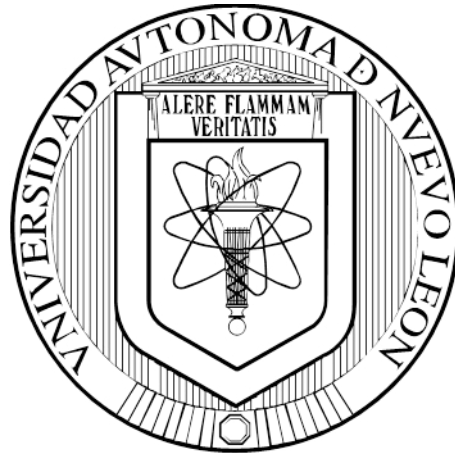


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN PANEL DE GENES
RELACIONADOS A CÁNCER EN BIOPSIAS DE PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

PRESENTADA POR

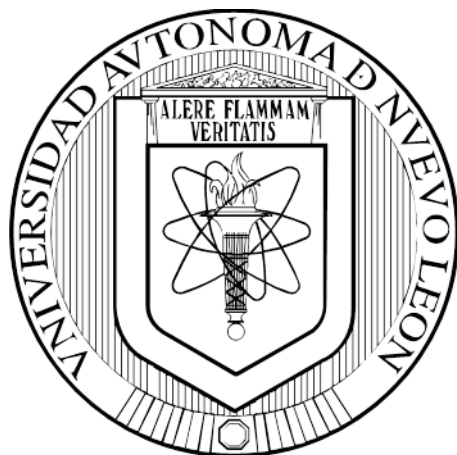
M.C. GRECIA IRIS USCANGA PERALES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

SEPTIEMBRE, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN PANEL DE GENES
RELACIONADOS A CÁNCER EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

PRESENTADA POR

M.C. GRECIA IRIS USCANGA PERALES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

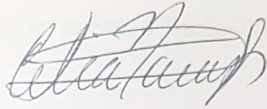
SEPTIEMBRE, 2018

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); bajo la dirección de la Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez y la codirección de la Dra. C. Rocío Ortiz López.

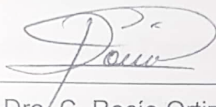
Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro: BI11-005. Fue financiado por CONACyT de la convocatoria Fondo salud número: 162301.

Caracterización molecular de un panel de genes relacionados a cáncer en
biopsias de pacientes con cáncer de mama triple negativo

Aprobación de la tesis:



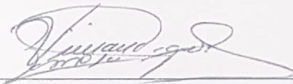
Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Directora de Tesis



Dra. C. Rocío Ortiz López
Co-Directora de Tesis




Dr. C. Alberto Camacho Morales
Miembro de la Comisión



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Miembro de la Comisión



Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Colaboradores

Dra. Sandra Karina Santuario Facio

Investigador PostDoctoral

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud TecSalud

Dra. Gabriela Sofia Gómez Macías

Profesora, Médico Anatomopatólogo

Centro de Cáncer de Mama del Hospital Zambrano Hellion.

Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey.

Ginecopatología y Citopatología de la especialidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario.

Dr. Servando Cardona Huerta

Cirujano Oncólogo

Centro de Cáncer de Mama del Hospital Zambrano Hellion.

Para mi esposo. Ulrich, eres un hombre ejemplar, agradezco a Dios la bendición de tenerte en mi vida. Cuando he sentido que ya no puedo más, estás tú para levantarme. Tú nos cuidas, nos amas y consientes. Eres mi compañero de sueños. Te amo.

Para mis hijas, Sofia y Victoria. Me encanta ser su mamá, me dan tantas satisfacciones, hasta en las acciones en las que se pensaría que es imposible. Muero de amor cuando sonríen, cuando me abrazan, bailan, cantan. Dios las proteja siempre. Las amo.

Para mi mamá. Encuentro siempre en ti amor, apoyo y comprensión. Gracias por ser para mis hijas una abuelita alegre que juega con ellas, las consiente y sobre todo, que las ama.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	8
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Clasificación del cáncer de mama	16
1.2 Firmas Genómicas en CM con valor pronóstico.	18
1.3 Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN)	21
1.4 Factores de riesgo de CMTN.	21
1.5 Clasificación molecular de subtipos de CMTN	24
1.6 Tratamiento de CMTN	26
1.7 Búsqueda de biomarcadores en CMTN	27
1.8 Linfocitos infiltrantes de tumor	29
1.8.1 Linfocitos infiltrantes de tumor en cáncer de mama triple negativo	31
II. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVO GENERAL	35
4.1 Objetivos específicos	35
V. MATERIAL Y MÉTODOS	36
5.1 Materiales	36
5.1.1 Consumibles	36

5.1.2 Reactivos	36
5.1.3 Material Biológico	37
5.1.4 Equipo	37
5.2 Lugar donde se realizó el estudio.	38
5.3 Diseño del estudio.	38
5.4 Población de estudio	38
5.5 Descripción del diseño.	39
5.6 Metodología experimental	39
5.6.1 Extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos.	39
5.6.2 Detección de mutaciones del panel de genes de cáncer en tumores triple negativo por secuenciación.	41
5.6.3 PCR tiempo real de ANKRD11, FOXC1, LPIN1, UGT8 y BCL11A.	42
5.6.4 Evaluación de linfocitos infiltrantes de tumor	42
5.7 Análisis estadístico	44
5.8 Esquema general del estudio	45
VI. RESULTADOS	46
6.1 Caracterización molecular mediante secuenciación de CMTN.	46
6.2 Expresión de <i>BCL11A</i>, <i>FOXC1</i>, <i>ANKRD11</i>, <i>LPIN1</i> y <i>UGT8</i> en tumores de CMTN mediante qPCR.	52
6.3 Linfocitos infiltrantes de tumor	54
VII. DISCUSIÓN	58
VIII. CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFIA	73
ANEXO I	87
ANEXO II	91

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones que me brinda.

A mi esposo, por su comprensión, su amor y darme siempre su apoyo incondicional.

