidad Valenciana<sup>154</sup>.

Todas ellas han sido analizadas de acuerdo a los procedimientos estandarizados en nuestro laboratorio. El estudio de mutaciones puntuales se ha realizado efectuando un cribado previo de mutaciones de los productos de PCR (23 para *BRCA1* y 26 para *BRCA2*) por análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM; *High Resolution Melting*)<sup>158</sup>, seguido de la secuenciación posterior de los productos de PCR anómalos. Los LGRs se han detectado siguiendo un método de amplificación múltiple de sondas denominado MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) seguido del análisis posterior de los fragmentos generados mediante electroforesis capilar (EC)<sup>159,160</sup>.

### 4. Características demográficas y patológicas de las pacientes estudiadas

Se han recopilado las características demográficas (edad al diagnóstico) y patológicas (tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N), grado histológico (GH), presencia de metástasis (M) y el subtipo histológico) de las pacientes incluidas en el estudio (Tabla 4). Asimismo, se recogen las características demográficas y patológicas de los CMs triple negativos (TN) y No TN.



**Tabla 4.** Características clínico-patológicas de los grupos estudiados

GRUPO		BRCA1	BRCA2	BRCAX	ESPORÁDICO	TN	No TN
VARIABLE		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Edad (años)</b>	<b>(n; <math>\bar{X} \pm DT</math>)</b>	47;49 $\pm$ 11,2	41;46 $\pm$ 11,2	74;45 $\pm$ 11,5	114;54 $\pm$ 11,5	79;47 $\pm$ 11,6	186;49 $\pm$ 11,9
<b>T</b>	<b>&lt; 2cm</b>	27 (56)	19 (50)	41 (56)	64 (58)	33 (44)	110 (61)
<b>(n=270)</b>	<b>&gt; 2cm</b>	21 (44)	19 (50)	32 (44)	47 (42)	42 (56)	71 (39)
<b>N</b>	<b>0</b>	32 (67)	21 (55)	54 (74)	67 (60)	49 (69)	109 (61)
<b>(n=270)</b>	<b>1</b>	16 (33)	17 (45)	19 (26)	44 (40)	70 (39)	22 (31)
<b>M</b>	<b>0</b>	28 (100)	32 (97)	38 (97)	57 (93)	41 (98)	102 (96)
<b>(n=161)</b>	<b>1</b>	0 (0)	1 (3)	1 (3)	4 (7)	1 (2)	4 (4)
<b>GH</b>	<b>1</b>	3 (6)	7 (18)	15 (21)	20 (18)	3 (4)	41 (24)
<b>(n=270)</b>	<b>2</b>	14 (29)	15 (40)	33 (45)	42 (38)	16 (22)	68 (40)
	<b>3</b>	31 (65)	16 (42)	25 (34)	49 (44)	52 (73)	60 (35)
<b>Tipo</b>	<b>CDI</b>	41 (95)	36 (90)	60 (87)	100 (90)	72 (100)	160 (85)
<b>Histológico</b>	<b>CLI</b>	0 (0)	3 (7)	7 (10)	8 (7)	0 (0)	18 (10)
<b>(n=263)</b>	<b>In situ</b>	2 (5)	1 (3)	2 (3)	3 (3)	0 (0)	9 (5)

T: Tamaño tumoral, N: Afectación ganglionar (N0: Ausencia, N1: Presencia); M: metástasis (M0: Ausencia, M1: Presencia); GH: Grado Histológico (1: diferenciado, 2: poco diferenciado, 3: indiferenciado); CDI: Carcinoma ductal infiltrante; CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante;  $\bar{X}$ : media; DT: Desviación típica.

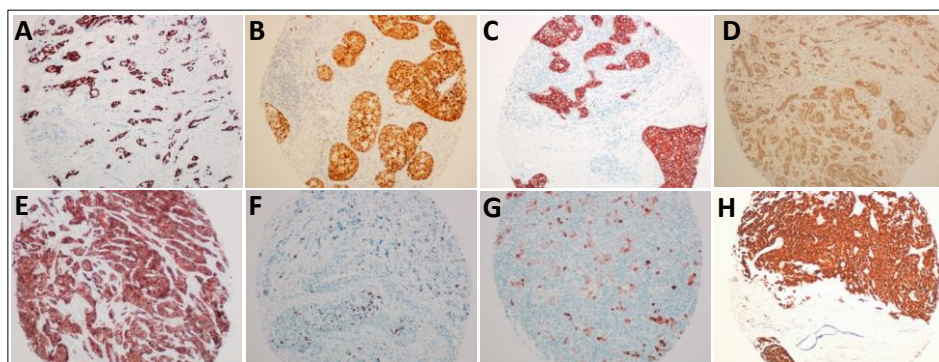
## 5. Determinaciones Inmunohistoquímicas

Las determinaciones IHQ realizadas incluyen expresión de receptores hormonales de estradiol y progesterona (RE y RP), citoqueratinas (CK 5/6 y CK 18), expresión y amplificación de HER2 y expresión de Caderina-E, EGFR y marcador de proliferación celular Ki67.

El estudio IHQ se ha realizado empleando matrices de tejido (TMA) que han incluido dos secciones de 1 mm de tejido tumoral por caso. Los cortes realizados sobre los TMA han sido incubados durante 30 minutos (min) a temperatura ambiente con anticuerpos primarios específicos para cada una de las determinaciones (Anexo 2). La detección se ha llevado a cabo con el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako), utilizando como cromógeno la diaminobencidina (DAB; Dako).

La valoración IHQ se ha realizado en microscopio óptico por dos observadores, valorando al menos 100 células.

La expresión de RE y RP ha sido evaluada aplicando el sistema de puntuación Allred siguiendo las recomendaciones indicadas en las guías de ASCO y CAP<sup>161</sup> (Figura 4A y 4B). La expresión de HER2 se ha puntuado siguiendo los criterios y las indicaciones del kit HercepTest<sup>TM 162</sup> (Figura 4C). En casos con tinción de intensidad >2, se ha realizado hibridación *in situ* fluorescente (FISH) del oncogén empleando el kit Dual-CISH (PharmaDx Kit, Dako) cuantificando al menos 60 señales. En la evaluación de la expresión de EGFR y Caderina-E (Figura 4D y 4E) se han aplicado criterios similares a los empleados para HER2<sup>163,164,165</sup>. El factor de proliferación celular Ki67 (Figura 4F) se ha expresado como porcentaje de células con tinción nuclear positiva, de acuerdo con las recomendaciones del Consenso Internacional de Expertos de San Gallen<sup>166,167</sup>. La expresión de las citoqueratinas 5/6 y 18 (Figuras 4G y 4H) se ha considerado positiva ante la presencia de tinción citoplasmática en más del 5% de las células.



**Figura 4. Expresión de marcadores inmunohistoquímicos.** A: RE; B: RP; C: HER2; D: EGFR; E: Caderina-E; F: Ki67; G: CK5/6; H: CK18

El inmunofenotipo tumoral se ha establecido de acuerdo con el Consenso Internacional de San Gallen<sup>168,166,167</sup>; siendo modificado

posteriormente agrupando todos los tumores que presentaban amplificación de HER2 en un solo grupo y unificando en otro grupo los tumores negativos para la expresión de RE, RP y HER2 (TN) (Basales y Quintuples negativos). Se dispone del inmunofenotipo de 270 CMs, 112 son luminal A, 46 luminal B, 33 Her2 y 79 TN (Tabla 5)

**Tabla 5.** Clasificación seguida para el establecimiento del inmunofenotipo

Clasificación St. Gallen <sup>166</sup>	Marcadores Inmunohistoquímica	Clasificación adaptada	n
LUMINAL A	RE y/o RP positivos; HER2 negativo; proliferación celular baja (Ki67 <14%)	LUMINAL A	112
LUMINAL B	RE y/o RP positivos; HER2 negativo; proliferación celular alta (Ki67 >14%)	LUMINAL B	46
LUMINAL B/HER2 HER2 CLÁSICO	RE y/o RP positivos; HER2 positivo RE y RP negativos; HER2 positivo	HER2	33
BASAL QUÍNTUPLE NEGATIVO	RE y RP negativos; HER2 negativo; K5/6 positivo y/o EGFR positivo RE y RP negativos; HER2 negativo; CK5/6 negativo y EGFR negativo	TN	79

n: número de casos

## 6. Extracción de ácidos nucleicos

### 6.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se ha empleado el kit de extracción QIAamp DNA Investigator (Quiagen). Para ello se han utilizado dos secciones de FFPE de un mm de diámetro procediendo a su desparafinación mediante una solución de desparafinado (Quiagen). El método de extracción se basa en el empleo de columnas de adsorción que retienen el ADN. El procedimiento consiste en una digestión con proteinasa K durante toda la noche, seguida de una serie de

lavados en columna y elución final en Tris Edta (TE), obteniendo un eluido de ADN purificado libre de proteínas, nucleasas y otros inhibidores.

### **6.2. Extracción de ARN**

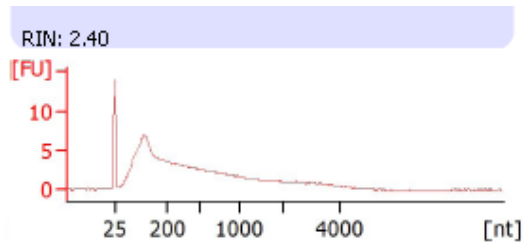
La extracción de ARN se ha realizado empleado el Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion) partiendo de tres secciones de muestra de un mm de diámetro. Las muestras tras su disgregación se someten a una digestión con proteasa K, seguida de una digestión con ADNasa. El ARN total queda adsorbido a una columna de la que se libera tras varios lavados con los reactivos del kit y una elución final con agua libre de ARNasas.

### **6.3. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos**

La concentración y calidad de los ácidos nucleicos extraídos (ADN y ARN) han sido evaluadas espectrofotométricamente en el NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v3.3). La calidad de la muestra viene expresada como cociente de absorbancias medidas a 260 y 280 nm. Han sido consideradas muestras con calidad aceptables aquellas con cocientes 260/280 entre 1,8-2,0. Una vez cuantificados, los ácidos nucleicos se han almacenado a -80°C hasta el momento de su empleo.

Adicionalmente se ha valorado la integridad del ARN de las muestras destinadas a los estudios de expresión de miRs. Para ello se ha empleado el kit Total RNA Nano (Technologies, Santa Clara) en el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara). Los electroferogramas obtenidos se han visualizado en el software Agilent 2100 Expert (Figura 5). La integridad del ARN se valora mediante un número (RIN) comprendido entre 1 (totalmente degradado) y 10 (íntegro). Las muestras utilizadas han presentado un RIN entre 2.30 y 2.80. Este RIN tan bajo indica una marcada degradación y/o presencia de pequeños

fragmentos de ARN, (Figura 5), correspondientes al tamaño propio de los miRs.



**Figura 5. Análisis de la calidad del ARN total extraído con Bioanalyzer 2100.** En la muestra se observa mayoritariamente un porcentaje alto de ARN de pequeño tamaño.

## 7. Estudios moleculares efectuados en ADN

Se han efectuado dos tipos de estudios en ADN: la determinación de la variación en el número de copias (VNC), ganancias o pérdidas, de 20 genes que juegan un papel importante en el desarrollo, progresión y respuesta al tratamiento en tumores mamarios invasivos<sup>90</sup>, y la metilación en promotores de 24 genes supresores tumorales implicados en cáncer<sup>169</sup>. Ambos estudios han sido realizados aplicando la técnica MLPA<sup>159</sup> o su variante sensible a metilación (MS-MLPA<sup>169</sup>).

La VNC se ha estudiado en 253 muestras (46 CMs BRCA1, 35 BRCA2, 69 BRCA2 y 103 CMEs), de las cuales en 249 (75 CMs TN y 174 No TN) se disponía de inmunofenotipo.

El estudio de metilación en promotores se ha efectuado en 240 muestras (45 CMs BRCA1, 33 BRCA2, 66 BRCA2 y 96 CMEs), de las que, 71 presentaban inmunofenotipo TN y 166 No TN.

## **7.1. Detección de la VNC mediante Amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación (MLPA)**

### **7.1.1. Fundamento del método de MLPA**

La técnica de MLPA<sup>159</sup> es un procedimiento de cuantificación relativa que permite detectar la VNC de múltiples secuencias de ADN en una única reacción. El método se fundamenta en la hibridación de múltiples sondas que cubren la región del gen a analizar con la secuencia de ADN del paciente. Únicamente las sondas que han hibridado en secuencias adyacentes pueden ser unidas por una enzima ligasa. Finalmente, el particular diseño de las sondas permite la amplificación simultánea de aquéllas que han sido ligadas empleando una pareja de cebadores universales y bajo las mismas condiciones de PCR.

### **7.1.2. Protocolo de trabajo y reactivos empleados**

Se ha seguido el protocolo de trabajo recomendado por el fabricante<sup>170</sup> incluyendo en cada experimento dos muestras control. El ADN control se ha obtenido a partir de tejido mamario sano incluido en parafina.

El protocolo comienza con la desnaturalización del ADN del paciente y posterior adición de la mezcla de sondas junto con su correspondiente tampón de hibridación. Tras 16 h de incubación se añade la enzima ligasa que ligará los dos oligonucleótidos de cada una de las sondas que hayan hibridado sobre la muestra de ADN del paciente. Tras este proceso, el producto de ligación junto con la mezcla de PCR, que incluye primers universales, el buffer de PCR y la ADN polimerasa, es sometido a un programa de PCR. Los productos de PCR generados son almacenados a -20°C hasta ser analizados mediante EC.

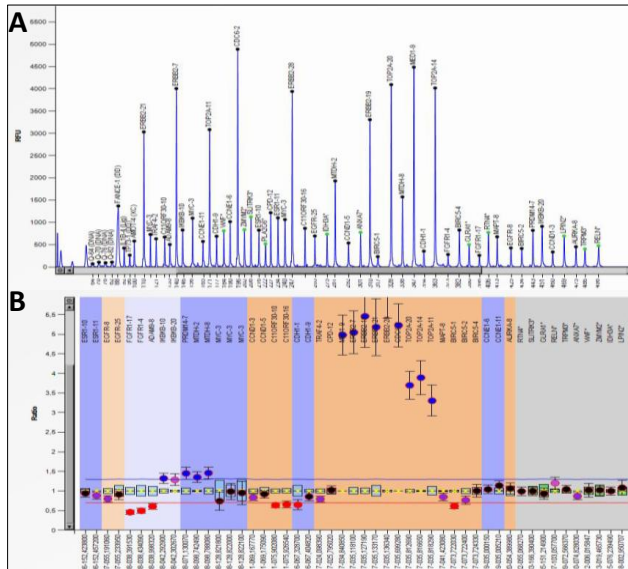
En la detección de VNC se ha empleado el kit SALSA MLPA probemix P078 Breast Tumour<sup>90</sup> contiene 41 sondas que exploran la VNC en 20 genes relacionados con el CM (*ERBB2*, *BIRC5*, *MYC*, *TOP2A*, *ESR1*, *MTDH*, *CCND1*, *CCNE1*, *EGFR*, *EMSY*, *ADAM9*, *IKBKB*, *CDH1*, *CDC6*, *CPD*, *FGFR1*, *MED1*, *MAPT*, *PRMD14* y *AURKA*), incluyendo además 12 sondas de referencia. Como todos los kits de MLPA, presenta también cuatro sondas control que valoran la cantidad de ADN en la muestra (sondas DQ) y las etapas de desnaturalización e hibridación (sondas DD). En el Anexo 3 se recoge la información de cada una de las sondas contenidas en la mezcla.

### **7.1.3. Análisis de fragmentos por electroforesis capilar e interpretación de los resultados**

Los productos de PCR son separados y detectados mediante EC en el equipo ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Debido al diferente tamaño que presenta cada sonda, los productos de PCR generados presentan diferente tamaño y diferente movilidad electroforética. Esta característica permite asociar cada una de las señales detectadas en el análisis de fragmentos con una sonda, permitiendo así su identificación. Las señales detectadas son proporcionales a la cantidad de secuencia diana presente en la muestra.

Para la evaluación e interpretación del patrón de picos generados en el análisis de fragmentos hemos empleado el software Coffalyser (MRC Holland, The Netherlands)<sup>170</sup>. Tras la evaluación inicial de los electroferogramas en el equipo de EC, los datos de las carreras son exportados al software que permite realizar la interpretación del análisis de fragmentos (Figura 6A) y el análisis comparativo de la muestra problema y muestras control, estimando para cada sonda un cociente que se corresponde a la dosis

génica de la secuencia de estudio. Cocientes en torno a 1 suponen dosis génicas similares en el paciente y en las muestras de referencia; en el caso de presencia de amplificaciones en la muestra el ratio es superior a 1.3, mientras que en el caso de presencia de deleciones es menor de 0.7 (Figura 6B).



**Figura 6. Análisis de resultados con Coffalyser.** A: Electroferograma de la muestra problema generado en el Coffalyser a partir de los datos tomados del secuenciador. B: Análisis comparativo de la muestra problema respecto a la muestra control.

## 7.2. Detección de la metilación de promotores mediante amplificación múltiple empleando sonda dependiente de ligación sensible a metilación (MS-MLPA)

### 7.2.1. Fundamento del método de MS-MLPA

La técnica MS-MLPA<sup>169</sup> es una modificación del MLPA convencional descrita en el apartado anterior. En este caso la secuencia detectada por la sonda contiene una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción sensible a la metilación HhaI. El método presenta una etapa de digestión con



dicha enzima en la que se produce la digestión de los híbridos ADN muestra:sonda si el ADN no está metilado en la secuencia de reconocimiento. En caso contrario, si el paciente presenta metilación en la secuencia de reconocimiento, el híbrido ADN de la muestra:sonda no será digerido por la enzima de restricción HhaI y, en consecuencia, podrá ser amplificado en la siguiente fase, detectándose la correspondiente señal/pico en el electroferograma.

### **7.2.2. Protocolo de trabajo y reactivos empleados**

El protocolo de trabajo es similar al descrito en el protocolo de MLPA convencional (Apartado 7.1.2) pero con ligeras variaciones. Tras la etapa de hibridación la muestra se divide en dos alícuotas. La primera de ellas proporcionará información sobre el número de copias de cada uno de los genes de estudio, procediendo según el protocolo previamente descrito. Mientras que en la segunda alícuota se valorará la metilación, en ella además del tampón de ligación y la ligasa se añade la enzima de restricción sensible a metilación HhaI. La etapa de ligación y digestión sigue con la amplificación de los productos mediante PCR aplicando el protocolo recomendado por el fabricante.

Se ha empleado el kit ME001 MS-MLPA (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que contiene 24 secuencias que hibridan con las regiones promotoras de un conjunto de genes supresores de tumores (*TIMP3*, *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *ATM*, *RARB*, *CDKN2B*, *HIC1*, *CHFR*, *BRCA1*, *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN*, *BRCA2*, *CD44*, *RASSF1*, *DAPK1*, *VHL*, *ESR1*, *TP73*, *FHIT*, *IGSF4*, *CDH13* y *GSTP1*) que con frecuencia están silenciados por metilación en diferentes tumores<sup>169</sup>. Además incluye 15 sondas control que no se ven afectadas por la digestión con HhaI. Como el resto de kits de MLPA, también presenta las

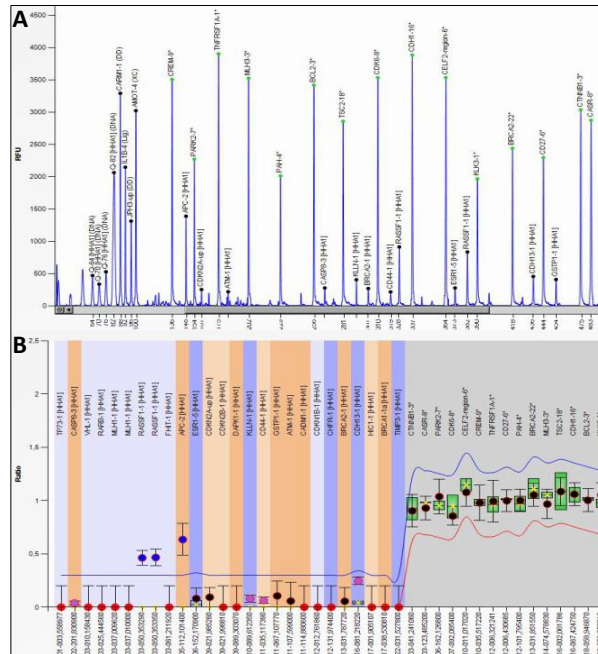
sondas control DQ y DD. En el Anexo 4 se recoge la información de la mezcla de sondas de MS-MLPA empleada.

### **7.2.3. Interpretación de los resultados**

En este caso se obtienen dos reacciones de PCR por paciente, en una primera alícuota se valora la presencia de VNC, tal y como se describe en el apartado 7.1.3. En el caso de la alícuota que ha sido digerida con la enzima de restricción sensible a metilación, los promotores de los genes que estén metilados proporcionarían señal en el electroferograma, y ésta será proporcional al porcentaje de metilación que presente la muestra (en la figura 7A están indicados con un círculo negro).

Las sondas control del kit no presentan secuencia de restricción para la enzima, por lo tanto no dependen de la presencia de metilación para ser amplificadas. La detección de la señal de estas sondas en el electroferograma indica que la técnica se ha desarrollado correctamente (en la figura 7A están indicados con un círculo verde).

Para la cuantificación del estado de metilación de cada gen también se ha empleado el software Coffalyser<sup>170</sup>. El protocolo de análisis en este caso requiere varias etapas, en primer lugar se realiza la normalización tal como se recoge en el apartado 7.1.3. Esto se hace tanto en las muestras tratadas con enzima HhaI como en las no tratadas. El grado de metilación de cada secuencia se determina mediante el cociente ratio en la muestra digerida/ratio en la muestra sin digerir. Se ha considerado metilación aberrante cuando el ratio digerido/no digerido es  $\geq 0.1$ . Ratios inferiores a 0.1 se consideraron ruido de fondo. En la figura 7B se muestran los resultados obtenidos en el análisis de metilación con Coffalyser.



**Figura 7. Análisis de resultados en la muestra tratada con enzima de restricción. (A)** Electroferograma correspondiente a los fragmentos generados en la reacción de PCR. **(B)** Resultados del análisis de metilación mediante el programa Coffalyser.

## 8. Expresión de miRs

Se ha realizado un cribado del perfil de expresión de 1.733 miRs humanos maduros empleando arrays de expresión que ha permitido identificar y seleccionar los miRs que presentan una expresión diferencial entre los grupos de estudio. Los miRs seleccionados se cuantificaron mediante RT-qPCR en la serie completa de pacientes.

### 8.1. Arrays de expresión de miRs

Para el estudio de expresión de miRs se han empleado los arrays GeneChip miRNA 3.0 (Affimetrix) diseñados sobre la versión 17 de la

miRBase<sup>171</sup> que contienen sondas para la detección 1.733 miRNAs humanos maduros, 1.693 pre-miRNAs (inmaduros) y 2.336 scaRNA y snoRNA. El análisis se ha llevado a cabo en el Servicio de Arrays del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. En la figura 8 se muestra el esquema de trabajo seguido.

### **8.1.1. Protocolo de trabajo**

Se han hibridado 20 muestras, 5 de cada uno de los grupos (5 BRCA1, 5 BRCA2, 5 BRCAX y 5 CMEs). Previamente a su hibridación en el array las muestras han sido poliadeniladas y marcadas con Biotina, empleando 500 ng de ARN total siguiendo las instrucciones del kit FlashTag Biotin HSR (Genisphere) (Figura 8). Las muestras marcadas han sido hibridadas sobre los arrays durante 16h a 48°C y 60 rpms; y, finalmente, se ha procedido con el escaneo de los arrays en la plataforma System 3000Dx v.2 de Affymetrix.

Los valores de fluorescencia obtenidos para cada una de las muestras han sido evaluados para determinar su calidad y se han normalizado siguiendo el protocolo de análisis recomendado por Genisphere empleando el software Expression Console de Affymetrix. El protocolo incluye una corrección del ruido de fondo mediante el método "Robust Multichip Average" (RMA), la Normalización por cuartiles, el Escalado Log (2) y el cálculo de la Mediana Pulida<sup>172,173,174</sup> (Figura 8).

### **8.1.2. Interpretación de los resultados**

Para el análisis de los datos normalizados se ha utilizado el software específico para análisis de arrays, Partek Genomics Suite<sup>175</sup>, aplicando los parámetros recomendados por Affymetrix y Partek para el análisis en este tipo de arrays: ANOVA con contrastes para cada grupo establecido (BRCA1, BRCA2, BRCAX y CME).

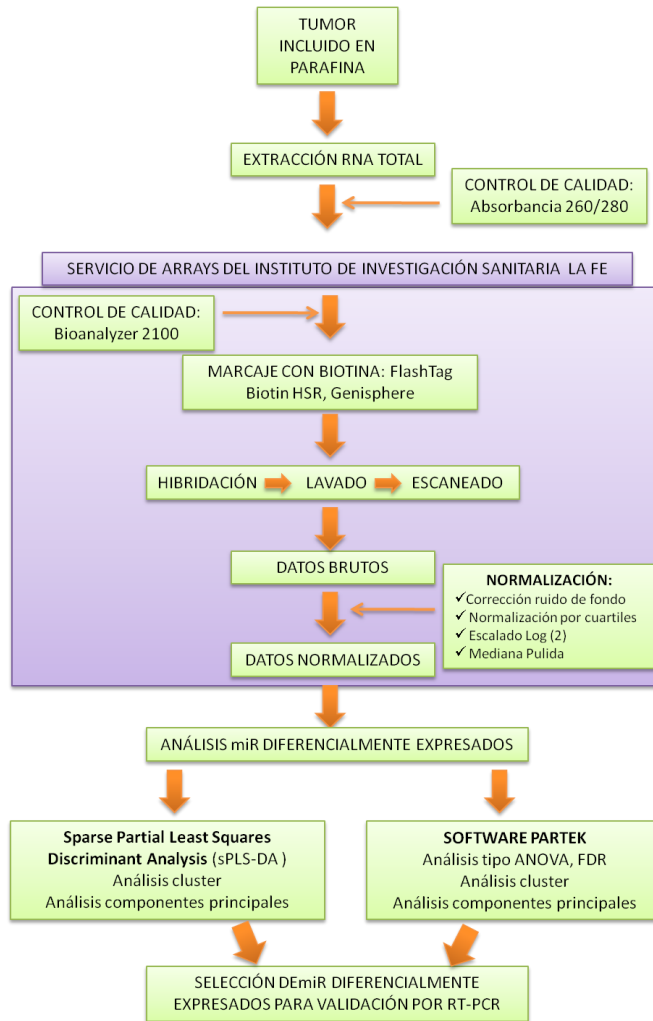


Figura 8. Esquema de trabajo seguido en el estudio de expresión de miRs.