A mi familia. Gracias, madre porque tú formaste mis cimientos, gracias por inspirarme y darme la oportunidad que hoy tengo de llegar hasta aquí, gracias por tus cuidados, tu amor y tu paciencia. Karen y Denisse, gracias porque ustedes son siempre un buen refugio, las que siempre me chiflan y me escuchan. German, gracias por dejarme desahogarme contigo, gracias por cuidarnos siempre. Pedro, gracias porque aunque eres el más joven de nosotros, siempre has sido muy comprensivo con todo y con todos. Gracias, padre por tu cariño, tus atenciones y tus cuidados.

A mis asesores. Dra. Rocío, gracias por sus atenciones y su confianza, Dra. Celia gracias por su disposición a ayudarme, Dra. Sandra, gracias por tu apoyo. Gracias a ustedes por su instrucción y compartir su conocimiento

A mis maestros, Dra. Ana María, Dr. Ivan Marino, Dra. Viviana, Dr. Alberto Camacho, Dra. Liz Fuentes, Dra. Herminia, Dr. Carlos Córdova, Dr. Ascacio, gracias por sus enseñanzas y porque sin duda alguna todos sus comentarios y observaciones ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y a mis compañeros de generación. Geo, Liz, Laura, Ernesto, Bianka, José Ramón, Daniel. Gracias por hacer los días más entretenidos, esas “3 tachitas” fueron sin duda muy convenientes.

A mis amigos, Claudia, Brenda, Charly, Memo. Gracias por escucharme, por su cariño y su inigualable amistad.

A mi familia política. Suegra, Missia, Havel, gracias por su cariño, sus atenciones y su apoyo incondicional.

Al personal administrativo y apoyo técnico del departamento y del CIDICS. Gracias porque sin ustedes no sería posible el día a día.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Potenciales blancos terapéuticos de CMTN.	28
Tabla 2. Características clínicas de las mujeres con CMTN que participaron en el estudio de secuenciación.	46
Tabla 3. Genes con variantes de cambio de sentido, codón de terminación o variantes en la región de corte y empalme.....	49
Tabla 4. Características clínicas de las mujeres con CMTN y CMnTN de las que se obtuvo biopsia para realizar los análisis de expresión.	52
Tabla 5. Características clínico-patológicas.....	55
Tabla 6. Tipo de respuesta y niveles de linfocitos.....	56
Tabla 7. Regresión univariable de la respuesta patológica completa.	57
Tabla 8. Descripción de genes con expresión aumentada en CMTN.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación del cáncer de mama.	17
Figura 2. Clasificación molecular intrínseca de 48 muestras de tejido de cáncer de mama mediante el algoritmo PAM50.	20
Figura 3. Clasificación (Lehman) de cáncer de mama triple negativo, ontología génica y proporción.....	26
Figura 4. Esquema general del diseño de estudio.	45
Figura 5. Gráfica de tipo de variantes de cada muestra analizada.....	48
FIGURA 6. Estructura del gen TP53 y distribución de variantes.	51
Figura 7. Expresión de una firma de genes propuesta en CMTN.....	53
Figura 8. Expresión de una firma de genes propuesta en CMTN, excepto FOXC1.	54
Figura 9. Representación de los resultados de Inmunohistoquímicas.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC American Joint Committee on Cancer

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario

CM Cáncer de Mama

CMTN Cáncer de mama triple negativo

dbSNP Polimorfismo de un solo nucleótido de doble cadena

DEL Delección

DNA Ácido desoxirribonucleico

gDNA Ácido desoxirribonucleico genómico

IHQ Inmunohistoquímica

Indel Inserciones/delecciones

INS Inserción

Ki67 Antígeno identificado por el anticuerpo Ki-67

mRNA Ácido ribonucleico mensajero

NAT Terapia Neoadyuvante

NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica

ng Nanogramos

NR No respuesta

P63 Proteína tumoral p63

PAM50 Algoritmo compuesto por la expresión de 50 genes para la clasificación

molecular PCR Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RE Receptor de Estrógeno

RNA Ácido ribonucleico

RP Receptor de Progesterona

RPC Respuesta Patológica Completa

RPP Respuesta Patológica Parcial

TIL Linfocitos Infiltrantes de Tumor (Por sus siglas en inglés)

TP53 Proteína tumoral P53

µg Microgramos

RESUMEN

Título del estudio: Caracterización molecular de un panel de genes relacionados a cáncer en biopsias de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

Introducción: El cáncer de mama triple negativo es un subtipo de cáncer de mama de naturaleza heterogénea que mediante el análisis inmunohistoquímico es negativo para el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Aproximadamente el 15-20% de todos los CM corresponden al fenotipo CMTN. A la fecha no existe terapia dirigida para este tipo de cánceres y la quimioterapia citotóxica sigue siendo el único tratamiento estándar. Tomando en cuenta algunas de las limitaciones más comunes en el análisis de las muestras de CMTN, nuestro grupo de investigación realizó un estudio prospectivo que incluyó una muestra homogénea de un total de 50 mujeres con cáncer de mama. Se determinaron, mediante la tecnología de microarreglos de expresión, los perfiles de expresión de los tejidos al momento del diagnóstico. Lo que se encontró fue una firma genómica de CMTN compuesta por 2 componentes esenciales: un componente metabólico y un componente inmunológico, por lo que deseamos continuar el estudio de este tipo de muestras. **Objetivo:** Caracterizar biopsias de CMTN para identificar factores asociados a este subtipo de cáncer de mama. **Material y métodos:** A partir de un banco de muestras de tejido de biopsias de CMTN y CMnTN se realizó: 1) La secuenciación de un panel de genes relacionados a cáncer en muestras CMTN; 2) La medición de la expresión de genes, propuestos por el grupo de investigación, en biopsias de CMTN y CMnTN y 3) el análisis cuantitativo de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL por sus siglas en inglés) en las biopsias de pacientes con CMTN y la respuesta patológica. **Resultados:** Se encontraron genes con variantes de cambio de sentido en 25 de 48 genes analizados. *TP53*, *PIK3CA* y *FLT3* fueron los genes que además de presentar variantes intrónicas, presentaron variantes con posibles consecuencias a nivel transcripcional. El gen con mayor número de variantes fue *TP53* con 15 variantes en el total de las muestras analizadas, *PIK3CA* presentó 4 variantes y *FLT3* presentó una variante en la región de corte y empalme, ambas en el 84 % de las