## 8.2. Cuantificación relativa de la expresión de miRs mediante RT-qPCR

Se ha cuantificado la expresión de los miRs seleccionados en 270 CMs (48 BRCA1, 38 BRCA2, 73 BRCAx y 111 CMEs) mediante PCR en tiempo real empleando los kits TaqMan miRNA Reverse Transcription kit, TaqMan

MicroRNA Assays específicos para cada miR, y TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La detección se ha realizado en el equipo de PCR en tiempo real ViiA 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

### **8.2.1. Fundamentos del procedimiento y protocolo de trabajo**

El ensayo requiere ADNc obtenido empleando la transcripción reversa (RT) del ARN que posteriormente se amplifica mediante PCR.

Para la RT se ha empleado una mezcla de cebadores que permite efectuar la RT simultánea de los miRs a estudiar (los reactivos necesarios para la realización de la RT y el programa empleado se describen en los Anexos 5 y 6). Después se ha efectuado la amplificación del ADNc mediante qPCR, empleando cebadores y sondas específicas para cada miR (La mezcla de la reacción, el programa de temperaturas y los ensayos TaqMan empleados en la qPCR se muestran en los Anexos 7, 8 y 9).

Las reacciones se han llevado a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos incorporando en cada experimento un blanco de reactivos. Las lecturas de las muestras se han efectuado en el equipo Via 7 (Applied Biosystems) y para el cálculo de resultados se ha empleado el programa ViiA™ 7 Software propio del equipo.

### **8.2.2. Interpretación de los resultados**

La cuantificación relativa de la expresión de los miRs se ha realizado empleando el método  $\Delta\Delta Ct^{176}$  disponible en el software del equipo ViiA™ 7 Software. El umbral de ciclos (CT), es el ciclo a partir del cual se detecta fluorescencia en el termociclador en tiempo real y representa una medida de la cantidad de ADNc presente en la muestra.

En primer lugar se requiere la normalización de la expresión del miR respecto a un miR de referencia que presenta una expresión estable en el tejido de estudio. En nuestro caso se ha empleado como referencia el RNU44. La estimación de la expresión génica se realiza comparando los CT normalizados ( $\Delta\text{Ct}$ ) de la muestra respecto a los de una muestra control<sup>176</sup>. Los resultados finales se han expresado como logaritmo  $\Delta\Delta\text{Ct} + 10$ .

## 9. Identificación de dianas de miRs

Se han aplicado herramientas bioinformáticas *in silico* para la identificación de los genes relacionados con CM que podrían estar regulados por los miRs seleccionados.

La información referente a los miRs se ha obtenido de la última versión (versión 21) de la base de datos miRbase<sup>171</sup>.

Adicionalmente, se ha empleado la información contenida en la web Diana Lab<sup>177</sup> que provee de algoritmos, bases de datos y software para la interpretación de estudios de expresión de miRs. Este programa utiliza el software microT-CDS v.5.0<sup>178</sup> basado en algoritmos predictivos de interacción entre el miR y Elementos de Reconocimiento de miRs (MREs) y el TarBase v6.0<sup>179</sup>, que es una base de datos de dianas experimentalmente validadas que contiene más de 65.000 interacciones miR-gen.

La tercera herramienta informática empleada ha sido The miR'Ó web site<sup>180</sup> que integra información de diferentes fuentes<sup>181</sup>: La información experimentalmente validada se toma de miRecords<sup>182</sup> y para la predicción de dianas se basa en los softwares TargetScan<sup>183</sup>, PicTar<sup>184</sup> y miRanda<sup>185</sup>. Además accede a la base de datos Gen Ontology (GO) de donde obtiene información sobre los procesos y funciones en los que participan los genes seleccionados.

## 10. Análisis estadístico

Para el estudio de la significación estadística de los resultados de este trabajo se ha empleado el paquete estadístico SPSS (versión 20).

Las variables continuas (edad y expresión de miRs) han sido resumidas por la media y la desviación típica (DT) y las variables categóricas por sus frecuencias.

Las variables categóricas se compararon aplicando el test  $\chi^2$ . En el caso de la edad se ha empleado el test de comparación de medias. El ANOVA se ha empleado para la comparación de las medias de expresión de miRs. En todos los casos se ha tomado como significación estadística  $p < 0.05$ .

La asociación de los diferentes perfiles moleculares (VNC, metilación y miRs) e IHQs con los grupos de estudio se ha estudiado aplicando modelos de regresión logística multinomial. Para el análisis de asociación con el inmunofenotipo TN se ha empleado la regresión logística binaria. En todos los casos se emplea el procedimiento paso a paso reverso (Wald reverso) que permite la selección de los parámetros independientes que presentan mayor asociación.

Para el análisis de los datos obtenidos en el estudio de expresión de miRs mediante arrays se ha empleado el programa Partek Genomics Suite 6.6v<sup>175</sup>. Este programa utiliza el test ANOVA para identificar los miRs que presentan diferencias de expresión ( $p < 0.01$ ) entre los grupos de estudio. Asimismo, el programa permite efectuar estudios de cluster jerárquico<sup>186</sup> y análisis de componentes principales (PCA)<sup>187</sup> en base al perfil de miRs que diferencia los grupos. Sobre los miRs seleccionados en este perfil, se ha aplicado un análisis discriminante para la identificación de los más relevantes.



También se ha empleado el procedimiento estadístico sPLS-DA (Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis)<sup>188</sup>, incluido en el entorno de programación R<sup>189</sup>, que permite seleccionar el perfil de miRs (entre el total de 1.733 microRNAs maduros contenidos en el array) que mejor diferencia los grupos. Este análisis se ha completado con el cluster jerárquico y PCA en el entorno R.





## RESULTADOS

---



## I. Caracterización inmunohistoquímica y molecular de los grupos de estudio

### 1. Parámetros Inmunohistoquímicos e Inmunofenotipo

Los CMs con mutaciones en *BRCA1* se caracterizan por presentar una baja expresión de RE y RP (solo el 30% y 21%, respectivamente, expresan receptores hormonales (Tabla 6), escasa proporción de amplificaciones en HER2 (4%), índices proliferativos (Ki67) altos (69%) y expresión moderada de CK5/6 (35%). Por el contrario, los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA2* presentan una mayor proporción de RE+ (74%) y RP+ (58%) que los *BRCA1*, mientras que la prevalencia de amplificaciones en HER2 en este grupo sigue siendo baja (7%). Los CMEs y BRCAX muestran características inmunohistoquímicas similares a los portadores de mutaciones en *BRCA2*, presentando tumores con elevada expresión de RE y RP y mayor prevalencia de amplificaciones en HER2 (18%, Tabla 6).

Atendiendo al inmunofenotipo, 112 de los 270 CMs estudiados (41,5%) son del tipo Luminal A, 46 (17,0%) son Luminal B, 33 (12,2%) HER2 y 79 (29,5%) Triple Negativo (TN). El inmunofenotipo mayoritario en los tumores portadores de mutaciones en *BRCA1* es el TN, que representa el 62% de los tumores del grupo (Tabla 6). Los grupos *BRCA2*, BRCAX y CME presentan perfiles similares, siendo el inmunofenotipo Luminal A el mayoritario en los tres grupos con prevalencias del 50%, 49% y 42%, respectivamente. El porcentaje de TN en estos tres grupos es del orden del 22% y la mayor diferencia entre ellos se observa para el inmunofenotipo HER2, que es más frecuente en los grupos BRCAX y CME.

**Tabla 6.** Distribución de los marcadores inmunohistoquímicos entre los grupos de estudio.

		GRUPOS					
Parámetros		BRCA1	BRCA2	BRCAX	ESPORÁDICO	$\chi^2$	
		Pos(%)n	Pos(%)n	Pos(%)n	Pos(%)n	p	
Marcadores IHQ	RE	14(30)48	29(74)39	52(69)45	81(70)115	<0,001	
	PR	10(21)48	23(58)40	47(63)74	67(59)114	<0,001	
	HER2	2(4)48	2(5)40	13(18)74	21(18)114	0,03	
	Ki67	33(69)48	14(35)40	25(34)73	46(42)110	0,002	
	CK5/6	17(35)48	5(13)39	11(15)71	21(20)107	0,02	
	CK18	40(91)44	35(97)36	62(94)66	97(92)105	n.s.	
	EGFR	8(18)44	0(0)34	4(7)57	15(15)101	0,04	
	Caderina-E	44(98)45	35(92)38	68(96)71	100(95)105	n.s.	
FENOTIPOS	Luminal A	9(19)48	19(50)38	36(49)73	47(42)111	<0,001	
	Luminal B	7(15)48	8(21)38	9(12)73	21(19)111		
	HER2	2(4)48	2(5)38	12(17)73	19(17)111		
	TN	30(62)48	9(24)38	16(22)73	24(22)111		

IHQ: Inmunohistoquímico; Pos: número de casos positivos para la expresión del marcador. En el caso de Ki67 indica el número de casos con índice proliferativo alto; n: número total de casos; TN: Triple negativo; n.s.: No significativo. Las proporciones entre grupos se contrastan aplicando el test  $\chi^2$ .

El análisis multivariante obtenido introduciendo en el modelo los marcadores IHQs y tomando como grupo de referencia al CME, selecciona como parámetros que mejor diferencian los grupos a los marcadores RE, CK18 y HER2. La positividad para RE y CK18 permite diferenciar los CMEs de los portadores de mutaciones en *BRCA1* (OR=0.12,  $p<0.001$  y OR=10.70,  $p=0.03$ ; respectivamente; Tabla 7). HER2 presenta muy baja proporción de amplificaciones en los grupos BRCA1 y BRCA2 frente al BRCAX y CME aunque la diferencia no alcanza los límites de significación.

**Tabla 7.** Diferencias en los perfiles inmunohistoquímicos entre los cuatro grupos. Regresión logística multinomial paso a paso atrás.

		GRUPOS											
		BRCA1 (n=40)			BRCA2 (n=34)			BRCAX (n=62)			ESPORÁDICO (n=97)		
		Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)		
IHC	RE	14(35)	0,12	<0,001	28(82)	0,39	n.s.	51(82)	0,74	n.s.	80(82)		
	HER2	2(5)	0,16	n.s.	2(6)	0,91	n.s.	13(21)	1,56	n.s.	20(21)		
	CK18	39(98)	10,7	0,03	33(97)	3,30	n.s.	58(94)	1,52	n.s.	89(92)		

n: número total de casos; Pos: número de casos que presentan expresión del marcador; OR: Odds ratio; *p*: *p* valor regresión logística multinomial; n.s.: No significativo. El CME se toma como grupo de referencia en el estudio de regresión logística multinomial.

## 2. Parámetros Moleculares

### 2.1. Variación en el número de copias

En la Tabla 8 se recoge la prevalencia de variaciones genéticas (ganancias y pérdidas) encontradas para cada uno de los genes en los diferentes grupos de estudio. Se han hallado alteraciones en todos los genes estudiados que han sido en su mayoría ganancias. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos en la VNC para *AURKA*, *MYC*, *CPD* y *ERBB2* (Tabla 8). Los dos primeros genes muestran mayor frecuencia de alteraciones en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1*, presentando un 41% de alteraciones en *AURKA* y un 67% en *MYC*. Cabe resaltar, que en el caso de *AURKA*, el 74% de las alteraciones encontradas en las pacientes con mutaciones en *BRCA1* son deleciones (14 de 19). Contrariamente, *MYC* presenta preferentemente ganancias en las pacientes de este grupo. *CPD*, presenta una menor prevalencia de alteraciones en el grupo BRCA1 (9%) frente a los grupos BRCA2 y BRCAX que presentan mayores prevalencias de alteraciones (29% y 28%, respectivamente). Por último, los CMEs son los que presentan mayor prevalencia de alteraciones en *ERBB2*

(45%) diferenciándose de los tumores hereditarios (grupos BRCA1 y BRCA2) que muestran una menor proporción de alteraciones (24% y 20%, respectivamente; Tabla 8).

**Tabla 8.** Alteraciones genéticas (VNC) entre los grupos de estudio.

	GRUPOS				$\chi^2$ <i>p</i>
	BRCA1 (N=46)	BRCA2 (N=35)	BRCA1 (N=69)	ESPORÁDICO (N=103)	
GENES VNC	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
ADAM9	9 (20)	14 (40)	22 (32)	25 (24)	n.s.
AURKA	19 (41)	8 (23)	10 (15)	17 (17)	0,002
BIRC5	20 (44)	18 (51)	23 (33)	45 (44)	n.s.
CCND1	21 (46)	13 (37)	32 (46)	41(40)	n.s.
CCNE1	6 (13)	9 (26)	9 (13)	14 (14)	n.s.
CDC6	7 (15)	11 (31)	20 (29)	36 (35)	n.s.
CDH1	10 (22)	8 (23)	18 (26)	19 (18)	n.s.
CPD	4 (9)	10 (29)	19 (28)	18 (18)	0,044
EGFR	5 (11)	7 (20)	8 (12)	17 (17)	n.s.
EMSY	13 (28)	9 (26)	24 (35)	36 (35)	n.s.
ERBB2	11 (24)	7 (20)	26 (38)	46 (45)	0,016
ESR1	5 (11)	4 (11)	9 (13)	6 (6)	n.s.
FGFR1	11 (24)	10 (29)	17 (25)	41 (40)	n.s.
IKBKB	11 (24)	9 (26)	16 (23)	36 (35)	n.s.
MAPT	12 (26)	12 (34)	17 (25)	35 (34)	n.s.
MED1	13 (28)	10 (29)	26 (38)	49 (48)	n.s.
MTDH	14 (34)	14 (40)	19 (28)	35 (34)	n.s.
MYC	32 (67)	16 (46)	23 (33)	39 (38)	0,002
PRDM14	10 (22)	14 (40)	18 (26)	39 (38)	n.s.
TOP2A	6 (13)	2 (6)	12 (17)	16(16)	n.s.

VNC: Variaciones en el número de copias; N: número total de casos; n: número de casos que presentan alteraciones (ganancias o pérdidas) del gen. Las proporciones entre grupos se contrastan aplicando el test  $\chi^2$ ; n.s.: No significativo.

La regresión logística multinomial de las alteraciones moleculares en los cuatro grupos selecciona un perfil de las variables VNC de *AURKA* ( $p=0.01$ , OR=3.57), *ERBB2* ( $p=0.03$ , OR=0.39), *MYC* ( $p<0.001$ , OR=4.40) y *PRDM14* ( $p=0.03$ , OR=0.36), que permiten diferenciar el grupo BRCA1 del CME (Tabla 9).



La presencia de alteraciones en *ERBB2* Y *PRDM14* se asocia con el CME, mientras que las alteraciones en *AURKA* y *MYC* se presentan en mayor proporción en los CMs del grupo BRCA1. El gen *ERBB2* es el que mejor diferencia el grupo BRCA2 del CME (OR=0.27,  $p=0.01$ ) presentando una mayor proporción de ganancias en el CME. Finalmente, el grupo BRCA1 no presenta alteraciones genéticas que permitan diferenciarlo del CME.

**Tabla 9.** Alteraciones genéticas (VNC) que mejor diferencian el CME (Referencia) de los grupos de estudio restantes. Regresión logística multinomial paso a paso atrás.

		GRUPOS									
		BRCA1 (n=46)			BRCA2 (n=35)			BRCA1 (n=69)			ESPORÁDICO (n=103)
GEN	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	
VNC	AURKA	19(41)	3,57	0,01	8(23)	1,16	n.s.	10(15)	0,85	n.s.	17(17)
	CPD	4(9)	0,32	n.s.	10(29)	1,78	n.s.	19(28)	2,60	n.s.	18(18)
	ERBB2	11(24)	0,39	0,03	7(20)	0,27	0.03	26(38)	0,85	n.s.	46(45)
	MYC	32(67)	4,40	<0,001	16(46)	1,62	n.s.	23(33)	0,72	n.s.	39(38)
	PRDM14	10(22)	0,36	0,03	14(40)	0,96	n.s.	18(27)	0,48	n.s.	39(38)

n: número total de casos; Pos: número de casos que presentan VNC; OR: Odds ratio; *p*: *p* valor regresión logística multinomial; n.s.: No significativo. El CME se toma como grupo de referencia en el estudio de regresión logística multinomial.

## 2.2. Metilación de genes supresores tumorales

Se han detectado metilaciones en todos los promotores génicos estudiados. El promotor de *CDH13* se presenta frecuentemente metilado en todos los grupos, y, que por el contrario, la metilación de *CD44* muestra escasa prevalencia (Tabla 10).

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la prevalencias de metilación entre los grupos en los genes *APC* y *RASSF1* ( $p=0.044$  y  $p<0.001$  respectivamente; Tabla10). El 81 % de los CMEs presentan metilación en el promotor de *APC* mientras que el resto de grupos presentan prevalencias en torno al 65%. El 38% de los tumores portadores de mutaciones

en *BRCA1* presentan metilación de *RASSF1* frente a un 64% de los tumores de los grupos BRCA2 y BRCA1, y un 78% de los CMEs.

**Tabla 10.** Metilación para cada uno de los genes estudiados en los diferentes grupos de estudio.

GENES MS	GRUPOS				$\chi^2$ p
	BRCA1 (N=45)	BRCA2 (N=33)	BRCA1 (N=66)	ESPORÁDICO (N=96)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
APC	28 (62)	21 (64)	44 (67)	78 (81)	0,044
ATM	15 (33)	16 (49)	34 (52)	43 (45)	n.s.
BRCA1	4 (9)	5 (15)	8 (12)	12 (13)	n.s.
BRCA2	3 (7)	7 (21)	15 (23)	12 (13)	n.s.
CASP8	10 (22)	11 (33)	13 (20)	26 (27)	n.s.
CD44	1 (2)	0 (0)	3 (5)	2 (2)	n.s.
CDH13	40 (90)	24 (73)	48 (73)	75 (78)	n.s.
CDKN1B	3 (7)	6 (18)	12 (18)	15 (16)	n.s.
CDKN2A	21 (47)	15 (46)	26 (39)	44 (46)	n.s.
CDKN2B	5 (11)	7 (21)	10 (15)	11 (12)	n.s.
CHFR	3 (7)	8 (24)	13 (20)	22 (23)	n.s.
DAPK1	9 (20)	15 (46)	21 (32)	23 (24)	n.s.
ESR1	2 (4)	2 (6)	8 (12)	7 (7)	n.s.
FHIT	3 (7)	6 (18)	3 (5)	10 (10)	n.s.
GSTP1	12 (27)	16 (49)	24 (36)	35 (37)	n.s.
HIC1	6 (13)	4 (12)	11 (17)	12 (13)	n.s.
IGSF4	3 (7)	2 (6)	7 (11)	9 (9)	n.s.
MLH1	2 (4)	5 (15)	10 (15)	14 (15)	n.s.
PTEN	10 (22)	6 (18)	18 (27)	26 (27)	n.s.
RARB1	4 (9)	6 (18)	6 (9)	8 (8)	n.s.
RASSF1	17 (38)	21 (64)	41 (64)	75 (78)	<0,001
TIMP3	4 (9)	2 (6)	14 (21)	12 (13)	n.s.
TP73	9 (20)	6 (18)	9 (14)	12 (13)	n.s.
VHL	3 (7)	6 (18)	4 (6)	12 (13)	n.s.

MS: Metilación; N: número total de casos; n: número de casos que presentan metilación en el promotor del gen; n.s.: No significativo. Las proporciones entre grupos se contrastan aplicando el test  $\chi^2$ .

La regresión logística multinomial selecciona el perfil formado por los genes *TIMP3*, *CDH13*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *DAPK1* y *RASSF1*. La metilación en *CDH13*, (OR=4.60,  $p=0.01$ ), *RASSF1* (OR=0.13,  $p<0.001$ ) y *DAPK1* (OR=3.43,  $p=0.01$ ; Tabla 11) permite diferenciar el grupo de referencia (CME) de alguno de los otros grupos. Los dos primeros genes diferencian los CMEs de los del grupo BRCA1, siendo los tumores portadores de mutaciones en *BRCA1* los que presentan mayor prevalencia de metilación en *CDH13* y menor en *RASSF1*. La metilación en *DAPK1* diferencia el grupo BRCA2 del CME, presentando mayor prevalencia de metilaciones los CM portadores de mutaciones en *BRCA2*. El modelo no permite diferenciar los CMEs de los BRCAx.

**Tabla 11.** Perfiles de metilación que mejor diferencian el CME (Referencia) de los grupos de estudio restantes. Regresión logística multinomial paso a paso atrás.

		GRUPOS									
		BRCA1 (n=45)			BRCA2 (n=33)			BRCAx (n=66)			ESPORÁDICO (n=96)
GEN		Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)	OR	<i>p</i>	Pos(%)
Metilación	BRCA2	3(7)	0,39	n.s.	7(21)	1,97	n.s.	15(23)	2,22	n.s.	12(13)
	CDH13	40(89)	4,60	0,01	24(73)	0,75	n.s.	48(73)	0,67	n.s.	75(78)
	CDKN2A	21(47)	1,86	n.s.	15(46)	0,73	n.s.	26(39)	0,50	n.s.	44(46)
	DAPK1	9(20)	0,72	n.s.	15(46)	3,43	0,01	21(32)	1,67	n.s.	23(24)
	RASSF1	17(38)	0,13	<0,001	21(64)	0,44	n.s.	41(64)	0,52	n.s.	75(78)
	TIMP3	4(9)	0,46	n.s.	2(6)	0,30	n.s.	14(21)	1,79	n.s.	12(13)

n: número total de casos; Pos: número de casos que presentan metilación en el gen; OR: Odds ratio; *p*: *p* valor regresión logística multinomial; n.s.: No significativo. El CME se toma como grupo de referencia en el estudio de regresión logística multinomial.



## II. Expresión de miRs en los los grupos de estudio

### 1. Estudio de expresión de miRs

Para identificar los patrones de expresión de miRs propios de cada uno de los grupos se analizó la expresión de 1733 miRs en 20 muestras (5 BRCA1, 5 BRCA2, 5 BRCAX y 5 CMEs) empleando los arrays de expresión Genechip miRNA 3.0 (Affymetrix). Este análisis seleccionó un total de 40 miRs que presentaban diferencias en las medias de expresión entre los cuatro grupos ( $p < 0.01$ ; Tabla 12; Figura 9). Ventiuno de estos miRs mostraron la máxima expresión en el grupo BRCA1, seis en el grupo BRCA2, seis en BRCAX y siete en el grupo CME. El análisis de PCA (Figura 10) revela que el perfil de expresión de los 40 miRs seleccionados diferencia claramente los grupos de estudio.

El análisis discriminante efectuado sobre los 40 miRs seleccionados mediante el software PARTEK seleccionó los miRs 4713-5p, 4731-5p, 30a, 590-5p y 361-5p por su mayor capacidad para diferenciar los cuatro grupos (Anexo 10).

**Tabla 12.** Niveles de expresión de los 40 miRs diferencialmente expresados entre los grupos de estudio ( $p < 0.01$ )

miRs	GRUPOS			
	BRCA1	BRCA2	BRCAX	ESPORÁDICO
	(n=5) $\bar{X}$ (DT)	(n=5) $\bar{X}$ (DT)	(n=5) $\bar{X}$ (DT)	(n=5) $\bar{X}$ (DT)
hsa-miR-3960	14,36 (0,31)	14,13 (0,30)	13,46 (0,35)	13,77 (0,38)
hsa-miR-3665	14,17 (0,29)	13,90 (0,29)	13,24 (0,39)	13,50 (0,33)
hsa-let-7b	13,65 (0,48)	13,98 (0,38)	14,54 (0,14)	14,40 (0,25)
hsa-let-7c	12,59 (0,40)	12,84 (0,43)	13,65 (0,15)	13,28 (0,44)
hsa-miR-4417	9,97 (1,06)	8,62 (1,12)	6,11 (0,97)	7,11 (1,12)
hsa-miR-3651	8,86 (0,39)	8,67 (0,49)	7,73 (0,31)	8,32 (0,60)
hsa-miR-1246	8,32 (0,76)	8,77 (1,16)	6,80 (0,90)	7,39 (0,59)
hsa-miR-361-5p	7,96 (1,10)	9,46 (0,11)	9,78 (0,42)	9,17 (0,58)
hsa-miR-30a	6,81 (1,25)	7,97 (0,96)	9,52 (0,94)	9,33 (1,03)
hsa-miR-423-3p	6,71 (0,34)	8,20 (0,33)	7,41 (0,44)	7,82 (0,58)
hsa-miR-652	6,48 (0,77)	8,37 (0,61)	7,88 (0,20)	7,60 (1,17)
hsa-miR-1972	6,26 (0,51)	5,43 (0,58)	4,74 (0,56)	4,94 (0,73)
hsa-miR-4498	5,82 (0,39)	5,20 (0,61)	4,19 (0,26)	5,04 (0,39)
hsa-miR-4470	4,90 (0,43)	2,66 (0,82)	2,44 (1,33)	2,27 (0,69)
hsa-miR-3124-5p	4,09 (0,46)	4,47 (0,87)	2,66 (0,71)	3,54 (0,69)
hsa-miR-4498	4,08 (0,71)	2,91 (0,80)	2,27 (0,50)	2,42 (0,71)
hsa-let-7b*	3,93 (0,48)	3,43 (0,34)	2,87 (0,27)	2,51 (0,70)
hsa-miR-30a*	3,82 (1,91)	5,50 (1,02)	7,34 (0,77)	6,85 (1,20)
hsa-miR-129-5p	3,61 (0,88)	2,20 (0,62)	1,67 (0,51)	1,96 (0,19)
hsa-miR-1237	3,31 (0,72)	2,75 (0,44)	2,08 (0,48)	2,40 (0,23)
hsa-miR-3944-3p	3,30 (0,64)	2,84 (0,46)	1,91 (0,46)	2,34 (0,22)
hsa-miR-5096	3,15 (0,60)	2,21 (0,87)	1,49 (0,86)	1,91 (0,51)
hsa-miR-1471	2,90 (0,54)	1,71 (0,44)	1,81 (0,67)	1,63 (0,23)
hsa-miR-1343	2,59 (0,64)	1,79 (0,48)	1,13 (0,68)	1,27 (0,29)
hsa-miR-668	2,58 (0,47)	2,16 (0,21)	1,62 (0,39)	1,82 (0,46)
hsa-miR-34b	2,17 (0,20)	1,87 (0,19)	1,38 (0,25)	1,34 (0,55)
hsa-miR-1208	2,16 (0,43)	1,24 (0,39)	1,02 (0,20)	1,61 (0,72)
hsa-miR-4713-5p	2,02 (0,36)	1,55 (0,22)	2,47 (0,49)	1,43 (0,29)
hsa-miR-4731-5p	1,94 (0,50)	1,26 (0,22)	0,87 (0,11)	1,07 (0,13)
hsa-miR-187-3p	1,76 (1,70)	1,58 (0,85)	2,87 (3,91)	6,80 (2,15)
hsa-miR-1286	1,56 (0,50)	1,02 (0,29)	0,50 (0,20)	0,80 (0,31)
hsa-miR-1273c	1,32 (0,13)	1,29 (0,25)	1,08 (0,24)	1,71 (0,40)
hsa-miR-4709-5p	0,97 (0,18)	0,70 (0,24)	1,03 (0,15)	0,73 (0,11)
hsa-miR-590-5p	0,96 (0,14)	0,77 (0,19)	0,68 (0,14)	0,56 (0,14)
hsa-miR-3913-3p	0,72 (0,17)	0,67 (0,16)	1,14 (0,18)	0,90 (0,29)
hsa-miR-4527	0,63 (0,05)	0,97 (0,34)	0,56 (0,25)	0,45 (0,17)
hsa-miR-222	0,62 (0,15)	1,09 (0,28)	0,89 (0,26)	0,84 (0,15)
hsa-miR-452	0,49 (0,17)	0,63 (0,29)	0,78 (0,21)	1,13 (0,42)
hsa-miR-520c-5p	0,42 (0,15)	0,68 (0,23)	0,57 (0,16)	1,05 (0,37)
hsa-miR-519b-5p	0,40 (0,09)	0,68 (0,07)	0,72 (0,18)	1,11 (0,48)

$\bar{X}$ : Media de los niveles de expresión; DT: Desviación típica

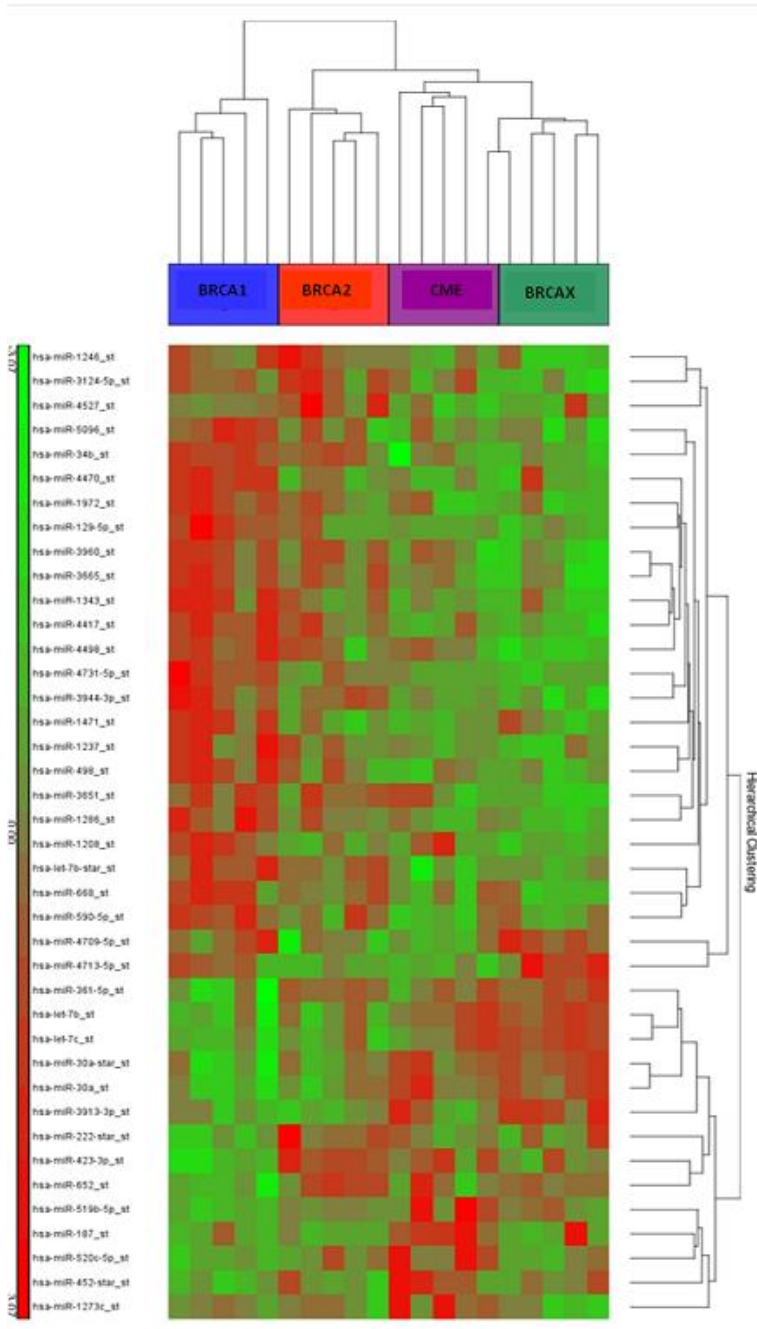
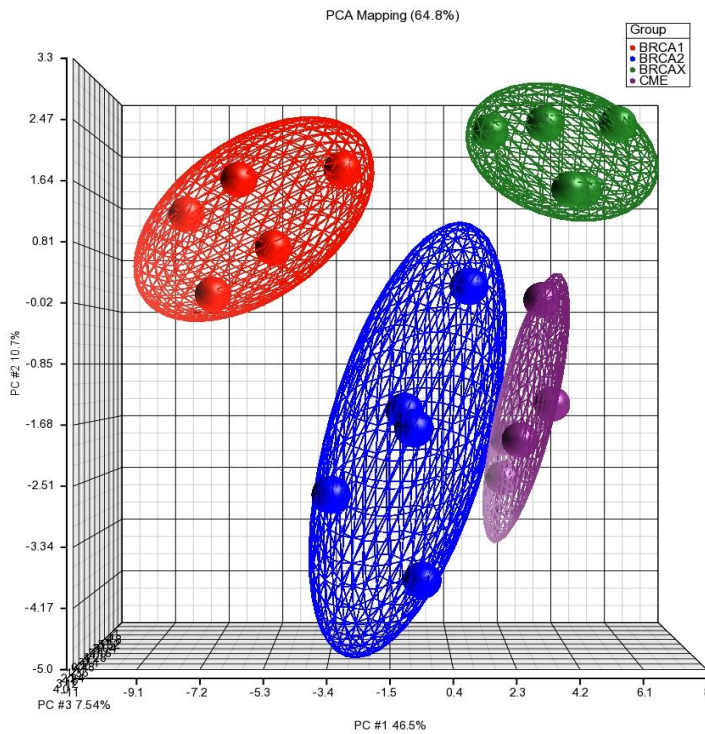


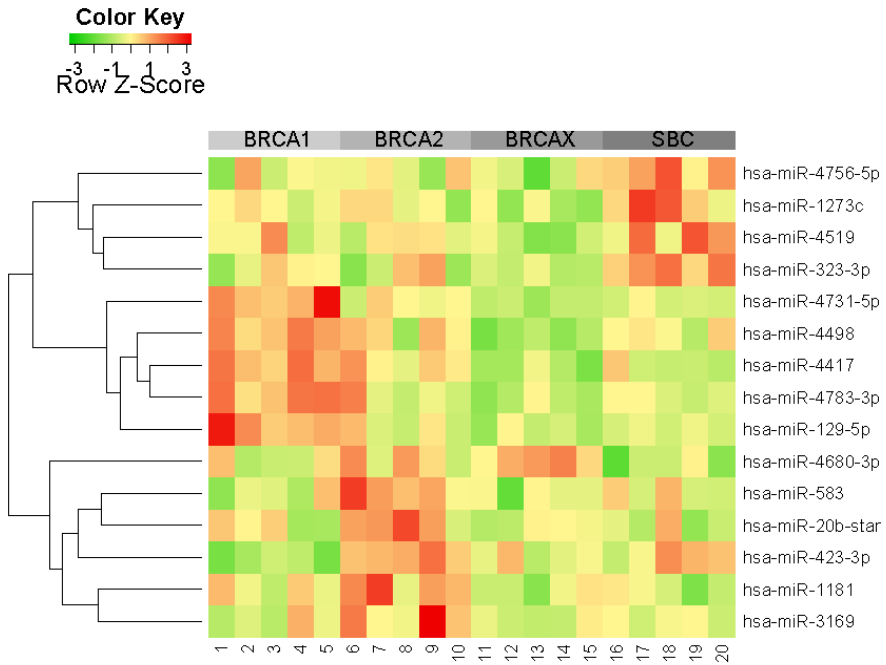
Figura 9. Cluster jerárquico de los niveles de expresión de los 40 miRNAs que presentan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre dos o más de los grupos.



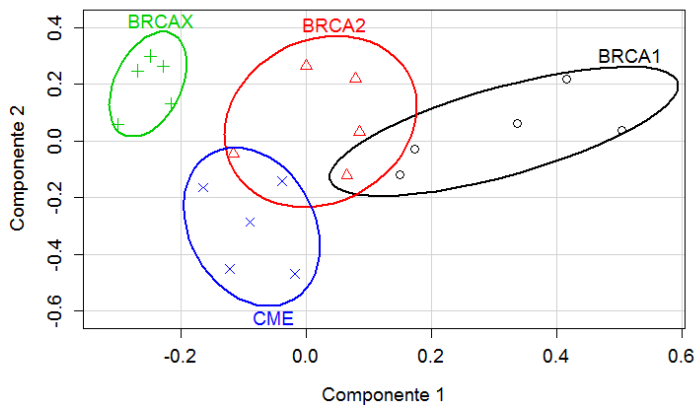
**Figura 10. Análisis de componentes principales.** Representación de la separación de las muestras en base a los niveles de expresión de los 40 miRs diferencialmente expresados ( $p < 0.01$ ).

El procedimiento sPLS-DA seleccionó 15 miRs entre todos los estudiados que mejor diferencian los grupos de estudio (Figura 11). Cuatro miRs se encuentran hiperexpresados en el CME, cinco en el grupo BRCA1 y seis en el BRCA2. Todos estos miRs se encuentran hipoxpresados en el grupo BRCA2. El perfil de expresión de estos 15 miRs clasifica correctamente la práctica totalidad de las pacientes en sus grupos respectivos (Figura 12).





**Figura 11.** Cluster jerárquico representativo de los miRNAs seleccionados mediante el procedimiento sPLS-DA que mejor diferencian los grupos de estudio.



**Figura 12.** Clasificación de las muestras obtenida mediante el procedimiento sPLS-DA.

Los softwares PARTEK y SPLS coincidieron en señalar seis miRs por su mayor capacidad discriminante para diferenciar los grupos de estudio. Los miRs 4417, 4731-5p, 129-5p y 4498 presentaron hiperexpresión en los tumores del grupo BRCA1, el 423-3p en los tumores portadores de mutaciones en *BRCA2* y, por último, el 1273c presenta hiperexpresión en los CMEs.

### **2. Selección y validación de los miRs mediante RT-qPCR**

Para los estudios de validación se seleccionaron 16 miRs que presentaron niveles de expresión medios claramente diferentes entre los grupos de estudio. Nueve de estos miRs fueron seleccionados en base a que presentaban diferencias estadísticas ( $p < 0.01$ ) con el software PARTEK y diferencias entre los niveles medios de expresión de al menos dos veces de cambio (FC) (Anexo 11). Cuatro miRs (4713-5p, 4731-5p, 590-5p y 361-5p) se seleccionaron aplicando la función discriminante (Anexo 10) y, finalmente, tres miRs (4498, 1273c y 423-3p) se escogieron por ser seleccionados conjuntamente por el programa PARTEK y el análisis SPLDs.

Seis de estos miRs (4722-5p, 4725-3p, 3131, 4713, 4731 y 371b) tuvieron que excluirse de los análisis por presentar un bajo nivel de expresión que impedía su cuantificación por RT-qPCR. Los niveles de expresión de los 10 miRs restantes se cuantificaron mediante RT-qPCR empleando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>176</sup>. Estos 10 miRs se analizaron en 74 muestras (16 CMs BRCA1, 12 CMs BRCA2, 16 CMs BRCAX y 30 CMEs) y en base a los resultados obtenidos se seleccionaron los miRs 4417, 423-3p, 187-3p y 590-5p por ser los que mejor diferenciaban los cuatro grupos en las 74 muestras estudiadas. Estos cuatro miRs fueron estudiados en un total de 270 CMs (48 BRCA1, 38 BRCA2, 73 BRCAX y 111 CMEs).

### 3. Expresión de los miRs seleccionados en los grupos de estudio

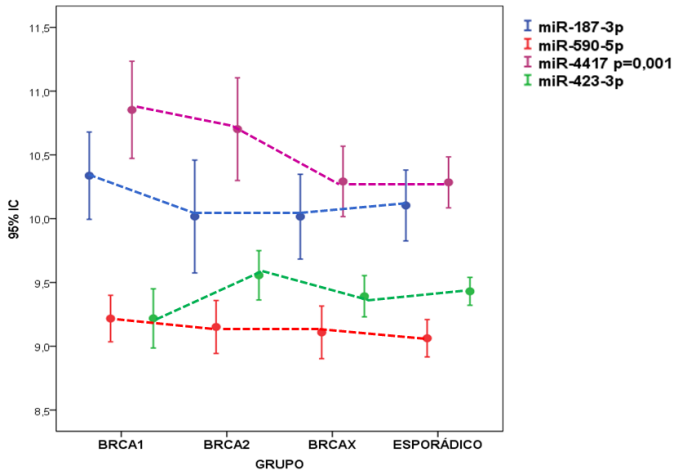
El contraste de las medias de expresión de los cuatro miRs entre los grupos de estudio mediante ANOVA evidencia diferencias significativas en los niveles de expresión del miR-4417 ( $p=0.01$ , Tabla 13 y Figura 13). El nivel de expresión de este miR permite diferenciar los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* de los CMs BRCAX y CMEs (Tukey:  $p=0.05$  y  $p=0.03$  respectivamente). Sin embargo, las medias de expresión del resto de los miRs analizados mediante RT-qPCR son similares para los cuatro grupos.

**Tabla 13.** Expresión media de los miRNA en los grupos estudiados

miRs	GRUPOS				<i>P</i>
	BRCA1 (n=48)	BRCA2 (n=38)	BRCAX (n=73)	ESPORÁDICO (n=111)	
	$\bar{X}$ (DT)	$\bar{X}$ (DT)	$\bar{X}$ (DT)	$\bar{X}$ (DT)	
<b>miR-187-3p</b>	10,3 (1,2)	10,0 (1,35)	10,0 (1,4)	10,1 (1,5)	ns
<b>miR-423-3p</b>	9,2 (0,9)	9,6 (0,62)	9,4 (0,8)	9,4 (0,6)	ns
<b>miR-590-5p</b>	9,2 (0,6)	9,2 (0,63)	9,1 (0,8)	9,1 (0,8)	ns
<b>miR-4417</b>	10,9 (1,3)	10,0 (1,22)	10,3 (1,2)	10,3 (1,6)	0,001

$\bar{X}$ : media de expresión; DT: Desviación típica; *p*: Significación estadística en el test de comparación de medias ANOVA; ns: no significativo.

La regresión logística multinomial tomando el CME como referencia y los cuatro miRs como covariables, selecciona la expresión del miR-4417 (OR=0.60,  $p=0.002$ ) y del miR-423-3p (OR=2.70,  $p=0.001$ ) como covariables que mejor diferencian los grupos de estudio. Los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan mayor nivel de expresión del miR-4417 y menor del miR-423-3p en comparación con el CME (Tabla 14).



**Figura 13.** Promedio de los niveles de expresión de los miR en los diferentes grupos. El miR-4417 presenta el mayor nivel de expresión en el grupo BRCA1 y el miR-423-3p la expresión más baja.

**Tabla 14.** Expresión de los microRNAs que mejor diferencian los grupos. Regresión logística multinomial

miRs	GRUPO									
	BRCA1 (n=48)			BRCA2 (n=38)			BRCAx (n=73)			ESPORÁDICO (n=111)
	$\bar{X}$ (DT)	OR	p	$\bar{X}$ (DT)	OR	p	$\bar{X}$ (DT)	OR	p	$\bar{X}$ (DT)
miR-4417	10,9 (1,3)	0,6	0,002	10,7 (1,2)	0,1	n.s.	10,3(1,2)	0,3	n.s.	10,3 (1,1)
miR-423-3p	9,2 (0,9)	2,7	0,001	9,6 (0,6)	0,1	n.s.	9,4 (0,8)	0,1	n.s.	9,4 (0,6)

$\bar{X}$ : media de expresión; DT: Desviación típica; OR: Odds ratio; p: p valor regresión logística multinomial; n.s.: No significativo. El CME se toma como grupo de referencia en el estudio de regresión logística multinomial.

#### **4. Relación de la expresión de miRs con los parámetros inmunohistoquímicos e inmunofenotipo.**

El ANOVA revela una clara asociación de la expresión de los miRs con algunas de las características inmunohistoquímicas. Así, los tumores RE negativos presentan una mayor expresión de los miRs 187-3p, 590-5p y 4417, y menor expresión del miR-423-3p ( $p=0,01$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,02$  y  $p<0,001$ , respectivamente; Tabla 15; Figura 14). La presencia de RP se asocia con la menor expresión del miR-4417 y mayor expresión del miR-423-3p ( $p=0,04$  y  $p<0,001$ ). La amplificación de HER2 se relaciona con una mayor expresión del miR-187-3p, la expresión de las CK5/6 y 18 se asocia con menor expresión de los miRs 423-3p y 590-5p, respectivamente ( $p=0,01$  y  $0,03$ ) y, por último, los tumores que expresan EGFR presentan una mayor expresión del miR-4417 ( $p=0,02$ ; Tabla 15; Anexo 12).

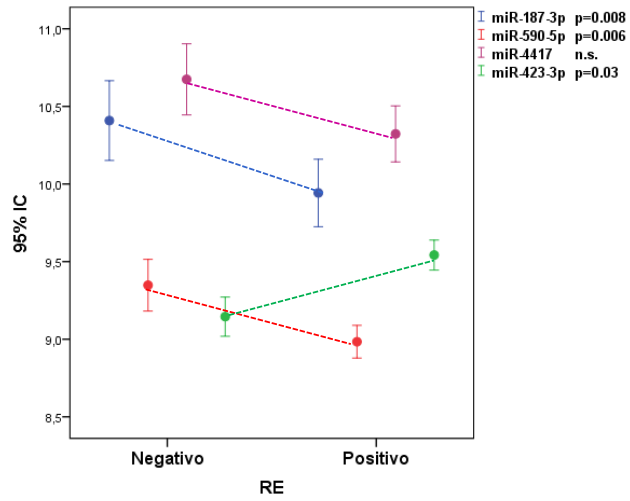
Asimismo, se observa asociación del inmunofenotipo con la expresión de los miRs 423-3p y 590-5p ( $p=0.005$  y  $p<0.001$ , respectivamente; Tabla 15). La expresión del miR-590-5p diferencia con claridad los fenotipos TN de los fenotipos Luminal A y B (Tukey:  $p=0.004$  y  $p=0.05$  respectivamente), mientras que la expresión del miR-423-3p diferencia el fenotipo TN del resto de inmunofenotipos (Tukey: Luminal A  $p<0.001$ , Luminal B  $p<0.001$  y Her2  $p=0.001$ ). Los CMs TN presentan una menor expresión del miR-423-3p en comparación con el resto de inmunofenotipos y mayor expresión del miR-590-5p que los fenotipos Luminal A y B.

El análisis ANOVA multifactorial incluyendo todos los marcadores IHQs selecciona como factor independiente la expresión de los RE, que está relacionada con la expresión de los miRs miR-187-3p, miR-590-5p y miR-423-3p ( $p=0,008$ ,  $p=0,006$  y  $p=0,03$ ; Figura 6; Anexo 13).

**Tabla 15.** Expresión media de los miRs y parámetros inmunohistoquímicos e inmunofenotipo.

MIHQ	n	miR-187-3p		miR-590-5p		miR-4417		miR-423-3p		
		$\bar{X}$ (SD)	p	$\bar{X}$ (SD)	p	$\bar{X}$ (SD)	p	$\bar{X}$ (SD)	p	
ER	-	98	10,4 (1,3)	<b>0,01</b>	9,4 (0,8)	<b>&lt;0,001</b>	10,7 (1,1)	<b>0,02</b>	9,1 (0,6)	<b>&lt;0,001</b>
	+	170	9,9 (1,4)		9,0 (0,7)		10,3 (1,2)		9,5 (0,6)	
PR	-	125	10,3 (1,4)	ns	9,2 (0,9)	ns	10,6 (1,2)	<b>0,04</b>	9,2 (0,7)	<b>&lt;0,001</b>
	+	143	9,9 (1,4)		9,1 (0,7)		10,3 (1,1)		9,5 (0,6)	
HER2	-	233	10,0 (1,4)	<b>0,03</b>	9,1 (0,8)	ns	10,4 (1,2)	ns	9,4 (0,7)	ns
	+	37	10,6 (1,4)		9,2 (0,7)		10,6 (1,1)		9,5 (0,7)	
Ki67	h	149	10,0 (1,41)	ns	9,0 (0,8)	ns	10,5 (1,1)	ns	9,5 (0,6)	ns
	l	117	10,2 (1,40)		9,2 (0,8)		10,4 (1,3)		9,3 (0,7)	
CK5-6	-	208	10,1 (1,4)	ns	9,1 (0,8)	ns	10,4 (1,2)	ns	9,5 (0,6)	<b>0,01</b>
	+	54	10,3 (1,4)		9,3 (0,8)		10,7 (1,3)		9,2 (0,8)	
CK18	-	17	10,2 (1,5)	ns	9,5 (0,8)	<b>0,03</b>	10,4 (0,7)	ns	9,3 (0,4)	ns
	+	231	10,1 (1,4)		9,1 (0,8)		10,4 (1,2)		9,4 (0,7)	
EGFR	-	209	10,2 (1,4)	ns	9,1 (0,8)	ns	10,4 (1,2)	<b>0,02</b>	9,4 (0,7)	ns
	+	27	10,1 (1,5)		9,3 (0,2)		11,0 (1,4)		9,4 (0,8)	
Cad-E	-	12	9,9 (0,8)	ns	8,8 (0,7)	ns	10,0 (0,9)	ns	9,2 (0,5)	ns
	+	244	10,1 (1,5)		9,2 (0,8)		10,5 (1,2)		9,4 (0,7)	
FENOTIPO	LA	112	9,9 (1,3)	<b>0,05</b>	8,9 (0,75)	<b>0,005</b>	10,4 (1,0)	ns	9,5 (0,6)	<b>&lt;0,001</b>
	LB	46	9,9 (1,6)		9,0 (0,64)		10,2 (1,4)		9,6 (0,8)	
	HER2	33	10,6 (1,5)		9,2 (0,67)		10,6 (1,2)		9,5 (0,7)	
	TN	79	10,3 (1,3)		9,4 (0,84)		10,7 (1,1)		9,0 (0,6)	

MIHQ: Marcador inmunohistoquímico;  $\bar{X}$ : media de expresión; DT: Desviación típica; Cad-E: Caderina-E; LA: Luminal A; LB: Luminal B; TN: Triple Negativo; n.s.: No significativo.



**Figura 14. Promedio de expresión de los microRNAs y RE.** p: p valor del ANOVA multifactorial.





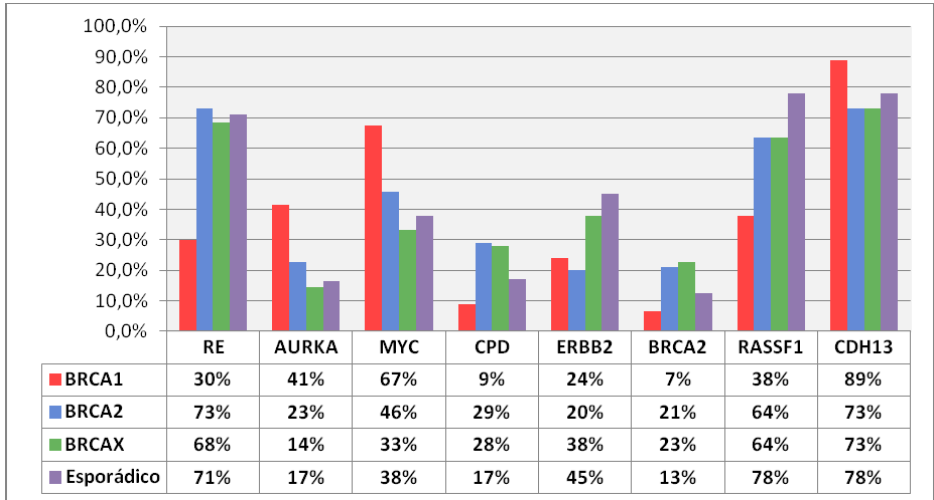
### III. Perfiles inmunohistoquímico y molecular de los grupos de estudio. Resultados de la regresión logística multinomial con los parámetros seleccionados

La regresión logística multinomial incluyendo todas las variables elegidas en las regresiones logísticas previas selecciona un perfil formado por la expresión de RE, la VNC en *AURKA*, *CPD*, *MYC* y *ERBB2* y la metilación de los promotores de *RASSF1*, *CDH13* y *BRCA2* (Tabla 16 y Figura 15). La expresión de RE (OR=0.21;  $p=0.003$ ), VNC de *MYC* (OR=3.11;  $p=0.02$ ) y *AURKA* (OR=3.23;  $p=0.03$ ) y la metilación en *RASSF1* (OR=0.26;  $p=0.01$ ), *CDH13* (OR: 3.70,  $p=0.05$ ) y *BRCA2* (OR=0.14;  $p=0.04$ ) diferencia los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* de los CMEs. Los tumores del grupo BRCA1 se caracterizan por presentar menor expresión de RE y mayor proporción de alteraciones en *AURKA* y *MYC* así como una menor frecuencia de metilación en *RASSF1* y *BRCA2* y mayor en *CDH13*. Los CMs portadores de mutaciones en *BRCA2* solamente se diferencian de los CMEs por presentar menor frecuencia de alteraciones en *ERBB2* (OR=0.26;  $p=0.01$ ). Finalmente, la presencia de alteraciones en *CPD* (OR=2.57;  $p=0.04$ ) y la metilación en *BRCA2* (OR=2.86;  $p=0.04$ ), permite diferenciar los tumores BRCAX de los CMEs. El modelo clasifica correctamente el 51,8% del total de casos, el 70,0% de los tumores del grupo BRCA1, el 13,3% de los BRCA2, el 32,76% de los BRCAX y el 68,9% de los CME (Tabla 17).