muestras analizadas (16/19) . Se encontró una expresión diferencial de los niveles de expresión de *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXC1*, *LPIN1* y *UGT8* en CMTN. No se encontró una diferencia significativa entre la cantidad de Linfocitos Tumorales Infiltrados y la Respuesta Patológica Completa en las muestras de CMTN analizadas. **Conclusión:** En este trabajo se confirmó la expresión diferencial de 5 genes (*UGT8*, *BCL11A*, *ANKRD11*, *LPIN1* y *FOXC1*) seleccionados a partir de estudios previos de nuestro grupo de trabajo, así como la identificación de alteraciones en 25 genes de un panel de 48, principalmente en *TP53*, *PIK3CA* y *FLT3*. No encontramos asociación entre TIL y la respuesta patológica. Finalmente, es la imperante necesidad de encontrar blancos moleculares de CMTN lo que le da un valor sobresaliente a los genes que reportamos en este trabajo, pues pueden ser considerados para posteriores evaluaciones como blancos terapéuticos o de pronóstico de CMTN.

Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Director de Tesis

Caracterización molecular de un panel de genes relacionados a cáncer en biopsias de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

I. INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Mama (CM) es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres y representa el 30% de todos los nuevos casos de cánceres en población caucásica. Una mujer que vive en los Estados Unidos tiene un 12.3% (1 de cada 8) de riesgo de ser diagnosticada con cáncer de mama². En el año 2012 se registraron en el mundo 1.67 millones de casos nuevos según datos de la OMS³. En México, el CM ocupa también el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en mujeres, representa el 11.34% de todos los casos de cáncer con un incremento global de aproximadamente 1.5% anual, sin embargo, en los países de economía emergente este incremento es alrededor de hasta el 5%⁴.

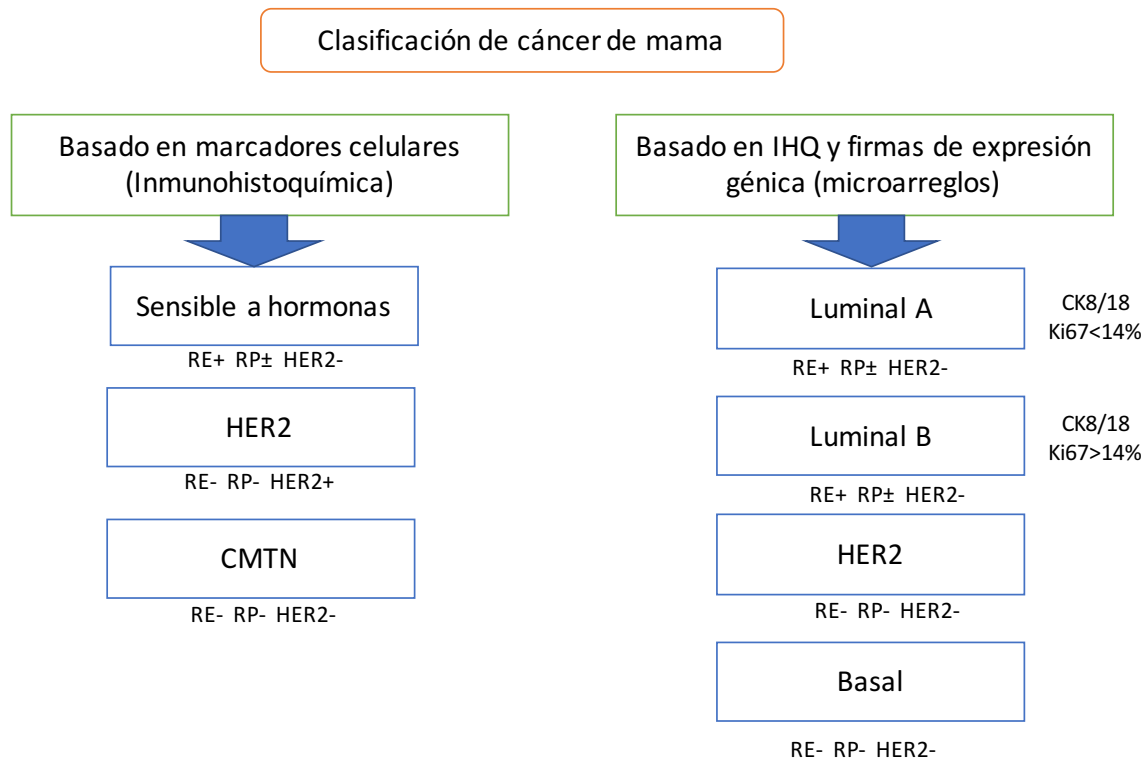
A pesar de tener un mismo tejido de origen, el CM representa un grupo heterogéneo de cánceres de comportamiento biológico complejo y con una gran variabilidad clínica. En los últimos 10 años, se ha incrementado la investigación a nivel molecular y genético para subtipificar estos CM, lo que ha permitido determinar variables clínicas, patológicas y moleculares para seleccionar modalidades de tratamiento y pronosticar en algunos casos la evolución de la enfermedad al momento del diagnóstico⁵.

1.1 Clasificación del cáncer de mama

Tradicionalmente, basándose en pruebas de inmunohistoquímica estándar dirigida a marcadores celulares que reflejan la disponibilidad de terapias blanco, el CM se clasifica en cuatro principales grupos^{6; 7; 8; 9}: (a) luminal A: positivo a Receptor de Estrógeno (RE) y a Receptor de Progesterona (RP), negativo para la amplificación del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 /HER2), índice de proliferación bajo (Ki-67<14%); (b) luminal B: RE positivo, HER2 negativo o positivo, índice de proliferación alto (Ki-67 >14%), RP negativo o bajo positivo; (c) HER2 sobreexpresado: HER2 sobre expresado o amplificado, RE y RP negativos; d) basal-like o CM triple negativo (CMTN): definido por la ausencia de expresión de RE, RP y ausencia de la amplificación de HER2. Las terapias blanco están disponibles para las categorías luminal A, B y HER2 amplificado pero no hay una opción disponible de tratamiento dirigido para el CMTN y la quimioterapia sigue siendo la mejor opción terapéutica, sin embargo, bajo recurrencia o quimiorresistencia, las opciones terapéuticas son muy limitadas¹⁰.