**Tabla 16.** Perfiles inmunohistoquímicos y moleculares globales que mejor diferencian cada uno de los grupos del CM esporádico (Referencia). Regresión logística multinomial paso a paso atrás.

GRUPOS											
Marcador	BRCA1 (n=40)				BRCA2 (n=30)			BRCA3 (n=58)			ESPORÁDICO (n=90)
	Pos(%)	OR	p	Pos(%)	OR	p	Pos(%)	OR	p	Pos(%)	
Marcadores IHQs y Moleculares	RE	14(30)	0,21	0,003	27(73)	1,20	n.s.	50(68)	1,42	n.s.	79(71)
	MYC	31(67)	3,11	0,02	16(46)	1,75	n.s.	23(33)	1,09	n.s.	39(38)
	CPD	4(9)	0,38	n.s.	10(29)	2,65	n.s.	19(28)	2,57	0,04	18(17)
	AURKA	19(41)	3,23	0,03	8(23)	1,46	n.s.	10(14)	0,61	n.s.	17(17)
	ERBB2	11(24)	0,41	ns	7(20)	0,26	0,01	26(38)	0,82	n.s.	46(45)
	CDH13	40(89)	3,70	0,05	24(73)	0,82	n.s.	48(73)	0,73	n.s.	75(78)
	BRCA2	3(7)	0,14	0,04	7(21)	1,58	n.s.	15(23)	2,86	0,04	12(13)
	RASSF1	17(38)	0,26	0,01	21(64)	0,40	n.s.	41(64)	0,46	n.s.	75(78)

n: número total de casos; Pos: número de casos que presentan expresión, VNC o metilación en el gen/marcador; OR: Odds ratio; p: p valor regresión logística multinomial; n.s.: No significativo. El CME se toma como grupo de referencia en el estudio de regresión logística multinomial



**Figura 15. Perfil de parámetros inmunohistoquímicos y moleculares que mejor diferencian cada grupo del CME.** Regresión logística multinomial de los resultados inmunohistoquímicos y moleculares

**Tabla 17.** Porcentaje de muestras correctamente clasificadas. Regresión logística multinomial paso a paso atrás del análisis conjunto de las determinaciones inmunohistoquímicas y moleculares.

Observado	Pronosticado				% correcto
	BRCA1	BRCA2	BRCA2X	ESPORADICO	
BRCA1	28	1	0	11	70,0%
BRCA2	3	4	9	14	13,3%
BRCA2X	7	2	19	30	32,8 %
ESPORADICO	8	3	17	62	68,9%
<b>% global</b>	<b>21,1%</b>	<b>4,6%</b>	<b>20,6%</b>	<b>53,7%</b>	<b>51,8%</b>



## IV. Perfiles inmunohistoquímico y molecular de los CMs TN

### 1. Parámetros Inmunohistoquímicos

Los CMs TN se caracterizan por la ausencia de expresión de RE, RP y HER2. Por el contrario, el 90% de los tumores No TN presentan expresión de RE, el 76% expresan RP y el 20% HER2. Asimismo, se observan diferencias significativas en las proporciones de marcadores expresados entre los dos grupos en el resto de parámetros IHQs estudiados. Los CMs TN presentan una mayor expresión del factor de proliferación celular Ki67, CK5/6, EGFR y la Caderina-E (Tabla 18).

**Tabla 18.** Distribución de los marcadores inmunohistoquímicos entre los tumores TN y No TN.

Marcadores IHQs	Inmunofenotipo		$\chi^2$ <i>p</i>
	TN Pos(%)n	No TN Pos(%)n	
RE	0(0)79	168(90)187	-
PR	0(0)79	142(76)187	-
HER2	0(0)79	37(20)187	-
Ki67	54(68)79	63(34)183	<0,001
CK5/6	37(47)79	17(10)179	<0,001
CK18	64(82)78	163(98)166	<0,001
EGFR	16(24)66	11(7)168	<0,001
Caderina-E	77(100)77	163(93)175	0,02

IHQs: Marcadores inmunohistoquímicos; Pos: número de casos positivos para la expresión del marcador inmunohistoquímico. En el caso de Ki67 indica el número de casos con índice proliferativo alto; n: número total de casos; n.s.: No significativo. Las proporciones entre grupos se contrastan aplicando el test  $\chi^2$ .

## 2. Parámetros Moleculares

### 2.1. Variación en el número de copias

Se han detectado diferencias entre los grupos en los porcentajes de VNC en *BIRC5*, *MYC*, *MTDH*, *CDC6* y *MED1*. Los tres primeros genes presentan mayor prevalencia de alteraciones en los tumores TN (Tabla 19), mientras que en los tumores No TN la mayor prevalencia de alteraciones se observa en *CDC6* y *MED1* (Tabla 19).

**Tabla 19.** Prevalencia de alteraciones genéticas (VNC) en los tumores TN y No TN.

GEN VNC	Inmunofenotipo		$\chi^2$ <i>p</i>
	TN (N=75) n (%)	No TN (N=174) n (%)	
ADAM9	20(27)	49(28)	n.s.
AURKA	19(25)	35(20)	n.s.
BIRC5	39(52)	67(39)	0,05
CCND1	27(36)	80(46)	n.s.
CCNE1	16(21)	22(13)	n.s.
CDC6	13(17)	61(35)	0,005
CDH1	20(27)	35(20)	n.s.
CPD	11(15)	39(22)	n.s.
EGFR	15(20)	22(13)	n.s.
EMSY	26(35)	55(32)	n.s.
ERBB2	21(28)	69(40)	n.s.
ESR1	10(13)	14(8)	n.s.
FGFR1	24(32)	55(32)	n.s.
IKBKB	28(37)	44(25)	n.s.
MAPT	21(28)	54(31)	n.s.
MED1	22(29)	75(43)	0,04
MTDH	31(41)	50(29)	0,05
MYC	48(64)	59(34)	<0,001
PRDM14	27(36)	53(31)	n.s.
TOP2A	6(8)	30(17)	n.s.

VNC: Variación en el número de copias; N: número total de casos; n: número de casos que presentan alteraciones (ganancias o pérdidas) del gen. Las proporciones entre grupos se contrastan aplicando el test  $\chi^2$ ; n.s.: No significativo

La regresión logística binaria selecciona la VNC de *CCND1*, *CDC6*, *CCNE1* y *MYC* como los genes que mejor diferencian los grupos, asociándose las alteraciones en *CCNE1* y en *MYC* con los tumores TN (Figura 16) mientras que las alteraciones en *CCND1* y *CDC6* son más abundantes en los tumores No TN (Figura 16).

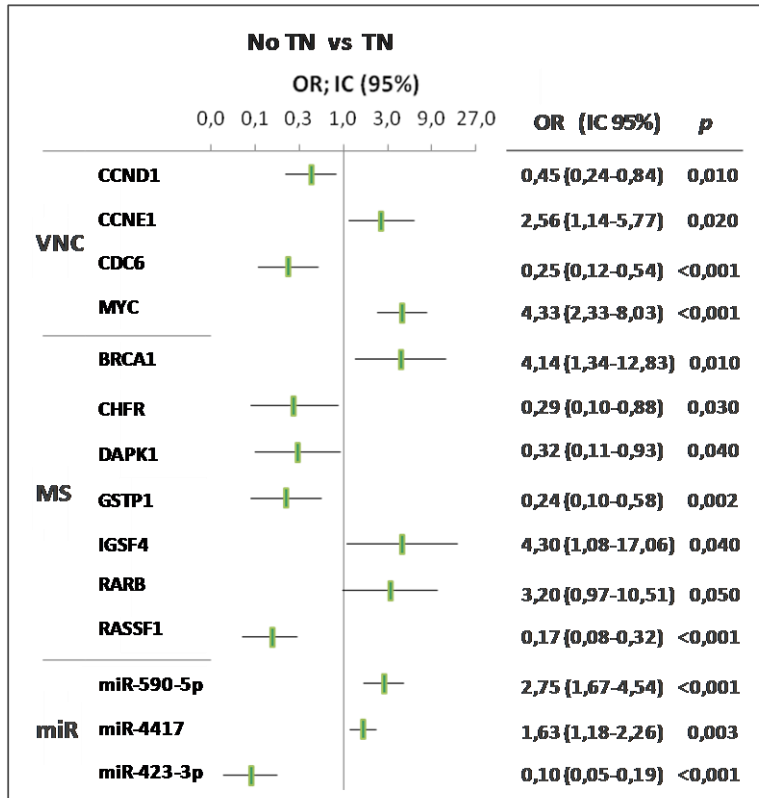


Figura 16. Perfiles de VNC, metilación y expresión de microRNAs que mejor diferencian los CMs No TN y los TN. Regresión logística binaria. OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza; p: p valor regresión logística binaria; TN: Triple Negativo; MS: metilación.

## 2.2. Metilación en genes supresores tumorales

La presencia de metilación en los promotores génicos estudiados, presenta diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en *BRCA1*, *DAPK1*, *ESR1*, *GSTP1*, *HIC1* y *RASSF1* (Tabla 20); caracterizándose los tumores TN por presentar una menor prevalencia de metilaciones en todos ellos excepto en los promotores de *BRCA1* y *ESR1*.

**Tabla 20.** Prevalencia de metilación en promotores entre los CM TN y No TN

GEN Metilación	Inmunofenotipo		$\chi^2$ <i>p</i>
	TN (N=71) n (%)	No TN (N=166) n (%)	
APC	46(65)	122(74)	n.s.
ATM	25(35)	80(48)	n.s.
BRCA1	14(20)	15(9)	0,02
BRCA2	11(16)	25(15)	n.s.
CASP8	15(21)	45(27)	n.s.
CD44	3(4)	3(2)	n.s.
CDH13	51(72)	133(80)	n.s.
CDKN1B	9(13)	26(16)	n.s.
CDKN2A	29(41)	76(46)	n.s.
CDKN2B	8(11)	23(14)	n.s.
CHFR	9(13)	37(22)	n.s.
DAPK1	10(14)	56(34)	0,002
ESR1	10(14)	6(5)	0,02
FHIT	9(10)	15(9)	n.s.
GSTP1	12(17)	75(45)	<0,001
HIC1	5(7)	28(17)	0,05
IGSF4	7(10)	13(8)	n.s.
MLH1	8(11)	21(13)	n.s.
PTEN	15(21)	45(27)	n.s.
RARB1	8(11)	16(10)	n.s.
RASSF1	24(34)	130(78)	<0,001
TIMP3	11(16)	21(13)	n.s.
TP73	12(17)	23(14)	n.s.
VHL	5(7)	19(11)	n.s.

N: número total de casos; n: número de casos que presentan metilación en el promotor del gen. Las proporciones entre grupos se contrastan aplicando el test  $\chi^2$ ; n.s.: No significativo.



La regresión logística binaria asocia la metilación en los promotores de *BRCA1*, *IGSF4* y *RARB* con los tumores TN (Figura 16), en tanto que la metilación de *CHFR*, *DAPK1*, *GSTP1* y *RASSF1* es más frecuente en los tumores no TN (Figura 16).

### 2.3. Expresión de miRs

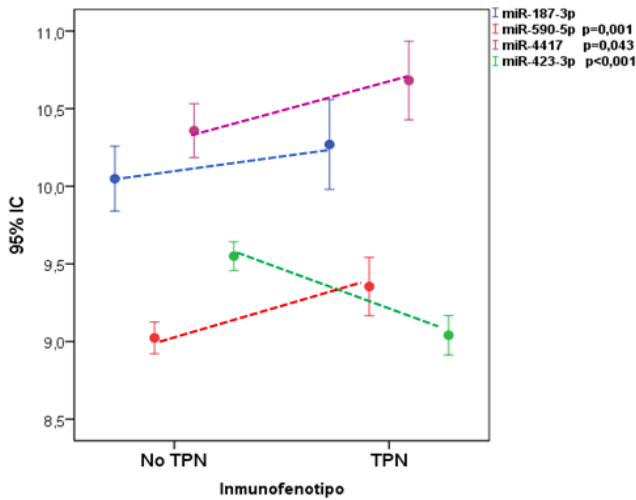
El ANOVA de las medias de expresión de los miRs en los CMs TN respecto a los No TN muestra una asociación significativa de la expresión de tres de los cuatro miRs (423-3p, 590-5p y 4417) con el carácter TN de los tumores. Los tumores TN presentan una expresión significativamente mayor de los miRs 590-5p y 4417, y por el contrario, menor expresión del miR-423-3p respecto a los No TN, (Tabla 21 y Figura 17).

La regresión logística confirma estos resultados, caracterizándose los tumores TN por presentar mayor expresión de los miRs, miR-590-5p y miR-4417 y menor una menor expresión del miR-423-3p (Figura 16).

**Tabla 21.** Expresión media de los microRNAs y carácter TN

microRNAs	Inmunofenotipo		<i>p</i>
	TN (n=79) $\bar{X}$ (DT)	No TN (n=187) $\bar{X}$ (DT)	
<b>miR-187-3p</b>	10,27 (1,29)	10,05 (1,45)	n.s.
<b>miR-423-3p</b>	9,04 (0,57)	9,54 (0,65)	<0,001
<b>miR-590-5p</b>	9,35 (0,84)	9,02 (0,77)	0,001
<b>miR-4417</b>	10,68 (1,13)	10,05 (1,45)	0,043

$\bar{X}$ : Expresión media; TN: Inmunofenotipo Triple Negativo; DT: Desviación típica; *p*: Significación estadística en el test de comparación de medias ANOVA; n.s.: no significativo



**Figura 17. Promedio de los niveles de expresión de los miRs según el carácter TN de los CMs.** Con la excepción del miR-423-3p, el nivel máximo de expresión de los miRs se observa en los CMs TN. Se muestra el p valor del test de comparación de medias ANOVA.

### 3. Perfiles inmunohistoquímico y molecular del CM TN. Resultados de la regresión logística con los parámetros seleccionados

La regresión logística binaria reversa incluyendo todos los marcadores moleculares (VNC, metilación y miRs) elegidos por las regresiones logísticas previas ha seleccionado los parámetros específicos del CM TN que mejor lo diferencian de los tumores que presentan otro inmunofenotipo. Este perfil diferenciador del inmunofenotipo TN está constituido por la VNC de *MYC* y *CDC6*, la metilación en los promotores de *BRCA1*, *GSTP1* y *RASSF1* y la expresión de los miRs 590-5p, 4417 y 423-3p (Figura 18). Los tumores TN se caracterizan por mostrar un perfil caracterizado por presentar una elevada proporción de alteraciones en *MYC* (OR=3,18;  $p=0.006$ ), y baja en *CDC6* (OR=0,30;  $p=0,01$ ), elevada proporción metilaciones en *BRCA1* (OR= 3,12,

$p=0,05$ ) y baja en *GSTP* ( $OR=0,22$ ;  $p=0.001$ ,) y *RASSF1* ( $OR=0,24$ ;  $p<0.001$ ,) junto a una mayor expresión de los miRs 590-5p ( $OR=2,18$ ;  $p=0,02$ ,) y 4417 ( $OR=1,79$ ;  $p=0,01$ ) y pobre expresión del miR-423-3p ( $OR=0,15$ ,  $p<0,001$ ; Figura 19).

En base a este perfil de marcadores el modelo clasifica correctamente el 86,4% de las muestras, clasificando correctamente el 93,9% de las muestras del grupo TN y el 69,0% de las No TN (Tabla 22).

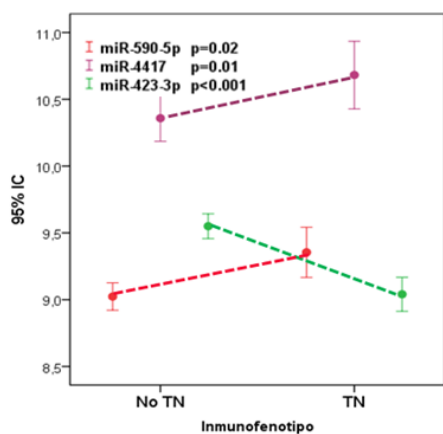
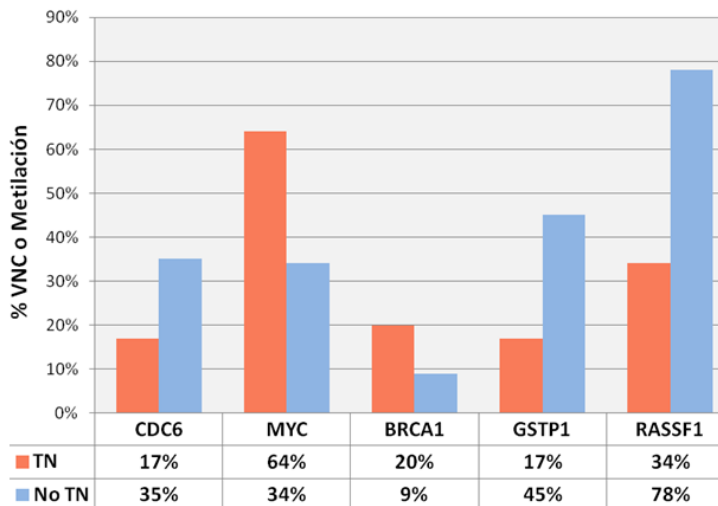
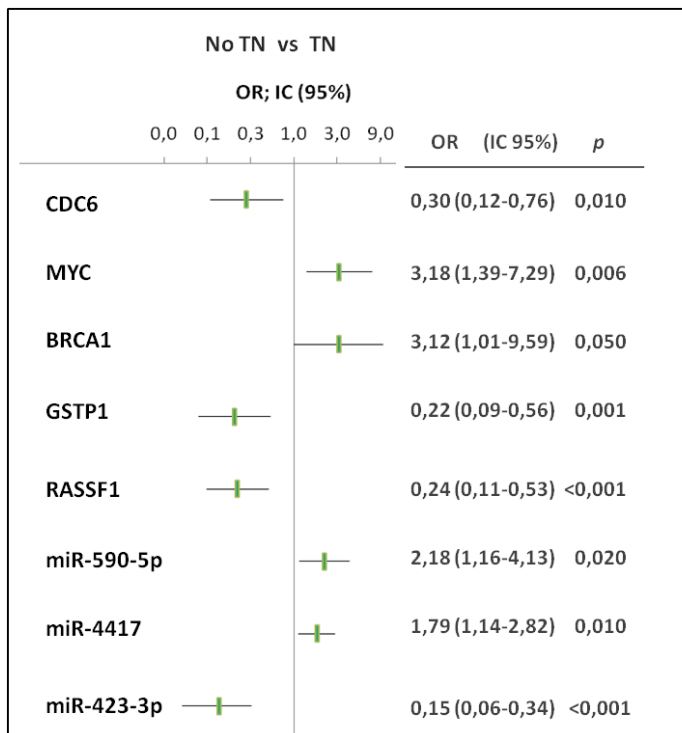


Figura 18. Parámetros que mejor diferencian los CM con fenotipo TN de los no TN.



**Figura 19.** Diferencias en los perfiles inmunohistoquímicos y moleculares entre los fenotipos No TN y los TN. Regresión logística binaria. OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza; p: p valor regresión logística binaria; TN: Triple Negativo.

**Tabla 22.** Regresión logística binaria atrás (Wald) de los parámetros inmunohistoquímicos y moleculares de los grupos de TN y No TN. Porcentaje de muestras correctamente clasificadas.

Observado	Pronosticado		% correcto
	No TN	TN	
No TN	155	10	93,9%
TN	22	49	69,0%
<b>% global</b>	<b>87,6 %</b>	<b>83,1%</b>	<b>86,4%</b>



## DISCUSIÓN

---



## I. Caracterización inmunohistoquímica y molecular de los cánceres de mama esporádico y hereditario

### Marcadores inmunohistoquímicos

Los perfiles inmunohistoquímicos en CM han sido evaluados en diversas series<sup>190,191,192</sup>. De hecho, la expresión de receptores hormonales y la sobreexpresión de HER2 son considerados factores pronóstico y predictivos de respuesta a tratamiento, estando instaurada su determinación en la práctica asistencial. En la presente tesis solamente un 30% de los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* expresaron RE, prevalencia acorde a las descritas por otros autores (10-36%)<sup>193</sup>. La ausencia de expresión de RE y RP es un rasgo propio de los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1*, que se relaciona con el carácter basal de estos tumores<sup>190,192,194</sup>.

Respecto a los CMs portadores de mutaciones en *BRCA2*, las prevalencias encontradas en este estudio para la expresión de RE y RP (74% y 58%, respectivamente, Tabla 6) son similares a las reportadas por Honrado *et al*<sup>195</sup>. Asimismo, la prevalencia encontrada para estos dos marcadores en los grupos BRCAx y CME es muy similar a las previamente descritas<sup>190,195</sup>.

Aproximadamente el 60% de los pacientes que presentan positividad en la expresión de RE responden favorablemente al tratamiento hormonal con Tamoxifeno o inhibidores de Aromatasa, alcanzando el 75% en los CMs positivos para RE y RP<sup>196</sup>.

La prevalencia de amplificaciones de HER2 en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* varía entre series<sup>190,192,195,197</sup>, probablemente debido a la diferente metodología empleada en su detección<sup>195</sup>. La prevalencia de amplificaciones de HER2 en CM no hereditario en las diferentes series

estudiadas se sitúa entre 20-30%<sup>198,199</sup>. No obstante, en un reciente estudio similar al nuestro, Aloraifi *et al*<sup>200</sup> reportan hiperexpresión de HER2 en el 9,5%, 10,5%, 21,9% y 12,3% de los CMs BRCA1, BRCA2, BRCAX y CME respectivamente. La prevalencia para los tres primeros grupos es discretamente superior a la de nuestro estudio, mientras que nosotros observamos una prevalencia más elevada, del 18%, para el CME (Tabla 6).

En el presente estudio, el análisis categórico univariado detecta diferencias entre los grupos de estudio para la mayoría de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados, principalmente para los RE. El análisis multivariado de los parámetros IHQs con los grupos de estudio aplicando la regresión logística multinomial confirma a la expresión de RE como la única variable significativa independiente. Solamente el 30% de los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan expresión de RE, frente al 74%, 69% y 70% (Tabla 6) detectado en los grupos BRCA2, BRCAX y CME, respectivamente. La baja prevalencia de RE+ en los portadores de mutaciones en *BRCA1* se debe a que este grupo ve limitada la expresión de RE debido a la pérdida de la activación de la transcripción del gen que lo codifica, *ESR1*, que es mediada por *BRCA1*<sup>201</sup>.

En este estudio encontramos distribución de inmunofenotipos diferente entre los CMs del grupo BRCA1 y el resto de grupos. El inmunofenotipo mayoritario en el grupo BRCA1 ha sido el TN que presenta una prevalencia del 62% (Tabla 6), similar a la reportada por Mavaddat *et al*<sup>202</sup>. Se ha reportado que el inmunofenotipo TN representa 15-20% de todos los CMs, y las pacientes que lo presentan tienen una probabilidad cinco veces mayor de ser portadoras de mutaciones en *BRCA1* en comparación con las no TN<sup>203</sup>, lo que implica que dos de cada nueve CMs TN pueden presentar mutaciones en *BRCA1*<sup>204</sup>. Esta fuerte asociación del carácter TN con el mayor riesgo de



presentar mutaciones en *BRCA1* ha motivado a que el *NCCN* en su *Guideline* versión 1.2014 de cáncer hereditario recomiende el estudio de las mutaciones en los genes *BRCA1/2* en todos los CMs TN < 60 años<sup>42</sup>, criterio también incluido en la Guía de Consejo Genético de Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana cuya actualización está finalizando para ser publicada en los próximos meses<sup>43</sup>.

El inmunofenotipo mayoritario en los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA2*, como en los BRCAx y en los CMEs, ha sido el Luminal A, coincidiendo con lo encontrado por otros autores<sup>205</sup>. La mayor prevalencia de este fenotipo se debe a la mayor expresión de receptores hormonales mostrada por estos grupos.

### **Variación en el número de copias**

En este estudio el análisis univariado ha detectado que la presencia de aberraciones genéticas en *MYC*, *ERBB2*, *AURKA* y *CPD* permite diferenciar los cuatro grupos. El análisis multivariado multinomial confirma que la presencia de aberraciones en los genes antes mencionados junto con las de *PRDM14* permite diferenciar los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* de los CMEs.

Las anomalías de *MYC* aquí detectadas, principalmente amplificaciones, están asociadas con los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1*, en los que presentan una prevalencia del 67% (Tabla 8). A este respecto Grushko *et al*<sup>99</sup> identifican la amplificación *MYC* como un evento frecuente en los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* en línea germinal, observando amplificación en el 53% de los CMs con mutación en *BRCA1* frente al 23% de los CMEs. Xu *et al*<sup>206</sup> señalan que la amplificación de *MYC* es un evento que se presenta en el curso del proceso oncogénico tras la pérdida de función de *BRCA1*, sugiriendo que la alteración en *MYC* no sea

suficiente para desarrollar el cáncer, requiriéndose alteraciones genéticas adicionales como es la pérdida de *BRCA1*.

En esta tesis, observamos una proporción mayor de alteraciones en *PRDM14*, principalmente amplificaciones, en los CMEs respecto a los portadores de mutaciones en *BRCA1* (38% vs 22%). Nuestro grupo, en un estudio previo encontró una prevalencia de amplificaciones en este gen del 37% en los CMEs<sup>100</sup>, similar a la reportada por Moelans *et al*<sup>90</sup> empleando el mismo método de detección. *PRDM14* es un gen que se localiza en 8q, región frecuentemente amplificada en CM<sup>90</sup>. Así se ha visto, que su sobreexpresión se relaciona con un incremento en la proliferación del CM, mientras que su inhibición reduce el crecimiento celular y aumenta la apoptosis, lo que sugiere su potencial utilidad terapéutica en CM<sup>207</sup>.

Hay que destacar la mayor prevalencia de alteraciones en *AURKA* encontrada en este estudio en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* respecto a los CMEs (41% vs 17%, Tabla 8). El 74% de las alteraciones detectadas en *AURKA* en las pacientes del grupo BRCA1 fueron deleciones (14 de 19). Hasta el momento no existen estudios que confirmen la mayor prevalencia de deleciones en *AURKA* en CMs portadores de mutaciones en *BRCA1*, ni tampoco se han descrito amplificaciones del gen en este grupo<sup>84,85</sup>. Lo que sí se conoce es que las amplificaciones de *AURKA* son frecuentes en los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA2*<sup>85</sup> en los que nosotros, hemos encontrado una prevalencia del 23%.

Se ha descrito que la amplificación del gen *ERBB2* es la principal causa de sobreexpresión de HER2 en el CM (90%)<sup>195</sup>. Como ya se ha comentado en el apartado de Inmunohistoquímica (página 97), los resultados en la expresión de HER2 en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1/BRCA2* varían entre

series<sup>190,192,195,197,200</sup>. Aquí, en relación a la VNC, encontramos una mayor prevalencia de alteraciones en *ERBB2* en los CMEs (45%) respecto a los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*, con un 24% y 20%, respectivamente. En cuanto a la correlación entre de la amplificación con la expresión IHQ de HER2, Grushko *et al*<sup>208</sup> diferencian amplificaciones en *ERBB2* de alto y bajo grado, siendo las amplificaciones de bajo grado más frecuentes entre los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* y las de alto grado en los CMEs. Asimismo, según el mencionado autor las amplificaciones de bajo grado no se detectarían mediante IHQ. En nuestro estudio se encontraron amplificaciones de alto grado (positivas mediante IHQ) solo en dos de las once amplificaciones detectadas en el grupo BRCA1; las restantes nueve amplificaciones no tuvieron traducción por IHQ, constituyéndose de bajo grado. Por tanto, un porcentaje reducido de amplificaciones genéticas de *ERBB2* no conducen a su sobreexpresión; en estos casos, HER2 podría no tener repercusión en la biología del tumor.

Respecto a la relación de la expresión de HER2 con la respuesta al tratamiento, señalar que los CMs con amplificaciones en *ERBB2* que muestran positividad IHQ para HER2, son los que pueden beneficiarse de una medicina de precisión con tratamientos específicos como trastuzumab y lapatinib<sup>209,208</sup>. Además, estudios preliminares sugieren que la resistencia a estas terapias, puede deberse en parte a la pérdida de la expresión de HER2 durante el tratamiento<sup>210</sup>.

La presencia de alteraciones en *CPD* no diferencia con claridad el grupo CME del resto de grupos. No obstante, se observa una tendencia de los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* a presentar menor prevalencia de alteraciones en el gen que el resto de grupos. La amplificación del gen podría estar relacionada con un comportamiento tumoral más agresivo en los CMs

RE+. Se ha descrito que *CPD* codifica una carboxipeptidasa, cuya sobreexpresión es regulada por el estradiol<sup>211</sup>, que actúa aumentando la producción de ON (óxido nítrico), molécula mediadora de procesos involucrados en la progresión tumoral, como la invasión y la angiogénesis<sup>212,213,214</sup>.

### **Metilación en promotores de genes supresores tumorales.**

En la mayoría de los genes estudiados observamos menor prevalencia en la metilación de promotores en los CMs del grupo BRCA1 respecto a los CMEs. Esta tendencia general de los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* a presentar menor índice de metilación ya ha sido descrita por otros autores<sup>109</sup>. De los promotores analizados, solamente la presencia de metilación en *RASSF1*, *CDH13* y *DAPK1* alcanza significación estadística en el análisis multivariante de regresión logística multinomial. La presencia de metilación en los promotores de los dos primeros genes diferencia los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* de los CMEs, mientras que la metilación en *DAPK1* distingue los portadores de los *BRCA2* de los CMEs.

La proteína RASSF1 tiene un papel relevante en la proliferación celular, la apoptosis y la estabilidad de los microtúbulos, parámetros relacionados con la proliferación celular<sup>215</sup>. Se sabe también, que la metilación de *RASSF1* es un evento temprano en el desarrollo del CM, asociado con la presencia de RE<sup>215,216,217</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que *RASSF1* inhibe la expresión del REalfa<sup>218</sup>, por ello la menor metilación en el promotor de *RASSF1*, encontrada en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* se asociaría con el carácter RE negativo de estos tumores. Por el contrario, los CMEs que presentan mayor prevalencia de metilación en *RASSF1* se asocian con la presencia de RE<sup>216,217</sup>.

La metilación de CDH13, frecuentemente detectada en los portadores de mutaciones en *BRCA1*, podría estar relacionada con un comportamiento tumoral más agresivo de estos tumores, tal como sugieren estudios experimentales. Así, se sabe que la proteína CDH13 tiene un papel importante en la adhesión celular y en la regulación del crecimiento celular<sup>219</sup>. Por ello en su ausencia, tal como sucedería en los casos de metilación de su promotor, se facilitaría la transición de tumor benigno a invasivo maligno con mayor facilidad para metastatizar por la diseminación de las células tumorales<sup>219</sup>. Por el contrario, restaurando la expresión de CDH13 en células tumorales se reduce la capacidad invasiva y disminuye su proliferación de manera significativa<sup>220</sup>.

La metilación en el promotor de *DAPK1* permite diferenciar los CMs portadores de mutaciones en *BRCA2* y los CME. *DAPK1* es una serina/treonina proteína quinasa que induce apoptosis y su inactivación conduce al desarrollo tumoral y metástasis<sup>221</sup>. El gen está relacionado con el mal pronóstico evolutivo tal como lo soporta el estudio reciente de Li *et al*<sup>222</sup>, en el que identifican un panel de genes, entre los que se figura *DAPK1*, cuya metilación permite identificar los CMs con progresión tumoral de los que no presentan progresión.

El potencial carácter reversible de los fenómenos de metilación abre la puerta al empleo de agentes demetilantes como herramienta terapéutica. Algunos de estos fármacos (5-azacytidine y 5-aza-2'-deoxycytidine) ya se emplean en el tratamiento de síndromes mielodisplásicos<sup>223</sup>. Sin embargo, en CM su uso se limita a estudios *in vitro*, donde se ha conseguido restaurar la expresión del RE tras revertir la metilación en el promotor del gen *ESR1*<sup>147</sup>.

### Expresión de microRNAs

Los programas estadísticos del paquete Partek Genomic Suite 6.6v<sup>175</sup> han detectado una expresión significativamente mayor en los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* en 21 de los 40 miRs seleccionados en el análisis (Tabla 12). En este sentido, *BRCA1* podría actuar regulando la síntesis de un amplio espectro de miRs y la ausencia de esta regulación, debido a mutaciones en el gen, conduciría a la hiperexpresión de estos miRs. Asimismo, Chang et al<sup>224,225</sup> describen que *BRCA1* reprime la expresión del miR-155 mediada a través de la histona desacetilasa 2 (HDAC2), causando la desacetilación de las histonas H2A y H3 a nivel del promotor del miR-155, lo que reprime la transcripción del miR; de ser así, la presencia de mutaciones en *BRCA1* aboliría la regulación del miR-155 provocando su hiperexpresión<sup>224,225</sup>.

El análisis discriminante sPLS-DA efectuado en este estudio identifica un perfil de 15 miRs, distribuidos en tres clusters, cuya expresión diferencia los cuatro grupos (Figura 11). Los CMs y los de portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* presentan hiperexpresión de un perfil de cuatro, cinco y seis miRs respectivamente, mientras que estos miRs están hipoexpresados en los CMs BRCAX. Son limitados los estudios que han evaluado los perfiles de expresión en CM hereditario; a diferencia de nosotros, el grupo de Tanica et al<sup>130,131</sup> no describe ningún miR diferencialmente expresado entre los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* y los portadores de mutaciones en *BRCA2*, además este grupo encuentra también una gran heterogeneidad en la expresión de miRs en los CMs BRCAX<sup>130,131</sup>.

Los estudios mediante RT-qPCR muestran que el miR-590-5p presenta mayor expresión en los CMs RE negativos en comparación con los RE positivos. A este respecto, Baley et al<sup>226</sup> han observado que tanto la forma 3p como la 5p

de este miR presentan una mayor expresión en las líneas celulares MCF7:2A (ER-) en comparación con MCF7 (ER+)<sup>226</sup>. En este sentido los estudios *in silico* empleando los software de predicción de dianas MicroT-cds<sup>178</sup> y TargetScan<sup>183</sup>, sugieren que este miR podría actuar reprimiendo la síntesis del receptor *ESR1* interactuando con dos secuencias de ARNm del gen.

Asimismo hemos observado que los CMs RE positivos presentan hiperexpresión del miR-423-3p en comparación con los RE negativos. A este respecto, los software de predicción de dianas MicroT-cds<sup>178</sup> y Miranda<sup>185</sup> indican una fuerte interacción de la secuencia de este miR con el ARNm de *ESRRA*<sup>227</sup>, gen que comparte el 68% de la secuencia del dominio de unión a DNA y el 36% de la secuencia del dominio de unión a ligando con el gen *ESR1*<sup>228</sup>. Dado que ambos genes compiten por los mismos promotores, la hipoxpresión de *ESRRA* debida a la hiperexpresión del miR-423-3p causaría la hiperexpresión de *ESR1* propia de los CMs RE positivos. En el campo experimental este mecanismo está soportado por el estudio de Ariazi *et al*<sup>229</sup> que observa que la hiperexpresión de la proteína *ESRRA* se correlaciona con la ausencia de expresión de RE y RP.

Hemos observado que el miR-4417 presenta una mayor expresión en los CMs RE negativos, RP negativos, EGFR positivos y en los portadores de mutaciones en *BRCA1*. En este sentido, el software de predicción de dianas MicroT-cds<sup>178</sup> indica que este miR puede interactuar con tres regiones diferentes del ARNm de *BRCA1*. De acuerdo con la hipótesis de los dos eventos de Knudson<sup>66</sup>, la hiperexpresión de este miR en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* en uno de los alelos podría considerarse como el segundo evento que agravaría la haploinsuficiencia de *BRCA1*. En un trabajo de nuestro grupo se analizó la relación de este miR con los CMs hereditario y no hereditario, encontrando que la expresión de este miR junto con la del miR-

423-3p permiten identificar el 75,8% de los CMs hereditarios y el 65,9% de los CMs no hereditarios<sup>230</sup>. Asimismo, en otro de nuestros trabajos (enviado para publicación<sup>231</sup>) hemos observado que el miR-4417 se hiperexpresa en los CMs que presentan patrón BRCANess<sup>232</sup>. La identificación del fenotipo BRCANess ayudaría a establecer una medicina personalizada que pudiera predecir la resistencia o sensibilidad a la quimioterapia con platino y, particularmente, a inhibidores de PARP<sup>233</sup>.

Los resultados aquí obtenidos que indican una mayor expresión del miR-187-3p en CMs HER2 positivos son similares a los reportados por Blenkiton *et al*<sup>125</sup>. Los test *in silico* efectuados aplicando el software microT-CDS<sup>178</sup> indican que este miR puede interaccionar con dos regiones 3'UTR del gen *ERBB2*, lo que sugiere que el miR-187-3p modularía la traducción de *ERBB2* disminuyendo la síntesis de la proteína oncogénica HER2. La mayor expresión del miR-187-3p encontrada en los CMs HER2 positivos puede interpretarse como un mecanismo compensatorio para frenar la síntesis de la proteína HER2 ante una situación de hiperexpresión del gen. La hiperexpresión de este miR se ha asociado con mal pronóstico en CM, con tumores que presentan un fenotipo más agresivo y mayor potencial invasivo<sup>234</sup>.

### **Perfil de marcadores inmunohistoquímicos y moleculares de los grupos de estudio.**

La regresión logística multinomial con los parámetros IHQs, VNC y epigenéticos (metilación de promotores y expresión de miRs) seleccionados en cada análisis, selecciona la expresión de RE, la VNC de *AURKA*, *MYC*, *ERBB2* y *CPD*, y la metilación en los promotores de *RASSF1*, *CDH13* y *BRCA2*, como parámetros que mejor diferencian los grupos de estudio (Tabla 16). No obstante, los perfiles moleculares e inmunohistoquímicos de los CMs de



portadores de mutaciones en *BRCA2*, los BRCAX y los CMEs son muy semejantes y solo se pueden diferenciar con nitidez los perfiles de los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* y los CMEs. El modelo en su conjunto tiene escasa eficiencia para clasificar los cuatro grupos de estudio (solo clasifica correctamente el 51,8% del total de casos), sin embargo clasifica correctamente el 70,0% de los CM de portadores de mutaciones en *BRCA1* y el 68,9% de los CMEs.

De todos los marcadores IHQs estudiados el RE es el que más contribuye a diferenciar los grupos de estudio. Como ya se ha comentado, uno de los rasgos de los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* respecto al resto consiste en que estos tumores suelen presentar negatividad para la expresión de RE<sup>190,192,194</sup>.

En cuanto a la VNC, destaca la elevada prevalencia de aberraciones en *AURKA* en los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1*. Se sabe que *AURKA* participa en los procesos de mitosis, meiosis y en la reparación del daño del ADN<sup>235</sup>. En un estudio previo de nuestro grupo hemos observado que las aberraciones en *AURKA* se asocian con el CM hereditario<sup>236</sup>. Las VNC en *AURKA* se han asociado con mal pronóstico en CMs RE positivos<sup>73,237</sup>, aunque la presencia de estas alteraciones puede mitigar el mal pronóstico al conferir sensibilidad al tratamiento con inhibidores específicos<sup>73,237</sup>.

Otro rasgo diferenciador entre los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* y los CMEs es la elevada prevalencia de amplificaciones en *MYC* que muestran los primeros. Tal como ya se ha comentado, existe una estrecha relación entre la presencia de mutaciones en *BRCA1* y amplificaciones en *MYC*. Entre las múltiples funciones de *BRCA1*, se ha descrito que reprime la transcripción de *MYC*<sup>238</sup>, sin embargo, no están esclarecidos los mecanismos

que median la amplificación de *MYC* en las células BRCA1 deficientes<sup>99</sup>. Se ha descrito que la amplificación de *MYC* se asocia con CMs portadores de mutaciones en *BRCA1*<sup>99</sup> o con pérdida de función de BRCA1; y en este sentido, estudios experimentales efectuados en ratones indican que la amplificación de *MYC* requiere un periodo de latencia previo antes del desarrollo del CM<sup>206</sup>, sugiriendo que la alteración en *MYC* no es suficiente para desarrollar el cáncer. La amplificación de *MYC* se ha observado en formas agresivas de la enfermedad y se corresponde con un pronóstico desfavorable y con mayor frecuencia de metástasis a distancia<sup>239</sup>. La sobreexpresión de *MYC*, que induce lesiones en la doble cadena de ADN e inestabilidad genética<sup>240</sup>, podría ser aprovechada para ensayar inhibidores de ciclinas dependientes de quinasa (*CDKs*)<sup>241</sup> en este subgrupo de pacientes.

La VNC de *ERBB2* es otro de los parámetros incluidos en este perfil que está asociado con los CMEs (Tabla 16). En general, las pacientes con CM que presentan amplificaciones de alto grado en *ERBB2*, suelen presentar una supervivencia global más corta. Estas pacientes muestran respuestas heterogéneas a una variedad de agentes quimioterapéuticos y hormonales<sup>242</sup>, aunque el desarrollo de terapias dirigidas frente a HER2, como trastuzumab y lapatinib<sup>209</sup>, ha mejorado considerablemente la supervivencia<sup>242</sup>.

La VNC en *CPD* permite diferenciar los CMs de los grupos BRCA1 y CMEs, presentando los primeros mayor prevalencia de alteraciones en este gen (28% vs 17% respectivamente; Tabla 16). Estudios previos han reportado que la expresión de *CPD* se ve estimulada por el estradiol y la prolactina en la línea celular de CM MCF7<sup>211</sup>, ocasionando un incremento en la producción intracelular de ON a partir de la Arginina (Arg) y promoviendo la supervivencia de las células de CM<sup>211</sup>. Por esta razón el bloqueo de la vía CPD-Arg-ON, en los tumores que presentan amplificación de *CPD*, podría ser una alternativa

terapéutica para modular los niveles de ON en las células tumorales y, con ello, mejorar su supervivencia.

En relación con la metilación, este modelo final selecciona la metilación de los promotores de *CDH13*, *RASSF1* y *BRCA2* como parámetros que mejor diferenciación los CMs de portadores de mutaciones en *BRCA1* de los CME. Como se ha indicado previamente, *RASSF1* inhibe la expresión del REalfa<sup>218</sup> y su metilación está asociada con los CME RE+<sup>215</sup>. Además, se ha descrito que lesiones pre-neoplásicas y carcinomas *in situ* con frecuencia presentan metilación del promotor de *RASSF1*, lo que sugiere que esta metilación sea un evento temprano en el desarrollo del CM<sup>243</sup>.

La metilación en *CDH13* es un evento frecuente en CM<sup>244</sup>, particularmente en los portadores de mutaciones en *BRCA1* en los que ostenta la prevalencia máxima, del 90% (Tabla 10). A este respecto, Feng *et al*<sup>244</sup> encuentran asociación de la metilación del promotor con los CM RP negativos y, asociándose por tanto, con los CM de portadores de mutaciones en *BRCA1* que en una elevada proporción suelen ser negativos para los receptores hormonales. Como se ha comentado anteriormente (página 103), la metilación en el promotor de *CDH13* se asocia con una mayor capacidad invasiva de los tumores<sup>219</sup>.

La metilación en el promotor de *BRCA2* en los CMEs presenta una mayor prevalencia a la observada en los CMs con mutaciones en *BRCA1* (13% vs 7%; Tabla 10. La mayoría de estudios efectuados en CM<sup>68,245,246,247</sup> confirman la rareza de metilaciones en el promotor de *BRCA2*. Únicamente dos estudios<sup>248,249</sup> han reportado una prevalencia elevada (del 59,0% y 69,2%, respectivamente) en la metilación de este promotor. En uno de ellos los autores observan que la metilación se asocia con baja expresión de *BRCA2* y

con mayor supervivencia<sup>249</sup>. Así mismo, se ha observado que las pacientes con metilación del promotor de *BRCA2* presentan una mayor sensibilidad a drogas que lesionan la doble cadena de ADN como es el cisplatino<sup>250</sup>. Además es de suponer que estas pacientes, al igual que las que presentan metilación en el promotor de *BRCA1*, podrían ser beneficiarias del tratamiento con inhibidores de PARP<sup>251</sup>.

El perfil de marcadores aquí encontrado revela que los CMs *BRCA1* y los CMEs presentan vías de carcinogénesis distintas. La existencia de estos patrones diferentes condiciona las indicaciones de tratamiento de las pacientes. Así, en los CMs de los portadores de mutaciones en *BRCA1* son poco frecuentes la expresión de RE o la amplificación de HER2, por lo que los tratamientos con Tamoxifeno<sup>196</sup> o Trastuzumab<sup>209</sup> son poco efectivos en la mayoría de los casos. Sin embargo, podría ser particularmente beneficioso el empleo de inhibidores de PARP<sup>251</sup>, y sería prometedor ensayar inhibidores de AURKA<sup>237</sup> y de CDKs<sup>241</sup>, por estar frecuentemente alteradas las vías en las que participan en este grupo de pacientes. Sin embargo en los CMEs, aparte de los tratamientos específicos con Tamoxifeno para los CMs RE+ o Trastuzumab en los CMs que muestran amplificaciones en de *ERBB2*, podría ensayarse el empleo de agentes demetilantes en los casos que presentan metilación en el promotor de *RASSF1*<sup>223</sup>.

## II. Perfiles inmunohistoquímico y molecular de los cánceres de mama triple negativos

Los CMs TN tienen especial interés, porque al carecer de las dianas terapéuticas más habituales, hacen ineficaz el empleo de los antiestrógenos y terapias anti-HER2 (Trastuzumab)<sup>252</sup>. Por ello, en este subgrupo de tumores resulta relevante la identificación de nuevas dianas terapéuticas o vías de señalización intracelular que conduzcan al diseño de nuevas herramientas terapéuticas. Esta es una de las razones que ha impulsado uno de los objetivos planteado en esta tesis, la identificación de perfiles IHQs y marcadores moleculares que permitan subclasificar los CMs TN en concordancia con sus mecanismos etiopatogénicos.

En el estudio hemos encontrado que la VNC de *MYC* y *CDC6*, la metilación de los promotores de *RASSF1*, *BRCA1* y *GSTP1* junto con la expresión de los miRs 590-5p, 4417 y 423-3p constituyen un perfil que permite identificar el estatus TN de los CMs estudiados. Este perfil, que resulta particularmente útil para identificar los CMs TN (69,0% de los TN) en los que solo es aplicable el tratamiento citotóxico<sup>252</sup>, puede ser una base para establecer una medicina personalizada aplicando un tratamiento más específico acorde las alteraciones IHQs y moleculares encontradas.

La presencia de alteraciones en *MYC* es un rasgo frecuente en los CMs TN de nuestra serie, encontradas en el 64% de estos tumores, (Tabla 19) resultado en concordancia con la alta expresión de *MYC* descrita por otros autores en los tumores TN<sup>241</sup>. *MYC* pertenece a una familia de factores de transcripción que regula el crecimiento celular, la proliferación y la apoptosis a través de la activación o represión de otros genes<sup>253</sup>. Entre los genes activados por *MYC* figuran los promotores del crecimiento como las quinasas

dependientes de ciclina (*CDKs*) mientras que entre los genes reprimidos destacan los inhibidores de *CDKs* (*CDKN2a*, *CDKN2b*, *CDKN1a* o *CDKN1b*)<sup>254</sup>. Como ya se ha comentado, la sobreexpresión de *MYC* podría ser utilizada para ensayar un nuevo tratamiento basado en inhibidores de *CDKs*<sup>241</sup>.

En este trabajo hemos observado que los CMs No TN presentan mayor porcentaje de ganancias en *CDC6* que los TN (32% vs 16%). El gen *CDC6* está implicado en la etiopatogénesis del cáncer a través de su participación en la regulación de la proliferación celular; se conoce su sobreexpresión en los cánceres humanos<sup>255</sup> y su papel en la inhibición transcripcional de los genes supresores tumorales *CDKN2a*, *CDKN2b* y *ARF*, implicados en la regulación del ciclo celular<sup>256</sup>.

La mayor prevalencia de metilación encontrada en el promotor de *RASSF1* en los CMs No TN se asocia con la mayor expresión de RE en este grupo de tumores, ya que como se ha comentado previamente, *RASSF1* inhibe la expresión de REalfa<sup>218</sup>. Se ha observado que la re-expresión de *RASSF1* en líneas celulares disminuye los niveles de REalfa y disminuye la sensibilidad a los estrógenos, con la consiguiente reducción de los genes que regulan, como son *BCL2* y *MYC*<sup>218</sup>. Como resultado se induce arresto del ciclo celular, senescencia e inhibición de las rutas involucradas en la transformación tumoral<sup>218</sup>. Así, la metilación en *RASSF1*, abre la oportunidad de ensayar tratamientos con agentes demetilantes que restauren la expresión del gen y por tanto se inhiba la ruta del RE en las pacientes no respondedoras a la terapia hormonal.

En este trabajo la metilación en el promotor de *GSTP1* se asocia con los CMs No TN. *GSTP1* se expresa en las células epiteliales de mama normales<sup>257,258</sup>, y se sabe, que la pérdida de su expresión, detectada en un 53% de los CMs<sup>257</sup>, en un 13-39% de los casos se debe a la metilación de su

promotor<sup>259,260,261,262</sup>. Se ha demostrado que la hipermetilación de *GSTP1* es un evento temprano en el desarrollo del CM<sup>260</sup>, que se asocia con mal pronóstico<sup>260,263,264</sup> habiéndose relacionado también con la presencia de RE y RP<sup>217,264</sup>. *GSTP1* es una enzima que participa en procesos de detoxificación, protegiendo a las células de los carcinógenos<sup>265</sup>. A nivel del tejido mamario, *GSTP1* se une a los estrógenos, captándolos y minimizando así su acción<sup>262</sup>.

Aquí encontramos que la presencia de metilación en el promotor de *BRCA1* es más frecuente en los CMs TN que en los no TN (20% vs 9%). No obstante, los datos de prevalencia de metilación en los CMs TN varían entre series<sup>10,266,267,268</sup>, hecho que puede atribuirse a la diferente proporción de CMs hereditarios y esporádicos que incluyen las series. La prevalencia de metilaciones en *BRCA1* encontrada en los CMs TN y no TN en nuestro trabajo es similar a la descrita en otros estudios<sup>266,267</sup>. La metilación en el promotor origina la pérdida de expresión de *BRCA1*, conduciendo al establecimiento en estos CMs de un fenotipo similar al que presentan los CMs con mutaciones en *BRCA1*, fenotipo *BRCAness*<sup>268,269</sup>. La metilación del promotor de *BRCA1* presenta un interés particular ya que estos pacientes presentan sensibilidad a inhibidores de PARP<sup>233</sup>, mientras que la ausencia de metilación se asocia que una mejor respuesta a terapias basadas en el empleo de atraciclinas<sup>270</sup>.