A finales de los 90s cuando las plataformas para estudios genómicos estuvieron disponibles, los métodos de IHQ acompañados de la tecnología de microarreglos de ADN complementario (ADNc), permitieron una clasificación más extensa del CM y pudieron definirse cuatro subgrupos distintos de CM, los cuales difieren en pronóstico y en los blancos que expresan: luminal A, luminal B, HER2, tipo basal¹¹;
¹². Esta clasificación está basada en la consideración de que hay dos tipos celulares en la glándula mamaria, las células luminales y las células basales, estos dos tipos celulares pueden ser distinguidos por IHQ como células luminales que expresan

receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP) y que son positivos para queratinas 8/18, mientras que las células basales son positivas para queratinas 5/6 y 17^{13; 14}. Debido al costo que involucra utilizar la tecnología de microarreglos en la clínica, las técnicas más empleadas para la clasificación del CM siguen siendo la IHQ y el FISH^{7; 8; 9; 15}. FIGURA 1.



Fuente: Imagen tomada del artículo “Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity”¹

Figura 1. Clasificación del cáncer de mama.

El 60 a 70% de todos los CM corresponde a subtipos RE o RP positivos⁷, que generalmente responden a la terapia RE dirigida, como los moduladores selectivos de RE (por ejemplo, tamoxifeno) o inhibidores de la aromatasa, que reducen las concentraciones séricas de estrógenos. El 15 a 20% de los CM amplifican o sobreexpresan el oncogen HER2, este tipo de cáncer se asocia con mal pronóstico,

sin embargo, el advenimiento de tratamientos orientados a HER2 (por ejemplo, trastuzumab) han mejorado mucho los resultados en mujeres con CM HER2+¹⁶.

1.2 Firmas Genómicas en CM con valor pronóstico.

A pesar de que no se han convertido en métodos de rutina, los métodos genómicos se han empleado en estudios de investigación con el fin de: a) conocer mejor la naturaleza de estas variantes de CM, b) estratificar a los pacientes mediante la valoración de la evolución de la enfermedad (evaluando las características clínico patológicas) y c) entender la probable respuesta del paciente al tratamiento en relación al estado de RE, RP, HER2 y tasa de proliferación^{6; 17}.

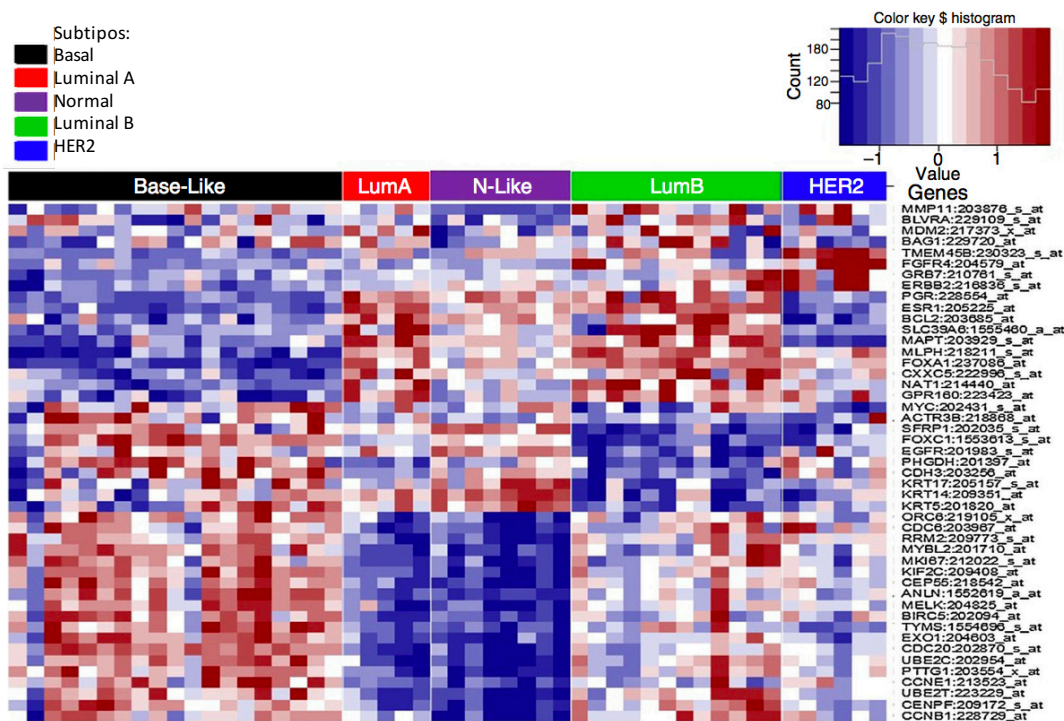
Mediante el análisis de expresión global con microarreglos, se han podido identificar grupos de genes (firmas genómicas) que permiten estimar el riesgo de recurrencia de la enfermedad y/o predecir la respuesta a la terapia adyuvante en pacientes con CM en estadios tempranos^{18; 19; 20; 21}. Algunas de estas firmas genómicas han sido validadas en grandes cohortes y han dado origen a algunas pruebas genómicas comerciales y proporcionan al clínico dicha información complementaria con el fin de clasificar de una manera más precisa a los pacientes con alto riesgo de recurrencia, ofreciendo una atención más personalizada. La primera firma comercial, y todavía ampliamente distribuida bajo su nombre comercial es: MammaPrint® (Agilent, Ámsterdam, Holanda). Esta firma mide la expresión de ARNm de 70 genes¹⁹ y fue aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) y por los reguladores de la Unión Europea, como un ensayo con valor pronóstico para pacientes con CM menores de 61 años de edad,

en estadio I / II, ganglios linfáticos negativos o uno a tres ganglios linfáticos positivos; además de identificar con precisión los pacientes que pueden evitar de forma segura la quimioterapia adyuvante^{18; 22}. MammaPrint estratifica los pacientes en grupos de bajo o alto riesgo¹⁸, sin embargo, aunque la discriminación es buena entre los cánceres con RE+, no es así con los cánceres RE negativos^{23; 24}, limitando su valor clínico en este subgrupo de pacientes.

Otro ensayo ampliamente distribuido y disponible comercialmente es la prueba Oncotype DX® (Genomic Health, Redwood City, CA, EE.UU.). Esta prueba se emplea para clasificar a pacientes con CM subtipos Luminal A, B y HER2+, pero no a los CMTN, pues se ha diseñado para evaluar genes relacionados con RE, genes de proliferación, HER2 y genes relacionados con invasión, entre otros²⁰. Esta prueba permite al oncólogo discernir sobre si será o no benéfico el tratamiento con quimioterapia. Este ensayo mide la expresión de 21 genes que brinda información de recurrencia de la enfermedad mediante una puntuación que va de 0 a 100, estratificando a las pacientes en grupos de bajo riesgo (puntuación < 18), de riesgo intermedio (puntuación de 18 a 30) o alto riesgo (≥ 31)^{20; 21}.

Una tercera prueba, que consiste en un algoritmo para la clasificación molecular intrínseca del CM, se ha denominado PAM50 (Figura 2). Ésta fue diseñada para mejorar la concordancia de clasificación por IHQ y microarreglos²⁵. Esta firma de 50 genes puede clasificar los CM como luminal A, luminal B, HER2 y tipo basal. Con el fin de traducir los diferentes subtipos intrínsecos a un valor pronóstico asociado se ha diseñado la puntuación PAM50²⁵. Una aplicación de esta puntuación es la

identificación de pacientes que podrían beneficiarse de la adición de paclitaxel semanal a la quimioterapia convencional con antraciclina como tratamiento adyuvante del CM operable con propagación a ganglios linfáticos.²⁶ En el 2013, Prosigna (Seattle, WA, EE.UU) empezó a comercializar un kit de diagnóstico que cuantifica la expresión de ARNm de los 50 genes utilizados por el algoritmo para calcular riesgo de recurrencia²⁷.



Fuente: Imagen tomada del artículo “Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity”¹

Figura 2. Clasificación molecular intrínseca de 48 muestras de tejido de cáncer de mama mediante el algoritmo PAM50.

Además de estas pruebas, que son las más comúnmente distribuidas, existen otras más en el mercado^{28; 29; 30}, en las que el denominador común es la medición de expresión de genes relacionados con proliferación. Es importante mencionar que

estos ensayos de múltiples genes son en su mayoría, si no es que exclusivamente, aplicables a los CM tipo luminal, con esto nuevamente se remarca la necesidad de la búsqueda e identificación de marcadores con valor pronóstico y de respuesta al tratamiento en pacientes con CM con receptores hormonales negativos.

1.3 Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN)

Desde 1997, el National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ha recopilado datos de las mujeres con CM recién diagnosticado, representando a muchas instituciones en todo Estados Unidos. El estado de HER2 por IHQ se añadió a los datos de la NCCN como un elemento de rutina en el año de 1999; y el estado de HER2 mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) se añadió en 2001. El término “Cáncer de Mama Triple Negativo” (CMTN) apareció por primera vez en la literatura en el 2005³¹. Y debido a la carencia de opciones terapéuticas efectivas, muchos estudios se han enfocado al entendimiento de la biología del CMTN para la selección de biomarcadores y blancos terapéuticos.

1.4 Factores de riesgo de CMTN.

El CMTN comprende aproximadamente el 15-20% de todos los CM y sigue un curso clínico agresivo incluyendo una alta incidencia de metástasis viscerales y al sistema nervioso central. Comparado con el CM positivo para receptores hormonales, el CMTN es frecuentemente asociado a mutaciones en BRCA1³² y aunque menos frecuente también asociado a mutaciones en BRCA2³³. El CMTN se ha asociado a un índice alto de recurrencia local durante los tres años después del tratamiento y a un índice alto de muerte a los 5 años. La sobrevida es pobre después de

presentarse metástasis a distancia³⁴. A diferencia de lo que sucede en otros subtipos de CM (Luminal A, B y HER2), donde el embarazo temprano ha sido reconocido como un factor protector contra el CM, la gestación parece ser un factor de riesgo importante para desarrollar el fenotipo triple negativo. En un estudio³⁵ se reportó que las mujeres que tienen un mayor número de hijos (tres o más partos) presentaban mayor riesgo (1,4 veces) de desarrollar CMTN. Más adelante ³⁶ se reafirmó que la multiparidad está asociada con un riesgo incrementado para el desarrollo de CMTN.

Otras asociaciones con el subtipo triple negativo incluyen la falta de lactancia³⁷ y varios trabajos han hecho asociaciones con Índice de Masa Corporal (IMC) alto, presentar síndrome metabólico, diabetes tipo 2, obesidad y/o resistencia a insulina^{38; 39; 40; 41; 42; 43; 44}. Consecuentemente, las pacientes con CMTN son el subgrupo con peor pronóstico, lo cual es importante considerar en países como el nuestro que presenta una elevada prevalencia de obesidad y síndrome metabólico.