En el presente trabajo, encontramos diferencias para el estado TN en la expresión de tres de los cuatro miRs estudiados mediante RT-qPCR. La expresión del miR-590-5p es significativamente mayor en los CMs TN. La hiperexpresión de este miR, como ya ha comentado, se asocia con la ausencia de expresión de RE en líneas celulares<sup>226</sup>, y estudios *in silico* sugieren que el miR-590 puede reprimir la síntesis del RE, por lo que la hiperexpresión de este miR se asociaría con CMs que no expresan RE, como son los TN.

En este estudio hemos observado que la hiperexpresión del miR-4417 se asocia con los CMs TN. La hiperexpresión de este miR la hemos encontrado asociada con CMs RE negativos, RP negativos, EGFR positivos y portadores de mutaciones en *BRCA1*, todos ellos rasgos característicos de los CMs TN<sup>87,271,272</sup>.

Finalmente, se ha encontrado una menor expresión del miR-423-3p en los CMs TN. La hipoexpresión del miR se asocia con una mayor expresión de la proteína ESRRA, que como se ha comentado, se correlaciona con la ausencia de expresión de RE<sup>229</sup>, rasgo intrínseco de los CMs TN.



Rosa Vacas



## CONCLUSIONES

---



1. El estudio de los marcadores IHQs, genéticos y epigenéticos en los grupos de CMs (48 BRCA1, 40 BRCA2, 74 BRCA1/2 y 115 CMEs) ha permitido obtener las siguientes **CONCLUSIONES**:
  - 1.1. **IHQ.** La negatividad de los RE y el inmunofenotipo TN, observado en los CMs BRCA1 se asocia con los tumores basal-like, que expresan células del epitelio basal de la glándula mamaria.
  - 1.2. **VNC.** El perfil de VNC de *MYC*, *ERBB2*, *AURKA*, *CPD* y *PRDM14* es el que mejor diferencia los grupos de estudio. De ellas, las amplificaciones de *MYC* y las deleciones de *AURKA*, implicadas en la pérdida de función de *BRCA1*, mitosis y reparación del ADN, son las que mejor diferencian los CMs BRCA1 de los CMEs.
  - 1.3. **Metilación.** La escasa metilación de *RASSF1* y frecuente de *CDH13* observada en los CMs BRCA1 se relaciona con el carácter RE negativo y con la mayor agresividad de estos tumores. Asimismo, la prevalencia de la metilación de *DAPK1* en los CMs BRCA2 se asocia con un comportamiento evolutivo desfavorable.
  - 1.4. **Expresión de miRs.** Los CMs BRCA1 presentan una elevada expresión del miR-4417, implicado en la regulación del ARNm de *BRCA1*.
  - 1.5. **Perfil de marcadores.** El perfil de parámetros formado por RE, VNC de *AURKA*, *MYC*, *ERBB2* y *CPD* y la metilación de *CDH13*, *RASSF1* y *BRCA2* es el que mejor diferencia los grupos de estudio. De ellos, los RE, la VNC de *MYC* y *AURKA* y la metilación de *RASSF1*, *CDH13* y *BRCA2* son los parámetros que mejor diferencian los CMs portadores de mutaciones en *BRCA1* de los CMEs. La identificación de los CMs BRCA1 abre la posibilidad de ensayar el tratamiento con inhibidores de PARP.

2. El estudio de los marcadores IHQs, genéticos y epigenéticos en 79 CMs TN y 191 no TN ha permitido obtener las siguientes **CONCLUSIONES**:
- 2.1. **IHQs.** Los CMs TN presentan mayor expresión de Ki67, CK5/6 y EGFR, características estas asociadas con el comportamiento agresivo de estos tumores.
  - 2.2. **VNC.** Las alteraciones en la VNC encontradas en los genes *CCNE1* y en *MYC* se asocian con los CMs TN, y las de *CCND1* y *CDC6* con los No TN.
  - 2.3. **Metilación.** La metilación de *BRCA1* asociada a los CMs TN conduciría a un fenotipo BRCAness relacionado con la mayor sensibilidad a inhibidores de PARP. Por el contrario, la metilación de *CHFR*, *DAPK1*, *GSTP1* y *RASSF1* detectada en los CMs no TN se asocia con la desregulación del ciclo celular, apoptosis, expresión de RE y mal pronóstico.
  - 2.4. **Expresión de miRs.** La mayor expresión de los miR 590-5p y 4417 de los CMs TN se relaciona con la ausencia de expresión de RE. Por el contrario, la mayor expresión del miR-423-3p de los CMs No TN se acompaña de la presencia de RE en este grupo.
  - 2.5. **Perfil de marcadores.** Los CMs TN presentan amplificación de *MYC* y metilación de *BRCA1*, que conducen a la haploinsuficiencia de *BRCA1*; y presentan también mayor expresión de los miRs 590-5p y 4417, relacionada con el carácter RE negativo de estos tumores. Por el contrario, los CMs no TN presentan amplificación de *CDC6* y metilación de *GSTP1*, implicadas en la etiopatogénesis del cáncer; y metilación de *RASSF1* y elevada expresión del miR-423-3p, asociados ambos con la presencia de RE. La amplificación de *MYC* y metilación en *BRCA1* en los CMs TN abre la posibilidad de ensayar

inhibidores de CDK y/o inhibidores de PARP en este grupo de pacientes.



## **DOCUMENTOS ANEXOS**

---





**Anexo 1:** Unidades, servicios y laboratorios colaboradores en el proyecto

	<b>Hospital</b>
<b>UCGC</b>	Hospital de Elche
	Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia
	Hospital Clínico de Valencia
	Hospital de Castellón
<b>Servicios de AP</b>	Hospital General Universitario de Alicante
	Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia
	Instituto Valenciano de Oncología
	Hospital Clínico de Valencia
	Hospital de Elche
	Hospital Arnau de Villanova
	Hospital de San Juan
	Hospital de Játiva
Hospital de Sagunto	
<b>Servicios de OM</b>	Instituto Valenciano de Oncología
	Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia
	Hospital General Universitario de Alicante
	Hospital de Elche
<b>Laboratorios</b>	Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Valenciano de Oncología

UCGC: Unidades de Consejo Genético en Cáncer; AP: Anatomía Patológica, OM: Oncología Médica

**Anexo 2:** Anticuerpos primarios empleados para la detección de los marcadores inmunohistoquímicos.

<b>MIHQ</b>	<b>Referencia</b>	<b>Nº producto</b>
Ki67	Clone MIB-1	IR626
RE	Clone EP1	IR084
RP	Clone PGR 636	IR068
HER2	3,70	SK001
EGFR	Clone E30	M7249
CK5/6	Clone D5 / 16 B4	IR780
CK18	Clone CD10	IR618
Caderina-E	Clone NCH-38	M3612

MIHQ: Marcador Inmunohistoquímico

**Anexo 3.** Mix de sondas empleado en el estudio de la VNC (probemix P078 Breast Tumour, MRC-Holland).

Tamaño sonda	Nombre de la sonda	Gen	Exón	Mapview	Posición Cromosómica
232	ADAM9 probe 11997-L21978	ADAM9	6	08-038.993938	08p11.22
238	AURKA probe 17365-L21549	AURKA	7	20-054.391595	20q13.2
481	AURKA probe 17590-L21028	AURKA	9	20-054.381824	
317	BIRC5 probe 03717-L02410	BIRC5	1	17-073.722036	
384	BIRC5 probe 03025-L14708	BIRC5	4	17-073.724340	17q25.3
436	BIRC5 probe 03189-L02540	BIRC5	2	17-073.722396	
133	C11ORF30 probe 09173-L21898	C11ORF30	10	11-075.902087	11q13.5
256	C11ORF30 probe 09175-L09349	C11ORF30	16	11-075.926543	
292	CCND1 probe 00583-L00148	CCND1	5	11-069.175088	
472	CCND1 probe 05402-L21561	CCND1	3	11-069.167772	11q13.3
166	CCNE1 probe 02881-L02348	CCNE1	11	19-035.005214	
190	CCNE1 probe 09170-L09344	CCNE1	6	19-035.000150	19q12
196	CDC6 probe 08611-L13204	CDC6	2	17-035.699283	17q21.2
176	CDH1 probe 16884-L21554	CDH1	9	16-067.404849	
358	CDH1 probe 15622-L21559	CDH1	1	16-067.328707	16q22.1
226	CPD probe 09628-L21977	CPD	12	17-025.795018	17q11.2
268	EGFR probe 05969-L20430	EGFR	25	07-055.233954	07p11.2
427	EGFR probe 02063-L03283	EGFR	8	07-055.191055	
148	ERBB2 probe 00675-L18842	ERBB2	7	17-035.118096	
202	ERBB2 probe 17591-L12908	ERBB2	13	17-035.122165	17q12
250	ERBB2 probe 12048-L21551	ERBB2	28	17-035.136338	
310	ERBB2 probe 00986-L00406	ERBB2	19	17-035.127183	
214	ESR1 probe 11996-L12824	ESR1	10	06-152.423833	
244	ESR1 probe 11998-L21550	ESR1	11	06-152.457203	06q25.1
373	FGFR1 probe 01046-L00624	FGFR1	4	08-038.434093	08p11.22
400	FGFR1 probe 04440-L03826	FGFR1	17	08-038.391533	08p11.23
154	IKBKB probe 11993-L22094	IKBKB	10	08-042.292897	
463	IKBKB probe 12003-L21560	IKBKB	20	08-042.302668	08p11.21
418	MAPT probe 08358-L21905	MAPT	8	17-041.423082	17q21.31
351	MED1 probe 09963-L21558	MED1	9	17-034.840858	17q12
285	MTDH probe 04151-L21553	MTDH	2	08-098.742500	
337	MTDH probe 04152-L21907	MTDH	8	08-098.788083	08q22.1
160	MYC probe 00580-L00886	MYC	3	08-128.822148	
279	MYC probe 14870-L20910	MYC	1	08-128.817870	08q24.21
344	PPM1D probe 03195-L21557	PPM1D	2	17-056.055700	17q23.2
445	PRDM14 probe 12002-L12830	PRDM14	7	08-071.130073	08q13.3
172	TOP2A probe 11994-L12822	TOP2A	11	17-035.818297	
329	TOP2A probe 11999-L21541	TOP2A	20	17-035.812698	17q21.2
364	TOP2A probe 12000-L22470	TOP2A	14	17-035.816651	
139	ZNF703 probe 17592-L21902	ZNF703	1	08-037.672630	
262	ZNF703 probe 17595-L21581	ZNF703	2	08-037.675171	08p11.23
128	Reference probe NRAP 11622-L20533	NRAP	21	10-115.375799	10q25.3
184	Reference probe KLKB1 01217-L00694	KLKB1	3	04-187.390325	04q35.2
209	Reference probe POLG 11217-L11900	POLG	15	15-087.666163	15q26.1
220	Reference probe LARGE 12427-L13428	LARGE	8	22-032.158100	22q12.3
274	Reference probe KCNAB1 13796-L15290	KCNAB1	12	03-157.715625	03q25.31
300	Reference probe TGIF1 06366-L21564	TGIF1	3	18-003.437728	18p11.31
324	Reference probe SCN2A 06589-L21903	SCN2A	26	02-165.945396	02q24.3
391	Reference probe CETN3 16514-L18975	CETN3	1	05-089.741196	05q14.3
411	Reference probe RTN4 00963-L21904	RTN4	6	02-055.068270	02p16.1
453	Reference probe POMT2 12459-L13460	POMT2	9	14-076.832303	14q24.3
493	Reference probe SNCA 03689-L21727	SNCA	6	04-090.869382	04q22.1
500	Reference probe SMPD1 06676-L21510	SMPD1	2a	11-006.369210	11p15.4

**Anexo 4.** Mix de sondas empleado en el estudio de metilación de promotores (ME01 Tumour Suppressor, MRC-Holland).

Tamaño sonda	Nombre de la sonda	Gen	Exón	Mapview	Posición Cromosómica
142	TIMP3 probe 02255-L03752	TIMP3	1	22-031,527795	22q12.3
148	APC probe 01905-L01968	APC	2	05-112,101357	05q22.2
161	CDKN2A probe 01524-L01744	CDKN2A	up	09-021,985276	09p21.3
167	MLH1 probe 01686-L01266	MLH1	1	03-037,010000	03p22.2
184	ATM probe 04044-L03849	ATM	1	11-107,599044	11q22.3
193	RARB probe 04040-L01698	RARB	1	03-025,444559	03p24.2
211	CDKN2B probe 00607-L00591	CDKN2B	1	09-021,998808	09p21.3
220	HIC1 probe 03804-L00949	HIC1	1	17-001,905107	17p13.3
238	CHFR probe 03813-L03753	CHFR	1	12-131,974372	12q24.33
246	BRCA1 probe 05162-L04543	BRCA1	1a	17-038,530811	17q21.31
265	CASP8 probe 02761-L02210	CASP8	3	02-201,830871	02q33.1
274	CDKN1B probe 07949-L07730	CDKN1B	1	12-012,761863	12p13.1
292	KLLN probe 02203-L08261	KLLN	1	10-089,612348	10q23.31
301	BRCA2 probe 04042-L03755	BRCA2	1	13-031,787722	13q13.1
319	CD44 probe 03817-L01731	CD44	1	11-035,117389	11p13
328	RASSF1 probe 02248-L01734	RASSF1	1	03-050,353347	03p21.31
346	DAPK1 probe 01677-L01257	DAPK1	1	09-089,303075	09q21.33
353	VHL probe 03810-L01211	VHL	1	03-010,158426	03p25.3
373	ESR1 probe 02202-L01700	ESR1	5	06-152,170883	06q25.1
382	RASSF1 probe 03807-L02159	RASSF1	1	03-050,353298	03p21.31
400	TP73 probe 04050-L01263	TP73	1	01-003,558977	01p36.32
409	FHIT probe 02201-L01699	FHIT	1	03-061,211918	03p14.2
427	CADM1 probe 03819-L03848	CADM1	1	11-114,880585	11q23.3
436	CDH13 probe 07946-L07727	CDH13	1	16-081,218219	16q23.3
454	GSTP1 probe 01638-L01176	GSTP1	1	11-067,107774	11q13.2
463	MLH1 probe 02260-L01747	MLH1	1	03-037,009621	03p22.2
136	Reference probe CREM 00981-L00566	CREM	9	10-035,517225	10p11.21
154	Reference probe PARK2 03366-L02750	PARK2	7	06-162,126766	06q26
175	Reference probe TNFRSF1A 00554-L13516	TNFRSF1A	1	12-006,321241	12p13.31
202	Reference probe MLH3 probe 01245-L00793	MLH3	3	14-074,578836	14q24.3
229	Reference probe PAH 02334-L01820	PAH	4	12-101,795401	12q23.2
256	Reference probe BCL2 00587-L00382	BCL2	3	18-058,946868	18q21.33
281	Reference probe TSC2 01832-L01397	TSC2	18	16-002,061786	16p13.3
310	Reference probe CDK6 03184-L02523	CDK6	8	07-092,085391	07q21.2
337	Reference probe CDH1 02416-L01862	CDH1	16	16-067,424755	16q22.1
364	Reference probe CELF2 01234-L00781	CELF2	6	10-011,017023	10p14
390	Reference probe KLK3 00713-L00108	KLK3	1	19-056,050014	19q13.33
418	Reference probe BRCA2 01617-L01199	BRCA2	22	13-031,851548	13q13.1
444	Reference probe CD27 00678-L00124	CD27	6	12-006,430685	12p13.31
475	Reference probe CTNNB1 03984-L03251	CTNNB1	3	03-041,241066	03p22.1

**Anexo 5.** Composición de la mezcla de reacción de la RT

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Pool de primers (0.5X)	6
dNTPs (100mM)	0.3
RT Buffer (10X)	1.5
MultiScribe RT (50U/ $\mu$ l)	3
Rnase Inhibitor (20U/ $\mu$ l)	0.2
H <sub>2</sub> O libre de RNAasa	2
ARN total (50ng/ $\mu$ l)	2

**Anexo 6.** Programa de temperaturas de reacción de RT

Tiempo	Temperatura
30 minutos	16°C
30 minutos	42°C
5 minutos	85°C
Hold	4°C

**Anexo 7.** Mezcla de reacción para la qPCR

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
TaqMan miRNA assay (20X)	0.5
TaqMan Universal MasterMix	5
H <sub>2</sub> O	2.5
cDNA diluido 1/2	2

**Anexo 8.** Programa de temperaturas de reacción de qPCR

Tiempo	Temperatura	Ciclos
10 minutos	95°C	1
15 segundos	95°C	40
60 segundos	60°C	

**Anexo 9.** Ensayos TaqMan empleados en la RT-PCR

<b>Ensayo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>hsa-miR-125b</b>	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	000449
<b>hsa-miR-30a-5p</b>	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	000417
<b>hsa-miR-663b</b>	GGUGGCCCGCCGUGCCUGAGG	002857
<b>hsa-miR-187</b>	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	001193
<b>hsa-miR-4417</b>	GGUGGGCUUCCCGGAGGG	461910_mat
<b>hsa-miR-371b-5p</b>	ACUCAAAAGAUGGCGGCACUUU	463886_mat
<b>hsa-miR-4725-3p</b>	UGGGGAAGGCGUCAGUGUCGGG	463784_mat
<b>hsa-miR-4722-5p</b>	GGCAGGAGGGCUGUGCCAGGUUG	464685_mat
<b>hsa-miR-3131</b>	UCGAGGACUGGUGGAAGGGCCUU	242305_mat
<b>hsa-miR-4713-5p</b>	UUCUCCCACUACCAGGCUCCCA	462511_mat
<b>hsa-miR-4731-5p</b>	UGCUGGGGGCCACAUGAGUGUG	464084_mat
<b>hsa-miR-590-5p</b>	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG	001984
<b>hsa-miR-361-5p</b>	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC	000554
<b>hsa-miR-4498</b>	UGGGCUGGCAGGGCAAGUGCUG	465110_mat
<b>hsa-miR-423-3p</b>	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	002626
<b>hsa-miR-1273c</b>	GGCGACAAAACGAGACCCUGUC	243951_mat

**Anexo 10:** Resultados del Análisis Discriminante efectuado con los 40 microRNAs seleccionados con el software PARTEK.

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig
<b>1 a la 3</b>	0.009	69,060	15	<0.001
<b>2 a la 3</b>	0.195	23,698	8	0.003
<b>3</b>	0.698	5,211	3	0.157

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas

	1	2	3
<b>hsa-miR-4713-5p</b>	0,615	1,090	-0,004
<b>hsa-miR-4731-5p</b>	0,825	-0,530	-0,024
<b>hsa-miR-590-5p</b>	1,289	0,342	0,167
<b>hsa-miR-30a-5p</b>	-0,931	0,288	-0,771
<b>hsa-miR-361-5p</b>	-0,921	-0,492	0,948

	GRUPO	Grupo de pertenencia pronosticado				Total
		BRCA1	BRCA2	BRCAX	CME	
<b>Recuento</b>	<b>BRCA1</b>	5	0	0	0	5
	<b>BRCA2</b>	0	5	0	0	5
	<b>BRCAX</b>	0	0	5	0	5
	<b>CME</b>	0	0	0	5	5
<b>%</b>	<b>BRCA1</b>	100	0	0	0	100
	<b>BRCA2</b>	0	100	0	0	100
	<b>BRCAX</b>	0	0	100	0	100
	<b>CME</b>	0	0	0	100	100

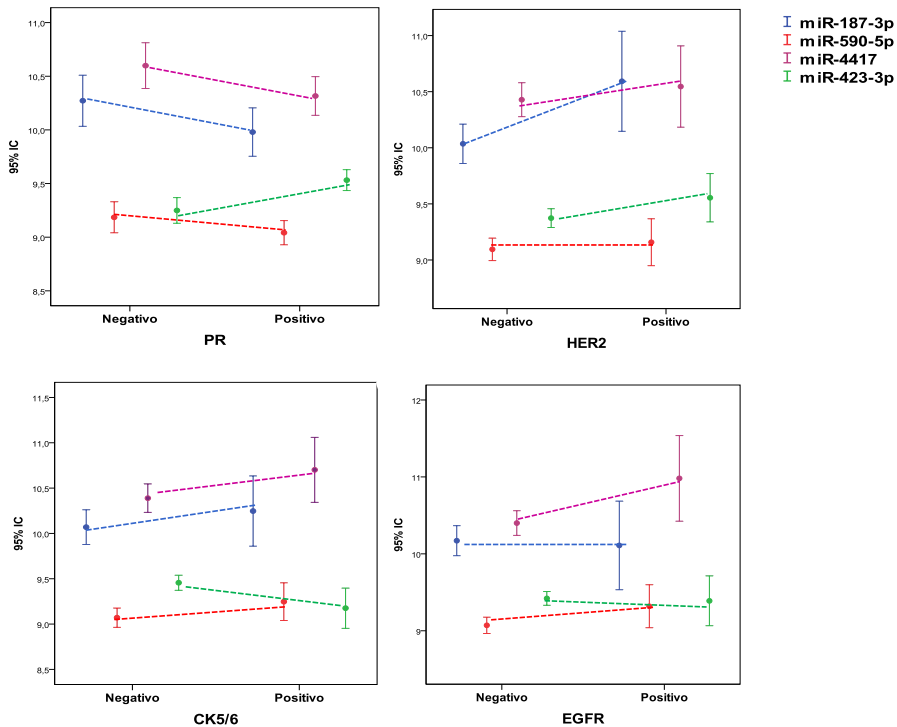
Clasificados correctamente el 100% de los casos

**Anexo 11:** MicroRNAs seleccionados a partir de los resultados obtenidos en PARTEK

microRNA	FC	p
hsa-miR-187	-22,70	0,025
hsa-miR-663b	4,46	0,010
hsa-miR-371b-5p	3,95	0,015
hsa-miR-4417	3,70	0,014
hsa-miR-30a	-2,80	0,014
hsa-miR-125b	-2,62	0,009
hsa-miR-4722-5p	2,31	<0,001
hsa-miR-4725-3p	2,30	0,026
hsa-miR-3131	2,13	0,026

FC: Veces de cambio; Los p valores y FC hacen referencia a la comparación CMs BRCA positivos (BRCA1+BRCA2) frente a CMs esporádicos

**Anexo 12:** Parámetro inmunohistoquímicos y expresión de microRNAs





**Anexo 13:** Expresión media de los microRNAs y parámetros inmunohistoquímicos e inmunofenotipo. ANOVA Multifactorial

MIHQ	n	miR-187-3p		miR-590-5p		miR-4417		miR-423-3p	
		$\bar{X}$ (SD)	<i>p</i>	$\bar{X}$ (SD)	<i>p</i>	$\bar{X}$ (SD)	<i>p</i>	$\bar{X}$ (SD)	<i>p</i>
ER	-	98	10,4 (1,3)	<b>0,008</b>	9,4 (0,8)	<b>0,006</b>	10,7 (1,1)	9,1 (0,6)	<b>0,03</b>
	+	170	9,9 (1,4)		9,0 (0,7)		10,3 (1,2)	n.s.	
PR	-	125	10,3 (1,4)	n.s.	9,2 (0,9)	n.s.	10,6 (1,2)	9,2 (0,7)	n.s.
	+	143	9,9 (1,4)		9,1 (0,7)		10,3 (1,1)	n.s.	
HER2	-	233	10,0 (1,4)	n.s.	9,1 (0,8)	n.s.	10,4 (1,2)	9,4 (0,7)	n.s.
	+	37	10,6 (1,4)		9,2 (0,7)		10,6 (1,1)	n.s.	
Ki67	h	149	10,0 (1,41)	n.s.	9,0 (0,8)	n.s.	10,5 (1,1)	9,5 (0,6)	n.s.
	l	117	10,2 (1,40)		9,2 (0,8)		10,4 (1,3)	n.s.	
CK5-6	-	208	10,1 (1,4)	n.s.	9,1 (0,8)	n.s.	10,4 (1,2)	9,5 (0,6)	n.s.
	+	54	10,3 (1,4)		9,3 (0,8)		10,7 (1,3)	n.s.	
CK18	-	17	10,2 (1,5)	n.s.	9,5 (0,8)	n.s.	10,4 (0,7)	9,3 (0,4)	n.s.
	+	231	10,1 (1,4)		9,1 (0,8)		10,4 (1,2)	n.s.	
EGFR	-	209	10,2 (1,4)	n.s.	9,1 (0,8)	n.s.	10,4 (1,2)	9,4 (0,7)	n.s.
	+	27	10,1 (1,5)		9,3 (0,2)		11,0 (1,4)	n.s.	
Cad-E	-	12	9,9 (0,8)	n.s.	8,8 (0,7)	n.s.	10,0 (0,9)	9,2 (0,5)	n.s.
	+	244	10,1 (1,5)		9,2 (0,8)		10,5 (1,2)	n.s.	

MIHQ: Marcador inmunohistoquímico;  $\bar{X}$ : media de expresión; DT: Desviación típica; Cad-E: Caderina-E; n.s.: No significativo.