Se ha descrito una relación importante del CMTN con la ascendencia racial, ya que éste representa aproximadamente el 21% de todos los CM en población afroamericana y el 15% de todos los CM en las poblaciones de origen anglosajona^{45; 46; 47}. En población hispana se ha descrito también alta incidencia de este tipo de cáncer⁴⁸, con frecuencia de 21,3% en Perú⁴⁹, de 27% en Brasil⁵⁰, 24.1% en Venezuela⁵¹ y 23.1% en México.⁵²

Los CMTN presentan una tasa alta de proliferación⁵³ además de ser altamente agresivos^{33; 54; 55; 56}. En el estudio de Sorlie y colaboradores, en el que se evaluó la respuesta al tratamiento en pacientes con CM tratados de manera uniforme, se reportan diferentes resultados para los pacientes pertenecientes a los grupos de distintos subtipos, entre ellos se reportó que los pacientes con CMTN tenían el peor pronóstico con una diferencia significativa en comparación con los pacientes de los grupos con cáncer positivo a receptores hormonales¹². Más adelante, Dent y colaboradores, compararon las características clínicas, la historia natural de la enfermedad y el desenlace en mujeres con CMTN vs mujeres con otros subtipos; sus resultados revelan que el CMTN predice una peor supervivencia global y metástasis a distancia después del tratamiento⁵⁴. A pesar del curso agresivo del CMTN, este tipo de cáncer puede ser altamente sensible a las drogas citotóxicas; la proporción de pacientes que alcanzan una respuesta patológica completa (RPC) después del tratamiento se encuentran en el rango de 30-45%^{57; 58} y los pacientes que logran una RPC tienen excelentes resultados a largo plazo, con supervivencia global mayor al 90%. Además, si se logra RPC, las pacientes con este u otros subtipo de CM tienen una supervivencia global similar, sin embargo, los pacientes con CMTN que presentan enfermedad residual, tienen peores resultados en comparación con los pacientes con enfermedad residual de otros subtipos de CM^{46; 59}. La agresividad del CMTN y la escasez de opciones terapéuticas específicas subrayan la necesidad de comprender las vías por las que éste tipo de cáncer se desarrolla.

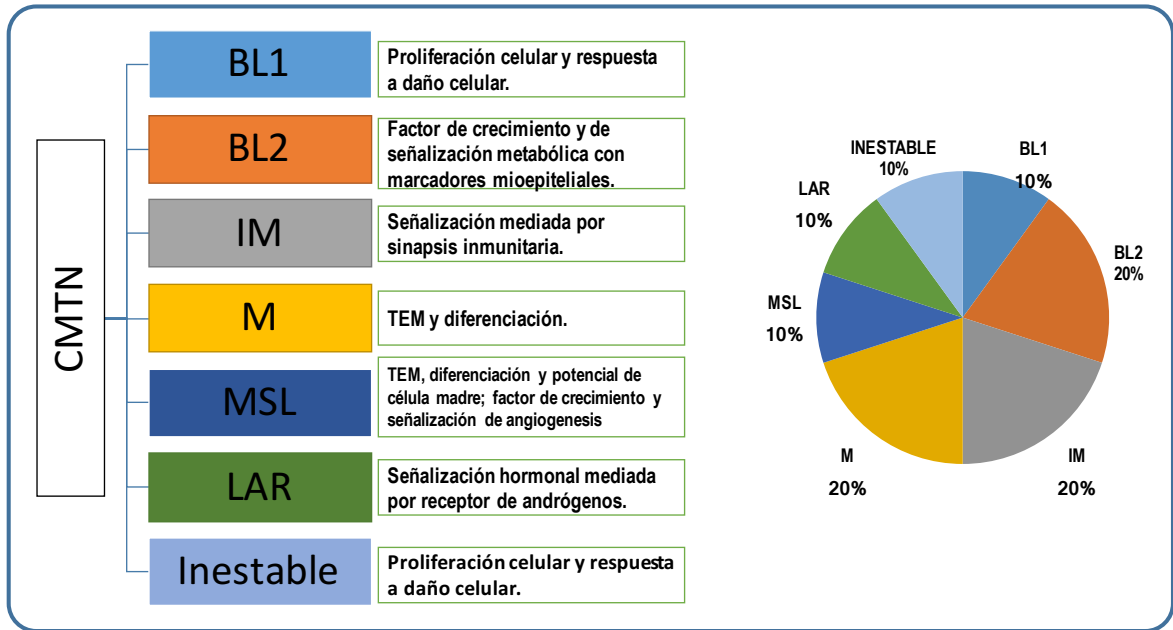
1.5 Clasificación molecular de subtipos de CMTN

En 2007, Kreike y colaboradores reportaron que los CMTN eran sinónimo del cáncer del tipo molecular basal⁶⁰, sin embargo, posteriormente se comprobó que la biología molecular del CMTN es diversa y heterogénea⁶¹ y que el CMTN no es un sustituto ideal del fenotipo basal. En 2011, Lehmann y colaboradores⁶² identificaron 6 subtipos de CMTN y un subtipo inestable. Los 6 subtipos incluyen dos clases del tipo basal (BL1 y BL2), uno inmunomodulador (IM), uno Mesenquimal (M), uno de tipo célula madre mesenquimal (MSL) y finalmente el subtipo luminal receptor de andrógenos (LAR). Además, el análisis de la expresión génica les permitió a los autores identificar a su vez líneas celulares representativas de cada subtipo de CMTN para después evaluar la respuesta de estas líneas a diferentes fármacos.

- a) **BL1:** Este grupo se caracteriza por contener células de rápida división, con índice de proliferación aumentada y pérdida de control de ciclo celular. Debido a esto, presenta elevada expresión (mRNA) de Ki67 y responde a agentes antimitóticos.
- b) **BL2:** Presenta expresión de *EGFR*, *TP63*, *MET*, etc., e involucra activación de rutas de glucólisis y gluconeogénesis
- c) **IM:** Compuesto de células de respuesta del sistema inmune, presentadoras de antígenos y expresión de citocinas. Se sobrelapa con el CM medular de pronóstico favorable.
- d) **M y MSL:** Estos grupos presentan marcadores de transición epitelial mesenquimal incluyendo de angiogénesis (*VEGFR2*) y mostraron ser probablemente respondedores a desatinib (inhibidores de TK) y de mTOR.

e) **LAR:** Este grupo se caracteriza por la expresión del receptor de andrógenos (RA). Es RE negativo, pero mantiene un componente hormonal elevado regulado por síntesis de esteroides, y por genes del metabolismo de porfirinas y andrógenos/estrógenos. La expresión de RA es hasta nueve veces más que los otros grupos y son altamente candidatos para terapia anti andrógenos

Las vías de señalización son potenciales blancos farmacológicos en estos modelos celulares para probar si el análisis de las distintas firmas genómicas puede apoyar la selección de la terapia. En general, se ha reportado que los subtipos BL1 y BL2 responden preferentemente a cisplatino, M y MSL a NVP-BEZ235, un inhibidor de PI3K/mTOR y dasatinib (inhibidor tirosina kinasa), y el subtipo LAR es sensible únicamente a bicalutamida (agonista del receptor de andrógenos). Más adelante, Burstein y colaboradores⁶³ con base a perfiles de expresión (ARN) o de marcadores de un solo nucleótido SNPs (ADN) de 198 muestras de CMTN, confirmaron cuatro de los subtipos reportados por Lehman: un tipo luminal receptor de andrógenos, uno de tipo mesenquimal, y dos de tipo basal. Estos estudios de Burstein y Lehman, sugieren la existencia de al menos cuatro subtipos estables de CMTN. Figura 3.



Fuente: Imagen tomada del artículo “Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity”¹

Figura 3. Clasificación (Lehman) de cáncer de mama triple negativo, ontología génica y proporción.

1.6 Tratamiento de CMTN

A las mujeres con CMTN no se les puede brindar terapias endócrinas y tampoco terapias dirigidas a HER2, por lo que las opciones de tratamiento se limitan a la cirugía, radioterapia y la quimioterapia^{64; 65}, siendo la quimioterapia el tratamiento estándar del CMTN. En las últimas décadas, el uso de quimioterapia más agresiva ha producido una clara mejora en la calidad de vida, sin embargo, se considera que será imposible mejorar estos resultados si se continúa ofreciendo únicamente terapia citotóxica a estas pacientes. En vista de esto, existe una necesidad por encontrar nuevas “drogas inteligentes” capaces de resolver la quimiorresistencia y reducir los riesgos de la quimioterapia en los pacientes que sí responden.

1.7 Búsqueda de biomarcadores en CMTN

El mayor obstáculo para encontrar blancos accionables es la vasta heterogeneidad tanto inter como intratumoral del CMTN. De hecho, varios años de estudio han fallado en mostrar alguna alteración unificada que puede servir como blanco de una terapia dirigida. Se han llevado a cabo diversos estudios en los que se analiza la expresión génica en CMTN con la finalidad de identificar blancos terapéuticos. Lo que podemos resaltar de estas investigaciones es la variabilidad de los datos obtenidos en cada estudio, lo que nos indica que la validación de estos posibles blancos moleculares es necesaria y que aún se requieren más estudios para encontrar biomarcadores eficaces para el tratamiento de CMTN. En el Anexo I se incluye una tabla con las características de cada estudio y los principales genes diferencialmente expresados.

Se ha utilizado además de los microarreglos de expresión genómica, la secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) para la búsqueda de marcadores, pues es una herramienta de gran utilidad en enfermedades de origen multigénico como el cáncer, en donde la acumulación de una serie de mutaciones en varios genes es la clave para el desarrollo tumoral. Se ha reportado que existe una diferencia en el patrón de mutaciones entre los subtipos intrínsecos del cáncer de mama^{66;67}.

De todas estas diversas investigaciones sobre CMTN se ha observado que este fenotipo involucra diferentes vías de señalización afectadas, incluyendo procesos celulares, inmunológicos y metabólicos como: expresión diferencial de queratinas

basales, rutas de proliferación y de regulación del interferón, expresión baja en claudina, transición epitelial mesenquimal, expresión del receptor de andrógenos (RA) y activación de angiogénesis (VEGF)^{60; 61; 62}. Estos hallazgos han revelado potenciales blancos moleculares⁴⁹, y diferentes tipos de drogas se encuentran actualmente bajo investigación, las cuales básicamente se pueden definir en cuatro grupos: (1) Agentes que generan daños en el ADN (por ejemplo, cisplatino, ciclofosfamida); (2) agentes que inhiben la poli (ADP-ribosa) polimerasa (inhibidores de PARP); (3) inhibidores de la tirosina quinasa y (4) agentes que inhiben señales río abajo de vías de señalización (PI3K/AKT principalmente)⁶⁸. En la tabla 1 se describen algunos de blancos terapéuticos y los tratamientos que se han probado en CMTN.

Tabla 1. Potenciales blancos terapéuticos de CMTN.

Blanco terapéutico	Tratamiento	Mecanismo de acción
VEGF	Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal anti VEGF, bloquea el crecimiento de la neovasculatura del tumor (angiogénesis), pero se ha observado falta de eficacia y un incremento de la toxicidad ⁶⁹ .
PARP	Olaparib Iniparib Veliparib	Inhibidores de PARP en pacientes con mutaciones en BRCA1/2, también han sido ampliamente estudiados debido a que han mostrado tener actividad selectiva en cánceres deficientes de BRCA1 y BRCA2, sin embargo, no se ha podido confirmar la relevancia de la inhibición de estas enzimas ⁷⁰ .
EGFR	Cetuximab Aftatinib	Anticuerpos monoclonales dirigidos a EGFR. Han sido evaluados como monoterapia o acompañando a la terapia basada en platino (carboplatino). Aunque en un principio esta terapia se veía muy prometedora ha mostrado resultados muy modestos ⁷¹ .
PI3K/mTOR	Everolimus Taselisib	mTOR es un efector de la vía de señalización de PI3K regulada por AKT y el supresor de tumores PTEN. Las proteínas que pertenecen a la vía de PI3K

	Everolimus	frecuentemente se encuentran afectadas por mutaciones en los carcinomas de mama, y la pérdida de PTEN es un descubrimiento frecuente en CMTN, lo que incrementa la activación de mTOR en la enfermedad ⁷¹ . Es por esto que actualmente se encuentran en evaluación drogas inhibidores de mTOR ⁷² .
Receptor de andrógenos	Bicalutamida Enzalutamida	Algunos estudios preclínicos mostraron que el CMTN luminal que expresa el receptor de andrógenos (LAR) es sensible a la privación de andrógenos. Bicalutamida como monoterapia mostró tener un beneficio clínico en el 19% de las AR positivos ⁷² . Actualmente un estudio de Fase II está evaluando la seguridad y eficacia de Enzalutamida en pacientes con CMTN y AR positivos. Falta esperar por estos resultados.
P53	PRMIA-1 APR-246	Activadores de p53; rescatan la función de p53 en células deficientes en p53.