## Anexo 14: Publicaciones derivadas de la realización de la presente Tesis Doctoral.

Breast Cancer Res Treat  
DOI 10.1007/s10549-013-2723-7

### PRECLINICAL STUDY

## MicroRNA signatures in hereditary breast cancer

Rosa Murria Estal · Sarai Palanca Suela · Inmaculada de Juan Jiménez ·  
Cecilia Egoavil Rojas · Zaida García-Casado · María José Juan Fita ·  
Ana Beatriz Sánchez Heras · Ángel Segura Huerta · Isabel Chirivella González ·  
Dolors Sánchez-Izquierdo · Marta Llop García · Eva Barragán González ·  
Pascual Bolufer Gilabert

Received: 16 July 2013 / Accepted: 3 October 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** This study aims to identify signatures of miR associated with hereditary, *BRCA1* or *BRCA2* mutation positive breast cancer (BC), and non-hereditary BC, either sporadic (SBC) or non-informative (BRCA). Moreover, we search for signatures associated with tumor stage, immunohistochemistry and tumor molecular profile. Twenty formalin fixed paraffin embedded (FFPE) BCs, *BRCA1*, *BRCA2*, BRCA and SBC, five per group were studied. Affymetrix platform miRNA v.3.0 was used to perform miR expression analysis. ER, PR, HER2 and Ki67 protein expression was analyzed by immunohistochemistry. *BRCA1*, *BRCA2* and *RASSF1* methylation analysis, *AURKA* copy number variations, and *BRCA1* and *BRCA2* deletions, were studied by MLPA. We validated eight of the miR selected by the arrays in 77 BCs by qRT-PCR. The miR profiles associated with tumor features were studied applying the *Sparse Partial Least Squares Discriminant*

*Analysis*. MiR discrimination capability to distinguish hereditary and non-hereditary BC was analyzed by the discriminant function. With 15 out of 1,733 hsa-miRs, it was possible to differentiate the four groups. *BRCA1*, *BRCA2* and SBC were associated with clusters of hyper-expressed miRs, and BRCA with hypo-expressed miRs. Hsa-miR-4417 and hsa-miR-423-3p expressions (included among the eight validated miRs) differentiated 70.1 % of hereditary and non-hereditary BCs. We found miR profiles associated with tumor features like node involvement, histological grade, ER, PR and HER2 expression. Regarding molecular parameters, we only found a weak association of miRs in BC harboring losses in *AURKA*. We conclude that array miR expression profiles can differentiate the four study groups using FFPE BC. However, miR expression estimated by qRT-PCR differentiates only hereditary and non-inherited BCs. The miR expression array is a simple and rapid approach that could be useful to facilitate the identification of those SBC carrying genetic or epigenetic changes in *BRCA* genes responsible of BRCA-

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10549-013-2723-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Murria Estal · S. Palanca Suela · I. de Juan Jiménez ·  
M. Llop García · E. Barragán González · P. Bolufer Gilabert (✉)  
Laboratory of Molecular Biology, Service of Clinical Analysis,  
University Hospital La Fe, Escuela de Enfermería 7ª planta, Avd.  
Campanar 21, 46009 Valencia, Spain  
e-mail: bolufer\_pas@gva.es

C. Egoavil Rojas  
Department of Pathology, University General Hospital, Alicante,  
Spain

Z. García-Casado  
Laboratory of Molecular Biology, IVO, Valencia, Spain

M. J. Juan Fita  
Department of Oncology, IVO, Valencia, Spain

A. B. Sánchez Heras  
Genetic Counseling Unit, Elche Hospital, Alicante, Spain

Á. Segura Huerta  
Genetic Counseling Unit, University Hospital La Fe, Valencia,  
Spain

I. Chirivella González  
Genetic Counseling Unit, Clinic University Hospital, Valencia,  
Spain

D. Sánchez-Izquierdo  
Arays Service, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

Am J Cancer Res 2015;5(1):375-385  
[www.ajcr.us](http://www.ajcr.us) /ISSN:2156-6976/ajcr0002578

## Original Article

# Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer

Rosa Murria<sup>1</sup>, Sarai Palanca<sup>1</sup>, Inmaculada de Juan<sup>1</sup>, Cecilia Egoavil<sup>2</sup>, Cristina Alenda<sup>2</sup>, Zaida García-Casado<sup>3</sup>, María J Juan<sup>4</sup>, Ana B Sánchez<sup>5</sup>, Ana Santaballa<sup>6</sup>, Isabel Chirivella<sup>7</sup>, Ángel Segura<sup>8</sup>, David Hervás<sup>9</sup>, Marta Llop<sup>1</sup>, Eva Barragán<sup>1</sup>, Pascual Bolufer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, Service of Clinical Analysis, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>2</sup>Department of Pathology, University General Hospital, Alicante, Spain; <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Biology, IVO, Valencia, Spain; <sup>4</sup>Department of Oncology, IVO, Valencia, Spain; <sup>5</sup>Genetic Counseling Unit, Elche Hospital, Alicante, Spain; <sup>6</sup>Department of Oncology, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>7</sup>Genetic Counseling Unit, Clinic University Hospital, Valencia, Spain; <sup>8</sup>Genetic Counseling Unit, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>9</sup>Bioinformatics Service, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

Received September 17, 2014; Accepted November 10, 2014; Epub December 15, 2014; Published January 1, 2015

**Abstract:** This study investigates the relationship of promoter methylation in tumor suppressor genes with copy-number aberrations (CNA) and with tumor markers in breast cancer (BCs). The study includes 98 formalin fixed paraffin-embedded BCs in which promoter methylation of 24 tumour suppressor genes were assessed by Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA), CNA of 20 BC related genes by MLPA and ER, PR, HER2, CK5/6, CK18, EGFR, Cadherin-E, P53, Ki-67 and PARP expression by immunohistochemistry (IHC). Cluster analysis classed BCs in two groups according to promoter methylation percentage: the *highly-methylated* group (16 BCs), containing mostly hyper-methylated genes, and the *sparsely-methylated* group (82 BCs) with hypomethylated genes. *ATM*, *CDKN2A*, *VHL*, *CHFR* and *CDKN2B* showed the greatest differences in the mean methylation percentage between these groups. We found no relationship of the IHC parameters or pathological features with methylation status, except for Catherin-E ( $p = 0.008$ ). However the highly methylated BCs showed higher CNA proportion than the sparsely methylated BCs ( $p < 0.001$ , OR = 1.62; IC 95% [1.26, 2.07]). *CDC6*, *MAPT*, *MED1*, *PRMD14* and *AURKA* showed the major differences in the CNA percentage between the two groups, exceeding the 22%. Methylation in *RASSF1*, *CASP8*, *DAPK1* and *GSTP1* conferred the highest probability of harboring CNA. Our results show a new link between promoter methylation and CNA giving support to the importance of methylation events to establish new BCs subtypes. Our findings may be also of relevance in personalized therapy assessment, which could benefit the hyper methylated BC patients group.

**Keywords:** Breast cancer, promoter methylation, copy number aberrations, immunochemistry

## Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women. Every year about one million women worldwide are diagnosed with BC [1]. Consequently, this pathology has been extensively investigated in terms of histopathology, immunohistochemistry (IHC) and genetic disorders. Carcinogenesis is the result of accumulating genetic alterations as mutations, copy number aberrations (CNA) and, recently, it has also been demonstrated that epigenetic alterations such as promoter methylation in tumor suppressor genes can drive to tumor development

[2]. Epigenetic is defined as *changes in gene expression that are not due to any alteration in the DNA sequence* [3]. They are mediated by several molecular mechanisms including histone modifications, small non-coding RNAs and gene promoter methylation in CpG islands [4]. The understanding of these mechanisms is playing a relevant role in the diagnosis, prognosis and in the design of new treatment strategies.

Epigenetic deregulation, particularly altered DNA methylation patterns, is known to play a key role in the altered gene expression profiles

Am J Cancer Res 2015;5(7):2330-2343  
[www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0010876](http://www.ajcr.us/)

## Original Article

# Immunohistochemical, genetic and epigenetic profiles of hereditary and triple negative breast cancers. Relevance in personalized medicine

Rosa Murria<sup>1</sup>, Sarai Palanca<sup>1</sup>, Inmaculada de Juan<sup>1</sup>, Cristina Alenda<sup>2</sup>, Cecilia Egoavil<sup>2</sup>, Francisco J Seguí<sup>2</sup>, Zaida García-Casado<sup>3</sup>, María J Juan<sup>4</sup>, Ana B Sánchez<sup>5</sup>, Ángel Segura<sup>6</sup>, Ana Santaballa<sup>7</sup>, Isabel Chirivella<sup>8</sup>, Marta Llop<sup>2</sup>, Gema Pérez<sup>2</sup>, Eva Barragán<sup>2</sup>, Dolores Salas<sup>9</sup>, Pascual Bolufer<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, Service of Clinical Analysis, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>2</sup>Department of Pathology, University General Hospital, Alicante, Spain; <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Biology, IVO, Valencia, Spain; <sup>4</sup>Department of oncology, IVO, Valencia, Spain; <sup>5</sup>Genetic Counseling Unit, Elche Hospital, Alicante, Spain; <sup>6</sup>Genetic Counseling Unit, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>7</sup>Department of oncology, University Hospital La Fe, Valencia, Spain; <sup>8</sup>Genetic Counseling Unit, Clinic University Hospital, Valencia, Spain; <sup>9</sup>General Department of Public Health, Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, Spain

Received May 31, 2015; Accepted June 11, 2015; Epub June 15, 2015; Published July 1, 2015

**Abstract:** This study aims to identify the profile of immunohistochemical (IHC) parameters, copy number aberrations (CNAs) and epigenetic alterations [promoter methylation (PM) and miR expression] related to hereditary (H) and triple negative (TN) breast cancer (BC). This profile could be of relevance for guiding tumor response to treatment with targeting therapy. The study comprises 278 formalin fixed paraffin-embedded BCs divided into two groups: H group, including 88 hereditary BC (HBC) and 190 non hereditary (NHBC), and TN group, containing 79 TNBC and 187 non TNBC (NTNBC). We assessed IHC parameters (Ki67, ER, PR, HER2, CK5/6, CK18 and Cadherin-E), CNA of 20 BC related genes, and PM of 24 tumor suppressor genes employing MLPA/MS-MLPA (MRC Holland, Amsterdam). MiR-4417, miR-423-3p, miR-590-5p and miR-187-3p expression was assessed by quantitative RT-PCR (Applied Biosystems). Binary logistic regression was applied to select the parameters that better differentiate the HBC or TN groups. For HBC we found that, ER expression, *ERBB2* CNA and PM in *RASSF1* and *TIMP3* were associated with NHBC whereas; *MYC* and *AURKA* CNA were linked to HBC. For TNBC, we found that *CDC6* CNA, *GSTP1* and *RASSF1* PM and miR-423-3p hyperexpression were characteristic of NTNBC, while *MYC* aberrations, *BRCA1* hypermethylation and miR-590-5p and miR-4417 hyperexpression were more indicative of TNBC. The selected markers allow establishing BC subtypes, which are characterized by showing similar etiopathogenetic mechanisms, some of them being molecular targets for known drugs or possible molecular targets. These results could be the basis to implement a personalized therapy.

**Keywords:** Sporadic breast cancer, hereditary breast cancer, miR expression profile, *BRCA1*, *BRCA2*, mutations, molecular markers

## Introduction

Every year about one million women worldwide are diagnosed with breast cancer (BC) [1], a heterogeneous disease that includes distinct biological entities associated with specific pathological features and clinical evolution. In 5-10% of BCs, the disease occurs as part of a hereditary cancer susceptibility syndrome [2].

A substantial proportion of hereditary breast and ovarian cancers (HBC/HOC) can be attrib-

uted to mutations in *BRCA1* [3] or *BRCA2* genes [4], representing 16-25% of high risk familial BCs [5, 6]. Women with triple negative breast cancer (TNBC), represent 15-20% of all BCs [7], and are approximately five and a half times more likely to have *BRCA1* mutations compared to non-TNBC (NTNBC). Moreover, approximately two out of nine women with TNBC harbor *BRCA1* mutations [8].

Somatic acquired copy number aberrations (CNAs) are an important mechanism for onco-



Artículo enviado a *Familial Cancer* (Actualmente bajo revisión, 27-10-2015)

## Relationship of immunohistochemistry, copy number aberrations and epigenetic disorders with BRCAness pattern in hereditary and sporadic breast cancer.

Rosa Murria Estal<sup>1</sup>, Sarai Palanca Suela<sup>1</sup>, Inmaculada de Juan Jiménez<sup>1</sup>, Cristina Alenda Gonzalez<sup>2</sup>, Cecilia Egoavil Rojas<sup>2</sup>, Zaida García-Casado<sup>3</sup>, Jose Antonio López Guerrero<sup>3</sup>, María José Juan Fita<sup>4</sup>, Ana Beatriz Sánchez Heras<sup>5</sup>, Ángel Segura Huerta<sup>6</sup>, Ana Santaballa Bertrán<sup>7</sup>, Isabel Chirivella González<sup>8</sup>, Marta Llop García<sup>1</sup>, Gema Pérez Simó<sup>1</sup>, Eva Barragán González<sup>1</sup>, Pascual Bolufer Gilabert<sup>1</sup>.

### Abstract

The study aims to identify the relevance of immunohistochemistry (IHC), copy number aberrations (CNA) and epigenetic disorders in BRCAness breast cancers (BCs).

We studied 95 paraffin included BCs, of which 41 carried BRCA1/BRCA2 germline mutations and 54 were non hereditary (sporadic). Samples were assessed for BRCA1ness and CNAs by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA); promoter methylation (PM) was assessed by methylation-specific-MLPA (MS-MLPA) and the expression of miR-4417, miR-423-3p, miR-590-5p and miR-187-3p by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). IHC markers Ki67, ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR and CK18 were detected with specific primary antibodies (DAKO, Denmark). BRCAness association with covariates was performed using multivariate binary logistic regression (stepwise backwards Wald option).

BRCA1/2 mutational status ( $p=0.027$ ), large tumor size ( $p=0.041$ ) and advanced histological grade ( $p=0.017$ ) among clinic-pathological variables; ER ( $p<0.001$ ) among IHC markers; *MYC* ( $p<0.001$ ) among CNA; *APC* ( $p=0.065$ ), *ATM* ( $p=0.014$ ) and *RASSF1* ( $p=0.044$ ) among PM, and miR-590-5p ( $p=0.001$ ), miR-4417 ( $p=0.019$ ) and miR-423 ( $p=0.013$ ) among microRNA expression, were the selected parameters significantly related with BRCAness status. The logistic regression performed with all these parameters selected ER+ as linked with the lack of BRCAness ( $p=0.001$ ) and *MYC* CNA, *APC* PM and miR-590-5p expression with BRCAness ( $p=0.014$ , 0.045 and 0.007, respectively).

In conclusion, the parameters ER expression, *APC* PM, *MYC* CNA and miR-590-5p, allowed detection of most BRCAness BCs. The identification of BRCAness can help establish a personalized medicine addressed to predict the response to specific treatments.

**Anexo 15:** Comunicaciones a congresos derivadas de la realización de la presente Tesis Doctoral.

- Perfil molecular e inmunohistoquímico de los cánceres de mama BRCAness. Comunicación Oral.

XV Congreso SEOM, Madrid Spain. 28/10/2015. **Rosa Murria Estal**, Sarai Palanca Suela, Inmaculada de Juan Jimenez, Cecilia Egoavil Rojas, Zaida García Casado, Ana Santaballa Bertrán, Ana Beatriz Sánchez Heras, Ángel Segura Huerta, Isabel Chirivella González\* y Pascual Bolufer Gilabert. **Premiada como mejor comunicación Oral**

- Perfiles inmunohistoquímicos, genéticos y epigenéticos de los cánceres de mama hereditarios y triple negativos. Relevancia en la medicina personalizada. Comunicación Oral.

XV Congreso SEOM, Madrid Spain. 28/10/2015. **Rosa Murria Estal**, Sarai Palanca Suela, Inmaculada de Juan Jimenez, Cristina Alenda González, Zaida García Casado, María José Juan Fita, Ana Beatriz Sánchez Heras, Ángel Segura Huerta, Isabel Chirivella González y Pascual Bolufer Gilabert.

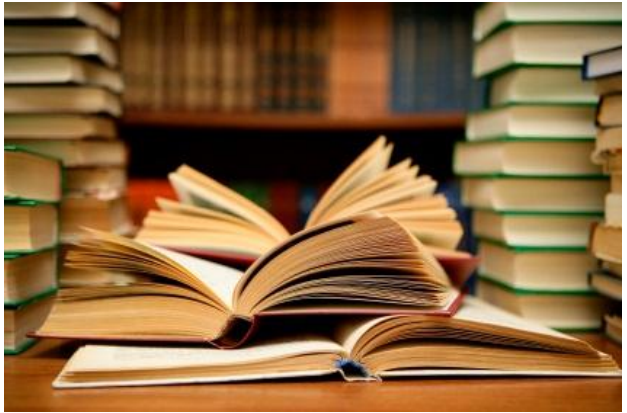
- La metilación en promotores de genes supresores tumorales está asociada con el aumento de la incidencia en las variaciones en el número de copias en el cáncer de mama esporádico. Comunicación Oral.

III Simposio Nacional SEOM, Madrid. 22/10/2014. **Rosa Murria**; Sarai Palanca; Inmaculada de Juan; Cecilia Egoavil; Zaida Garcia; Ana Santaballa; M<sup>a</sup> José Juan; Ana B Sánchez; Jacobo Santamaría; Pascual Bolufer.

- MicroRNA signatures in Hereditary Breast Cancer. Poster  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid. 27/10/2013.  
**Rosa Murria**; Sarai Palanca; Inmaculada de Juan; Cecilia Egoavil; Zaida García; M<sup>a</sup> José Juan; Beatriz Sánchez; Ángel Segura; Isabel Chirivella; Dolors Sánchez; Marta Llop; Eva Barragán; David Hervás; Pascual Bolufer.
- Molecular heterogeneity of sporadic breast cancer. Poster  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid. 27/10/2003.  
**Rosa Murria**; Sarai Palanca; Inmaculada de Juan; Cecilia Egoavil; Francisco Seguí; Zaida García; Jose A López; M<sup>a</sup> José Juan; Beatriz Sánchez; Isabel Chirivella; Eva Barragán; Jacobo Santamaría; David Hervás; Pascual Bolufer.
- Immunohistochemistry and molecular pattern of brca-like breast cancer. Poster.  
The Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain. 14/03/2013. **Rosa Murria**; Sarai Palanca; Inmaculada de Juan; Gema Perez; Cecilia Egoavil; Francisco Javier Seguí; Cristina Alenda; Estefania Rojas; Zaida García; José Antonio López; Ana Beatriz Sánchez; Angel Segura; Ignacio Romero; Ana Santaballa; Jacobo Santamaría; Mercedes Goicoechea; Dolores Salas; Isabel Chirivella; Ana García; M<sup>a</sup> José Juan; Pascual Bolufer.
- Perfil molecular e inmunohistoquímico de los cánceres de mama hereditario y esporádico. Resultados preliminares. Comunicación Oral  
II Simposio Nacional SEOM, Madrid. 24/10/2012. **Rosa Murria Estal**; Inmaculada de Juan Jimenez; Sarai Palanca Suela; Cecilia Egoavil Rojas;

Javier Segui Ibanez; Zaida Garcia Casado; Ana Beatriz Sanchez Heras;  
Angel Segura Huerta; Ignacio Romero Noguera; Pascual Bolufer  
Gilabert.





## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- 
- <sup>1</sup> López-Abente G, Aragonés N, Pérez-Gómez B, et al. Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer*. 2014;14:535.
- <sup>2</sup> <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/incidencia.aspx>
- <sup>3</sup> <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/cancer-de-mama-raiz/cancer-de-mama>
- <sup>4</sup> web del Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III Estadísticas de defunciones según la causa de muerte <http://cne.isciii.es/morta/consulta.php>
- <sup>5</sup> Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-960.
- <sup>6</sup> Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ, et al. Family history, age, and risk of breast cancer. Prospective data from the Nurses' Health Study. *JAMA*. 1993;270(3):338-343.
- <sup>7</sup> Venkitaraman AR. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002; 108(2):171-182.
- <sup>8</sup> Broca, *Traite des tumeurs* (1866).
- <sup>9</sup> Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol*. 2010;4(3):174-191.
- <sup>10</sup> Van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(2):71-88.
- <sup>11</sup> Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1117-1130.
- <sup>12</sup> Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer*. 2007;96(1):11-15.
- <sup>13</sup> Genetic Susceptibility to Breast and Ovarian Cancer: Assessment, Counseling and Testing Guidelines. Bethesda (MD): American College of Medical Genetics; 1999. Chapter D, Guidelines justification. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56953/>

- <sup>14</sup> Desmedt C, Voet T, Sotiriou C, Campbell PJ. Next generation sequencing in breast cancer: first take home messages. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(6):597-604.
- <sup>15</sup> Apostolou P, Fostira F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:747318. doi:10.1155/2013/747318.
- <sup>16</sup> Garcia-Closas M, Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor (ER) status. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8000-8009.
- <sup>17</sup> Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(6):722-731.
- <sup>18</sup> Palanca S, Esteban E, Barragán E et al. CASP8 D302H polymorphism delays the age of onset of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(1):87-93.
- <sup>19</sup> Olopade OI, Grushko TA, Nanda R, Huo D. Advances in Breast Cancer: Pathways to Personalized Medicine. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):7988-7999.
- <sup>20</sup> Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. 2008; 61(1-2):141-50.
- <sup>21</sup> Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A-M, Kruse TA. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. *Breast Cancer*. 2014;8:145-155.
- <sup>22</sup> Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3786-3788.
- <sup>23</sup> Cleator S, Ashworth A. Molecular profiling of breast cancer: Clinical implications. *Br J Cancer*. 2004;90:1120-4.
- <sup>24</sup> Mohamed A. Shawarby, Dalal M. Al-Tamimi, Ayesha Ahme. Molecular Classification of Breast Cancer: An Overview with Emphasis on Ethnic Variations and Future Perspectives. *Sjmms*. 2013;1: 14-19.
- <sup>25</sup> Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-10874.
- <sup>26</sup> Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797):747-75.

- 
- <sup>27</sup> Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuellar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. Molecular classification of breast cancer. *Cir Cir.* 2008;76:87-93.
- <sup>28</sup> The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
- <sup>29</sup> Cáncer de mama metastásico. Biblioteca oncológica merck serono. ISBN: 978-84-693-2431-8.
- <sup>30</sup> Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6084-6091.
- <sup>31</sup> Goncalves R, Warner WA, Luo J, Ellis MJ. New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):460.
- <sup>32</sup> Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res.* 2014;16(3):207.
- <sup>33</sup> Holm K, Hegardt C, Staaf J, et al. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):R36.
- <sup>34</sup> Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol.* 2010;4(3):255-266.
- <sup>35</sup> Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2002;15(12):1318–1325.
- <sup>36</sup> Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31(31):3997-4013.
- <sup>37</sup> Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene.* 1996;13(1):63-67.
- <sup>38</sup> Drakaki A, Hurvitz SA. HER2-Positive Breast Cancer: Update on New and Emerging Agents. *Am J Hem Oncol.* 2015;11(4):17-23.

- <sup>39</sup> Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006;25(43):5846-5853.
- <sup>40</sup> Choo JR, Nielsen TO. Biomarkers for Basal-like Breast Cancer. *Cancers*. 2010;2(2):1040-1065. doi:10.3390/cancers2021040.
- <sup>41</sup> Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *Oncologist*. 2010;15(5):39- 48.
- <sup>42</sup> Daly MB, Pilarski R, Axilbund JE, et al; National comprehensive cancer network. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 1.2014. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(9):1326-1338.
- <sup>43</sup> Guía de Práctica Clínica en Cáncer Hereditario. Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat 2010. <http://www.san.gva.es/documents/246911/251004/gpcHEREDITARIO.pdf>
- <sup>44</sup> Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22:50–55.
- <sup>45</sup> DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1993;52(4):678-701.
- <sup>46</sup> Margaritte P, Bonaiti-Pellie C, King MC, Clerget-Darpoux F. Linkage of familial breast cancer to chromosome 17q21 may not be restricted to early-onset disease. *Am J Hum Genet*. 1992;50(6):1231-1234.
- <sup>47</sup> Wooster, R, Neuhausen, SL, Mangion J et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994;265:2088-2090
- <sup>48</sup> Narod, S.A. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 113–123.
- <sup>49</sup> Fostira F, Tsilaidou M, Papadimitriou C, et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(1):353–362.
- <sup>50</sup> Karami F, Mehdipour P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer. *BioMed Res Int*. 2013;2013:928562. doi:10.1155/2013/928562.

- <sup>51</sup> Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*. 2006; 25(43):5854-5863.
- <sup>52</sup> Patel KJ, Yu VP, Lee H, et al. Involvement of BRCA2 in DNA repair. *Mol Cell*. 1998;1:347-357.
- <sup>53</sup> Xu X, Weaver Z, Linke SP, et al. Centrosome Amplification and a Defective G2–MCell Cycle Checkpoint Induce Genetic Instability in BRCA1 Exon 11 Isoform–Deficient Cells. *Mol Cell*. 1999;3:389-395.
- <sup>54</sup> Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. 2013;2(3):130-143.
- <sup>55</sup> Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 2008;18(1):99-113.
- <sup>56</sup> Venkitaraman AR. Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4:461-487.
- <sup>57</sup> Carreira A, Kowalczykowski SC. Two classes of BRC repeats in BRCA2 promote RAD51 nucleoprotein filament function by distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(26):10448-53. doi: 10.1073/pnas.1106971108
- <sup>58</sup> Esashi F, Galkin VE, Yu X, Egelman EH, West SC. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(6):468-474.
- <sup>59</sup> Sy SMH, Huen MSY, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *PNAS*. 2009;106(17):7155-7160.
- <sup>60</sup> de Juan I, Esteban E, Palanca S et al. Low prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in the sporadic breast cancer of Spanish population. *Fam Cancer*. 2012 Mar;11(1):49-56.
- <sup>61</sup> Mueller CR, Roskelley CD. Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2003;5(1):45-52.
- <sup>62</sup> Taylor J, Lymboura M, Pace PE, et al. An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. *Int J Cancer*. 1998;79(4):334-342.

<sup>63</sup> Rzepecka IK, Szafron L, Stys A, et al. High frequency of allelic loss at the BRCA1 locus in ovarian cancers: clinicopathologic and molecular associations. *Cancer Genet.* 2012;205(3):94-100.

<sup>64</sup> Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol.* 2005;18(10):1305-1320.

<sup>65</sup> Osorio A, de la Hoya M, Rodríguez-López R, et al. Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer.* 2002;99:305–309.

<sup>66</sup> Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-823.

<sup>67</sup> Beckmann MW, Picard F, An HX, et al. Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer.* 1996;73(10):1220-1226.

<sup>68</sup> Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(10):814-819.

<sup>69</sup> Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, et al. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell.* 2003;115(5):523-535.

<sup>70</sup> Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. *Genome Med.* 2009;1(6):62. doi:10.1186/gm62.

<sup>71</sup> Kornegoor R, Moelans CB, Verschuur-Maes AH, et al. Oncogene amplification in male breast cancer: analysis by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Breast Cancer Res Treat* 2012;135(1):49-58.

<sup>72</sup> Baak JP, Chin D, van Diest PJ, et al. Comparative long-term prognostic value of quantitative HER2-neu protein expression, DNA ploidy, and morphometric and clinical features in paraffin-embedded invasive breast cancer. *Lab invest.* 1991; 64(2):215-223.

<sup>73</sup> Siggelkow W, Boehm D, Gebhard S, et al. Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2012;12:562. doi:10.1186/1471-2407-12-562.

<sup>74</sup> Bhargava R, Gerald WL, Li AR, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and



HER2 status and absence of EGFR activating mutations. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1027-1033.

<sup>75</sup> Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of HER2, EGFR and cyclin d1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int.* 2008;58(1):17-25.

<sup>76</sup> Turner N, Pearson A, Sharpe R, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70(5):2085-2094.

<sup>77</sup> Nielsen KV, Ejlertsen B, Møller S, et al. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: update of DBCG trial 89D. *Acta oncol.* 2008;47(4):725-734.

<sup>78</sup> Fountzilias G, Christodoulou C, Bobos M, et al. Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *J Transl Med.* 2012;10:212. doi:10.1186/1479-5876-10-212.

<sup>79</sup> Pentheroudakis G, Kotoula V, Eleftheraki AG, et al. prognostic significance of ESR1 gene amplification, mRNA/protein expression and functional profiles in high-risk early breast cancer: a translational study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *Plos One.* 2013;8(7):e70634. doi:10.1371/journal.pone.0070634.

<sup>80</sup> Rodriguez-Pinilla SM, Jones RL, Lambros MBK, et al. MYC amplification in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation study. *J Clin Pathol.* 2007;60(9):1017-1023.

<sup>81</sup> Hudis CA. Trastuzumab Mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007;357:39-51.

<sup>82</sup> Ouchi M, Fujiuchi N, Sasai K, et al. BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem.* 2004;279(19):19643-19648.

<sup>83</sup> Sourisseau T, Maniotis D, McCarthy A, et al. Aurora-A expressing tumour cells are deficient for homology-directed DNA double strand-break repair and sensitive to PARP inhibition. *EMBO Mol Med.* 2010;2(4):130-142.

<sup>84</sup> Staff S, Isola J, Jumppanen M, Tanner M. Aurora-A gene is frequently amplified in basal-like breast cancer. *Oncol Rep.* 2010;23(2):307-312.

- <sup>85</sup> Bodvarsdottir SK, Vidarsdottir L, Eyfjord JE. AURKA and breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(11):2517.
- <sup>86</sup> Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer: current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153(1):13-17.
- <sup>87</sup> Park HS, Jang MH, Kim EJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2014;27(9):1212-1222.
- <sup>88</sup> Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, et al. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136(2):10.1007/s10549-012-2289-9. doi:10.1007/s10549-012-2289-9.
- <sup>89</sup> Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(23):8534-8540.
- <sup>90</sup> Moelans CB, de Weger RA, Monsuur HN, Vijzelaar R, van Diest PJ. Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes. *Mod Pathol.* 2010;23(7):1029-1039.
- <sup>91</sup> Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA, et al. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109(2):325-335.
- <sup>92</sup> Lundgren K, Brown M, Pineda S, et al. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R57. doi:10.1186/bcr3161.
- <sup>93</sup> Elbauomy Elsheikh S, Green AR, Lambros MB, et al. FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res.* 2007;9(2):R23. doi:10.1186/bcr1665.
- <sup>94</sup> Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al; Danish Breast Cancer Cooperative Group. Retrospective analysis of Topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7483-7490.

- <sup>95</sup> Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R et al. Gene amplification of ESR1 in breast cancers--fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol.* 2012;227:8-16.
- <sup>96</sup> Moelans CB, Holst F, Hellwinkel O, Simon R, van Diest PJ. ESR1 amplification in breast cancer by optimized RNase FISH: Frequent but low-level and heterogeneous. *Plos One.* 2013;8(12):e84189. doi:10.1371/journal.pone.0084189.
- <sup>97</sup> Holst F, Stahl PR, Ruiz C, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet.* 2007;39(5):655-660.
- <sup>98</sup> Chen Y, Olopade OI. MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8(10):1689-1698.
- <sup>99</sup> Grushko TA, Dignam JJ, Das S, et al. MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):499-507.
- <sup>100</sup> Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2015;5(1):375-385.
- <sup>101</sup> Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1148-1159.
- <sup>102</sup> Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol;* 2010;4(3):242-254.
- <sup>103</sup> Stecklein SR, Jensen RA, Pal A. Genetic and epigenetic signatures of breast cancer subtypes. *Front Biosci.* 2012;4:934-949.
- <sup>104</sup> Parrella P. Epigenetic Signatures in Breast Cancer: Clinical Perspective. *Breast Care.* 2010;5(2):66-73.
- <sup>105</sup> Radpour R, Kohler C, Haghghi MM, et al. Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array. *Oncogene.* 2009;28(33):2969-2978.
- <sup>106</sup> Sun Z, Asmann YW, Kalari KR, et al. Integrated analysis of gene expression, CPG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing. *Plos One.* 2011;6(2)e17490 doi: 10.1371/0017490.
- <sup>107</sup> Stefansson OA, Moran S, Gomez A, et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Mol Oncol.* 2015;9(3):555-568.

<sup>108</sup> Xu X, Gammon MD, Zhang Y, et al. Gene promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121(3):685–692.

<sup>109</sup> Suijkerbuijk KP, Fackler MJ, Sukumar S, et al. Methylation is less abundant in BRCA1-associated compared with sporadic breast cancer. *Ann Oncol.* 2008;19(11):1870-1874.

<sup>110</sup> Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):3001-3007.

<sup>111</sup> Flanagan JM, Cocciardi S, Waddell N, et al. DNA methylome of familial breast cancer identifies distinct profiles defined by mutation status. *Am J Hum Genet.* 2010;86(3):420-433.

<sup>112</sup> Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(2):115-127.

<sup>113</sup> Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(7):564-569.

<sup>114</sup> Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, et al. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to Cells.* 2013; 18:1120–1130.

<sup>115</sup> Wei M, Xu J, Dignam J, et al. Estrogen receptor  $\alpha$ , BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(1):113-120.

<sup>116</sup> McCabe N, Turner NC, Lord CJ, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* 2006;66:8109-8115.

<sup>117</sup> Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 2012;4(3):143-159.

<sup>118</sup> <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>

- <sup>119</sup> Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(9):2999-3004.
- <sup>120</sup> Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JPA. Clinical Outcome Prediction by MicroRNAs in Human Cancer: A Systematic Review. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(7):528-540.
- <sup>121</sup> Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem*. 2009;55(4):623-631.
- <sup>122</sup> Wang Y, Lee CGL. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2009;13(1):12-23.
- <sup>123</sup> Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122-1143.
- <sup>124</sup> Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005; 65(16):7065-7070.
- <sup>125</sup> Blenkinson C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214. doi:10.1186/gb-2007-8-10-r214.
- <sup>126</sup> Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, Perez EA. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(6):313-319.
- <sup>127</sup> Lowery AJ, Miller N, Devaney A, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):R27. doi:10.1186/bcr2257.
- <sup>128</sup> Volinia S, Galasso M, Sana ME, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(8):3024-3029.
- <sup>129</sup> Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *Plos One*. 2012;7(6):e38847. doi:10.1371/journal.pone.0038847.
- <sup>130</sup> Tanic M, Andrés E, M Rodriguez-Pinilla S, et al. MicroRNA-based molecular classification of non-BRCA1/2 hereditary breast tumours. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2724-2734.

- <sup>131</sup> Tanic M, Yanowski K, Gómez-López G, et al. MicroRNA expression signatures for the prediction of BRCA1/2 mutation-associated hereditary breast cancer in paraffin-embedded formalin-fixed breast tumors. *Int J Cancer*. 2015;136(3):593-602.
- <sup>132</sup> Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73(22):6554-6562.
- <sup>133</sup> Gong C, Yao Y, Wang Y, et al. Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer. *J Biol Chem*. 2011;286:19127–19137.
- <sup>134</sup> Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, et al. miR-182-mediated down-regulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol cell*. 2011;41(2):210-220.
- <sup>135</sup> Yahya SM, Elsayed GH. A summary for molecular regulations of miRNAs in breast cancer. *Clin Biochem*. 2015;48(6):388-396.
- <sup>136</sup> Barh D, Malhotra R, Ravi B, et al. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol*. 2010;17(1):70–80.
- <sup>137</sup> Wang W, Luo Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;16(1):18-31.
- <sup>138</sup> Kayl AE, Meyers CA. Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18(1):24-28.
- <sup>139</sup> Kourea HP, Zolota V, Scopa CD. Targeted pathways in breast cancer: molecular and protein markers guiding therapeutic decisions. *Curr Mol Pharmacol*. 2014;7(1):4-21.
- <sup>140</sup> Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3797-3803.
- <sup>141</sup> Tsang RY, Finn RS. Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(1):6-13.
- <sup>142</sup> Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010;376(9737):235-244.
- <sup>143</sup> Wang W, Figg WD. Secondary BRCA1 and BRCA2 alterations and acquired chemoresistance. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(7):1004-1005.
- <sup>144</sup> Schneider BP, Winer EP, Foulkes WD, et al. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8010-8018.

- <sup>145</sup> Fenaux P, Ades L. Review of azacitidine trials in Intermediate-2- and High risk myelodysplastic síndromes. *Leuk Res.* 2009;33(S2):S7-S11. doi: 10.1016/S0145-2126(09)70227-9.
- <sup>146</sup> Howell PM, Liu Z, Khong HT. Demethylating Agents in the Treatment of Cancer. *Pharmaceuticals.* 2010;3(7):2022-2044.
- <sup>147</sup> Wang R, Li L, Wang L, et al. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells treated with 5-aza-2"-deoxycytidine can reactivate functional estrogen receptor gene expression. *Life Sci J.* 2006;3(1):40-44.
- <sup>148</sup> Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 2007;26(19):2799–2803.
- <sup>149</sup> Weidhaas JB, Babar L, Nallur SM, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res.* 2007;67(23):11111–11116.
- <sup>150</sup> Ma L, Reinhardt F, Pan E, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol.* 2010;28(4):341–347.
- <sup>151</sup> Natrajan R, Mackay A, Wilkerson PM, et al. Functional characterization of the 19q12 amplicon in grade III breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R53. doi:10.1186/bcr3154.
- <sup>152</sup> Rottenberga S, Jaspersa JE, Kersbergena A et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *PNAS* 2008;44:17079–84.
- <sup>153</sup> [http://www.docv.gva.es/datos/2005/03/18/pdf/2005\\_X2935.pdf](http://www.docv.gva.es/datos/2005/03/18/pdf/2005_X2935.pdf)
- <sup>154</sup> [http://www.docv.gva.es/datos/2012/09/19/pdf/2012\\_8552.pdf](http://www.docv.gva.es/datos/2012/09/19/pdf/2012_8552.pdf)
- <sup>155</sup> World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for medical Research Involving Human Subjects [<http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf>]
- <sup>156</sup> Ley 1/2003 de 28 de enero, de Derechos e Información al paciente de la Comunidad Valenciana. <http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/25/pdfs/A07587-07595.pdf>
- <sup>157</sup> Ley 14/2007 de 3 de julio, de Investigación Biomédica. [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fdinvestigacion/Ley\\_Investigacion\\_Biomedica.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fdinvestigacion/Ley_Investigacion_Biomedica.pdf)

<sup>158</sup> de Juan I, Esteban E, Palanca S, et al. High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115:405–414.

<sup>159</sup> Schouten JP, Elgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 acids nucleic sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Research.* 2002; 30, e57.

<sup>160</sup> Hogervorst F, Nederlof P, Gille J, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res.* 2003;63:1449-1453.

<sup>161</sup> Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(7):e48-72. doi: 10.1043/1543-2165-134.7.e48.

<sup>162</sup> [http://www.dako.com/es/28630\\_herceptest\\_interpretation\\_manual-breast\\_ihc\\_row.pdf](http://www.dako.com/es/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf)

<sup>163</sup> Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008;8(4):417-34. doi: 10.1586/14737159.8.4.417.

<sup>164</sup> Tang Y, Zhu L, Li Y, et al. Overexpression of epithelial growth factor receptor (EGFR) predicts better response to neo-adjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *J Transl Med.* 2012;10 Suppl 1:S4. doi: 10.1186/1479-5876-10-S1-S4.

<sup>165</sup> Gillett CE, Miles DW, Ryder K, et al. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol.* 2001;193:433–441.

<sup>166</sup> Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-1747.

<sup>167</sup> Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;20;101(10):736-750.



- <sup>168</sup> Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5367-5374.
- <sup>169</sup> Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer.* 2007;97(10):1457-1464.
- <sup>170</sup> <http://www.mlpa.com>
- <sup>171</sup> Griffiths-Jones S, Saini H, van Dongen S, Enright A. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research.* 2008;36:D154-D159. doi:10.1093/nar/gkm952.
- <sup>172</sup> Bolstad B, Irizarry R, Astrand M, Speed T. A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics.* 2003;19(2):185-193.
- <sup>173</sup> Irizarry R, Bolstad B, Collin F, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data *Nucleic Acids Research.* 2003;31(4):e15.
- <sup>174</sup> Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *J Am Statistical Association.* 2004;99: 909.
- <sup>175</sup> <http://www.partek.com/partekgs>
- <sup>176</sup> Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- <sup>177</sup> [diana.cslab.ece.ntua.gr](http://diana.cslab.ece.ntua.gr)
- <sup>178</sup> Maragkakis M, Alexio P, Papadopoulos G, et al. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 2009;10:295. doi:1471-2105/10/295.
- <sup>179</sup> Vlachos I, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 2015;43:D153-9. doi: 10.1093/nar/gku1215.
- <sup>180</sup> <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro>

<sup>181</sup> Laganà A, Forte S, Giudice A, et al. miRò: a miRNA knowledge base. *Database*. 2009;2009:bap008. doi:10.1093/database/bap008.

<sup>182</sup> <http://mirecords.umn.edu/miRecords/>

<sup>183</sup> <http://www.targetscan.org>

<sup>184</sup> <http://pictar.mdc-berlin.de/>

<sup>185</sup> <http://www.microrna.org/>

<sup>186</sup> [http://www.partek.com/Tutorials/microarray/User\\_Guides/HierarchicalClustering.pdf](http://www.partek.com/Tutorials/microarray/User_Guides/HierarchicalClustering.pdf)

<sup>187</sup> [http://www.partek.com/html/PartekFlow/Principal\\_Components\\_Analysis.pdf](http://www.partek.com/html/PartekFlow/Principal_Components_Analysis.pdf)

<sup>188</sup> Le Cao KA, Boitard S, Besse P. Sparse PLS Discriminant Analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:253.

<sup>189</sup> <http://www.r-project.org>

<sup>190</sup> Palacios J, Honrado E, Osorio A, et al. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10):3606-3614.

<sup>191</sup> Vaziri S A, Krumroy L M, Elson P, et al. Breast tumor immunophenotype of BRCA1-mutation carriers is influenced by age at diagnosis. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1937-1945.

<sup>192</sup> Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*. 2002;20:2310-2318.

<sup>193</sup> Tung N, Wang Y, Collins LC, et al. Estrogen receptor positive breast cancers in BRCA1 mutation carriers: clinical risk factors and pathologic features. *Breast Cancer Res*. 2010;12(1):R12. doi:10.1186/bcr2478.

<sup>194</sup> Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, et al. Estrogen receptor status in BRCA1 and BRCA2 related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2029-2034.

- <sup>195</sup> Honrado E, Benítez J, Palacios J. The pathology of hereditary breast cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2004;2(3):131-138.
- <sup>196</sup> Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer.* 1992;70(6 Suppl):1755-1764.
- <sup>197</sup> Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, Gugala K, Domagala W. Immunophenotypic predictive profiling of BRCA1-associated breast cancer. *Virchows Arch.* 2011;458:55–64.
- <sup>198</sup> Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemother Res Prac.* 2012;2012:743193. doi:10.1155/2012/743193.
- <sup>199</sup> Davoli A, Hocevar BA, Brown TL. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(4):611-623.
- <sup>200</sup> Aloraifi F, Alshehhi M, McDevitt T, et al. Phenotypic analysis of familial breast cancer: comparison of BRCAx tumors with BRCA1, BRCA2 carriers and non familial breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(5):641-646.
- <sup>201</sup> Hosey AM, Gorski JJ, Murray MM, et al. Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 1683-94. doi:10.1093/jnci/djm207.
- <sup>202</sup> Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer epidemiol biomarkers prev* 2012;21(1):134-147.
- <sup>203</sup> Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4429–4434.
- <sup>204</sup> Tun NM, Villani G, Ong K, Yoe L, Bo ZM. Risk of having BRCA1 mutation in high-risk women with triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Clin Gene.* 014;85: 43–48.
- <sup>205</sup> Honrado E, Osorio A, Milne RL, et al. Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCAx families. *Mod Pathol.* 2007;20(12):1298-1306.
- <sup>206</sup> Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer.* 2010;1(6):629-640.

- <sup>207</sup> Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, et al. Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancers. *Cancer Res.* 2007;67(20):9649-57.
- <sup>208</sup> Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, et al. Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers. *Cancer Res.* 2002;62(5):1481-1488.
- <sup>209</sup> Mukai H. Targeted therapy in breast cancer: current status and future directions. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40:711-716.
- <sup>210</sup> Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res.* (2009);15:7381–7388.
- <sup>211</sup> Abdelmagid SA, Too CKL. Prolactin and estrogen up-regulate carboxypeptidase-D to promote nitric oxide production and survival of MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2008;149:4821–4828.
- <sup>212</sup> Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17:107–118.
- <sup>213</sup> Orucevic A, Bechberger J, Green AM, Shapiro RA, Billiar TR, Lala PK. Nitric oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness. *Int J Cancer.* 1999;81:889–896.
- <sup>214</sup> Jadeski LC, Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol.* 1999;155:1381–1390.
- <sup>215</sup> Feng W, Orlandi R, Zhao N, et al. Tumor suppressor genes are frequently methylated in lymph node metastases of breast cancers. *BMC Cancer.* 2010;10:378. doi:10.1186/1471-2407-10-378.
- <sup>216</sup> Kajabova V, Smolkova B, Zmetakova I, et al. RASSF1A promoter methylation levels positively correlate with estrogen receptor expression in breast cancer patients. *Transl Oncol.* 2013;6:297-304.
- <sup>217</sup> Sunami E, Shinozaki M, Sim MS, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R46. doi:10.1186/bcr2098.

- <sup>218</sup> Thaler S, Schmidt M, Schad A, Sleeman JP. RASSF1A inhibits estrogen receptor alpha expression and estrogen-independent signalling: implications for breast cancer development. *Oncogene*. 2012;31(47):4912-4922.
- <sup>219</sup> Lin YL, Sun G, Liu XQ, Li WP, Ma JG. Clinical significance of CDH13 promoter methylation in serum samples from patients with bladder transitional cell carcinoma. *J Int Med Res*. 2011;39(1):179-186.
- <sup>220</sup> Kuphal S, Martyn AC, Pedley J, et al. H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22(3):296-306.
- <sup>221</sup> Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*. 1997;390(6656):180-184.
- <sup>222</sup> Li Y, Melnikov AA, Levenson V, et al. A seven-gene CpG-island methylation panel predicts breast cancer progression. *BMC Cancer*. 2015;15:417. doi:10.1186/s12885-015-1412-9.
- <sup>223</sup> Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*. 2011;17(3):330-9. doi: 10.1038/nm.2305.
- <sup>224</sup> Chang S, Sharan SK. Epigenetic control of an oncogenic microRNA, miR-155, by BRCA1. *Oncotarget*. 2012;3:5–6.
- <sup>225</sup> Chang S, Wang R-H, Akagi K, et al. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat Med*. 2011;17(10):1275-1282.
- <sup>226</sup> Bailey ST, Westerling T, Brown M. Loss of estrogen-regulated microRNA expression increases HER2 signaling and is prognostic of poor outcome in luminal breast cancer. *Cancer Res*. 2015;75(2):436-445.
- <sup>227</sup> Stein RA, McDonnell DP. Estrogen-related receptor alpha as a therapeutic target in cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13 Suppl 1:S25-32.
- <sup>228</sup> Yang C, Zhou D, Chen S. Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR alpha-1 orphan receptor. *Cancer Res*. 1998;58(24):5695-5700.
- <sup>229</sup> Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62(22):6510-6518.
- <sup>230</sup> Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;142(1):19-30.

- <sup>231</sup> Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. Relationship of immunohistochemistry, copy number aberrations and epigenetic disorders with BRCAness pattern in hereditary and sporadic breast cancer. *Fam Cancer*. 2015 (Bajo revisión)
- <sup>232</sup> Lips EH, Mulder L, Oonk A, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer*. 2013;108(10):2172-2177.
- <sup>233</sup> Turner NC, Ashworth A. Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(1):283-286.
- <sup>234</sup> Mulrane L, Madden SF, Brennan DJ, et al. miR-187 is an independent prognostic factor in breast cancer and confers increased invasive potential in vitro. *Clin Cancer Res*. 2012;18(24):6702-6713.
- <sup>235</sup> Dedes KJ, Wilkerson PM, Wetterskog D, et al. Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cell Cycle*. 2011;10:1192–1199.
- <sup>236</sup> Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. Immunohistochemical, genetic and epigenetic profiles of hereditary and triple negative breast cancers. Relevance in personalized medicine. *Am J Can Res*. 2015;5(7):2330-2343.
- <sup>237</sup> Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, et al. Aurora kinase A outperforms Ki67 as a prognostic marker in ER-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;106:1798–1806.
- <sup>238</sup> Wang Q, Zhang H, Kajino K, Green MI. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene*, 1998;17:1939-1948.
- <sup>239</sup> Singhi AD, Cimino-Mathews A, Jenkins RB, et al. MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors. *Mod Pathol* 2012;25:378-387.
- <sup>240</sup> Li Z, Owonikoko TK, Sun SY, et al. Deng X. c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. *Neoplasia*. 2012;14:1190–1202.
- <sup>241</sup> Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, et al. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med*. 2012;209(4):679-696. doi:10.1084/jem.20111512
- <sup>242</sup> Li SG, Li L. Targeted therapy in HER2 positive breast cancer (Review). *Biomed Rep*. 2013;1:499-505.

- <sup>243</sup> Lehmann U, Länger F, Feist H, et al. Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am J Pathol.* 2002;160(2):605-612.
- <sup>244</sup> Feng W, Shen L, Wen S, et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):R57. doi:10.1186/bcr1762.
- <sup>245</sup> Collins N, Wooster R, Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Can.* 1997;76(9):1150-1156.
- <sup>246</sup> Welch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):705-713.
- <sup>247</sup> Purnomosari D. Molecular analysis of early onset Indonesian breast cancer. Doctoral Thesis. The Netherlands: Utrecht University; 2006.
- <sup>248</sup> Moelans CB, Anoek HJ, Verschuur-Mae J, van Diest P. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol.* 2011; 225: 222–231.
- <sup>249</sup> R. Ben Gacem, M. Hachana, S. Ziadi, et al. Contribution of epigenetic alteration of BRCA1 and BRCA2 genes in breast carcinomas in Tunisian patients. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(2):190-197.
- <sup>250</sup> Foulke WD. BRCA1 and BRCA2: Chemosensitivity, Treatment Outcomes and Prognosis. *Familial Cancer.* 2006;5(2):135-142.
- <sup>251</sup> Veeck J, Roper S, Setien F, Gonzalez-Suarez E, et al. BRCA1 CpG Island Hypermethylation Predicts Sensitivity to Poly(Adenosine Diphosphate)-Ribose Polymerase Inhibitors. *J Clin Oncol.* 2010(29):e563-4. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1010.
- <sup>252</sup> Verma S, Provencher L, Dent R. Emerging trends in the treatment of triple-negative breast cancer in Canada: a survey. *Curr Oncol.* 2011;18(4):180-190.
- <sup>253</sup> Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999;19(1):1-11.
- <sup>254</sup> Kumar V. Robins Patología Humana. Editorial: S.A. Elsevier España (8ª ED.) 2008. ISBN: 9788480863322.
- <sup>255</sup> Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, et al. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature.* 2006;440(7084):702-706.

- <sup>256</sup> Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 2007;59(7):419-426.
- <sup>257</sup> Cairns J, Wright C, Cattan AR, et al. Immunohistochemical demonstration of glutathione S-transferases in primary human breast carcinomas. *J Pathol*. 1992;166:19–25. doi:10.
- <sup>258</sup> Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *PNAS*, 1994;91:11733– 11737
- <sup>259</sup> Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB. Inactivation of glutathione S-transferase P by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*. 1998; 58: 4515–4518.
- <sup>260</sup> Lee JS. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Arch*. 2007;450:637–642.
- <sup>261</sup> Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, et al. Association of GSTP1 CpG island hypermethylation with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 100: 169–176.
- <sup>262</sup> Saxena A, Dhillon VS, Shahid M, et al. GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Exp Ther Med*. 2012;4(6):1097-1103.
- <sup>263</sup> Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 2156–2162.
- <sup>264</sup> Lasabova Z, Tilandyova P, Kajo K, et al. Hypermethylation of the GSTP1 promoter region in breast cancer is associated with prognostic clinicopathological parameters. *Neoplasma*. 2010;57(1):35-40.
- <sup>265</sup> Tew KD, Manevich Y, Grek C, et al. The role of Glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(2):299-313.
- <sup>266</sup> Severson TM, Peeters J, Majewski I, et al. BRCA1-like signature in triple negative breast cancer: Molecular and clinical characterization reveals subgroups with therapeutic potential. *Mol Oncol*. 2015.doi: 10.1016/j.molonc.2015.04.011.



<sup>267</sup> Jacot W, Thezenas S, Senal R, et al. BRCA1 promoter hypermethylation, 53BP1 protein expression and PARP-1 activity as biomarkers of DNA repair deficit in breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:523. doi:10.1186/1471-2407-13-523.

<sup>268</sup> Veeck J, Ropero S, Setien F, et al. BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):e563-4. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1010.

<sup>269</sup> Xu Y, Diao L, Chen Y, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1498-505.

<sup>270</sup> Yuan P, Xu Y, Ouyang T, et al. Correlation of BRCA1 and APC aberrant methylation with the response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2009;31(4):282-286.

<sup>271</sup> Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009;20(12):1913-1927.

<sup>272</sup> Corkery B, Crown J, Clynes M, O'Donovan N. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(5):862-867.