En resumen, las terapias dirigidas contra los blancos identificados en CMTN no han mostrado una mejoría significativa, el problema puede radicar en la falta de biomarcadores predictivos fiables, lo que remarca la importancia del desarrollo de investigaciones que reduzcan al mínimo la heterogeneidad entre muestras analizadas en CMTN.

1.8 Linfocitos infiltrantes de tumor

Estudios recientes sugieren que el microambiente tumoral es crítico para la supervivencia, el crecimiento invasivo y la metástasis del cáncer⁷³. Los componentes celulares del microambiente tumoral incluyen fibroblastos, células vasculares, leucocitos infiltrantes y células especializadas de soporte mesenquimal únicas para cada microambiente tisular. Evidencia reciente ha implicado a los leucocitos infiltrantes de tumores como actores en el desarrollo del cáncer. El

sistema inmune del huésped responde para combatir el cáncer; el tejido mamario normal no contiene agregados de células inmunes, pero los tumores de mama y el estroma muestran niveles más altos de infiltrados de células inmunes⁷⁴.

Se ha demostrado que la presencia de una inmunidad antitumoral del hospedador influye en la respuesta a los tratamientos citotóxicos. Denkert et al. demostraron que una alta infiltración tumoral por los linfocitos en el momento del diagnóstico se asocia con una mayor probabilidad de respuesta patológica completa después de la quimioterapia neoadyuvante ⁷⁵. Mientras que las células B parecen representar el linfocito predominante durante la progresión temprana del cáncer de mama ⁷⁶, los linfocitos T infiltrantes (tanto CD4 + como CD8 +) son más extensos en carcinomas de grado superior y carcinomas invasivos⁷⁷. En tumores de proliferación rápida, la presencia de linfocitos T por determinación histopatológica en los sitios tumorales es un buen indicador pronóstico cuando se compara con tumores no inmunogénicos y se correlaciona con negatividad de ganglios linfáticos auxiliares, un diámetro tumoral más pequeño, un grado histológico inferior, ausencia de recurrencia y mayor supervivencia⁷⁸. La composición exacta de la infiltración de linfocitos T varía mucho, sin embargo, puede afectar profundamente la progresión de la enfermedad y la supervivencia general del paciente.

Aunque no está claro si la presencia de linfocitos CD8 + por sí sola proporciona información pronóstica, la presencia de porcentajes elevados de células T cooperadoras CD4 + en sitios tumorales primarios se correlaciona positivamente con la progresión de la enfermedad, incluida la diseminación metastásica hacia los

ganglios linfáticos centinela y el aumento del tamaño del tumor primario^{79; 80; 81}. Este equilibrio entre una respuesta citotóxica protectora y una respuesta humoral puede regularse sistémicamente por el estado inmune general del individuo, así como localmente por las células supresoras mieloides y las células T reguladoras, por lo tanto ofrece blancos terapéuticos atractivos para la base inmunitaria contra el cáncer.

1.8.1 Linfocitos infiltrantes de tumor en cáncer de mama triple negativo

El papel pronóstico de los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés) en CM se ha evaluado en el contexto de ensayos aleatorizados con adyuvantes, donde se ha observado que TIL al inicio del estudio se asocian con tumores altamente proliferativos, de alto grado con RE negativos y representan un fuerte factor pronóstico para ciertos subtipos de cáncer de mama, principalmente para el cáncer de mama triple negativo ^{82; 83; 84}. El porcentaje medio de tejido estromal infiltrado con linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en CMTN es del 20% en TNBC ⁸². Recientemente se reportó que a pesar de la heterogeneidad de tipo de células inmunes que componen a los tumores de CMTN, las TIL promedio en una sección teñida con hematoxilina y eosina representan con fiabilidad las TIL de tumor completo además de asociarse con el resultado y con el valor pronóstico en el tumor.⁸⁵

II. Antecedentes del grupo de Investigación.

Tomando en cuenta algunas de las limitaciones más comunes en el análisis de las muestras de CMTN, nuestro grupo de investigación realizó un estudio prospectivo que incluyó una muestra homogénea de un total de 50 mujeres con cáncer de mama con una media de edad de 49 años (26-71) y un IMC de 28.7 (20.7-40.1). De estas 50 pacientes, 26 tenían un diagnóstico de CMTN y 24 de CMnTN. Se determinaron mediante la tecnología de microarreglos de expresión, los perfiles de expresión de los tejidos al momento del diagnóstico. Lo que se encontró fue una firma genómica de CMTN compuesta por 40 genes, 9 de ellos sobre expresados (*FOXC1*, *PRKX/PRKY*, *UGT8*, *BCL11A*, *HMGA1*, *LPIN1*, *FAM171A1*, *HAPLN3*, y *ANKRD11*) y 31 sub expresados en CMTN. *HMGA1* y *LPIN1* son genes relacionados con metabolismo de la insulina y *UGT8* relacionado con metabolismo de esfingolipidos. Estos genes resultan interesantes en nuestra población la cual está compuesta principalmente por pacientes con IMC y niveles de glucosa elevados. *FOXC1* y *BCL11A* son factores de transcripción, el primero ha sido propuesto como biomarcador de metástasis y mal pronóstico y el segundo promueve la formación del tumor en CMTN.

Todas las pacientes con CMTN recibieron NAT después del diagnóstico de biopsia con aguja gruesa con Antraciclinas + Taxol y esquemas de Carboplatino + Taxol. A estas pacientes se les dio un seguimiento y se evaluó si eran respondedores o no a la quimioterapia y se analizó el perfil de expresión de las que sí respondieron y no respondieron a la quimioterapia, encontrando que las mujeres que respondían a la quimioterapia presentaban una firma de expresión génica característica, siendo que

las muestras de mujeres que respondieron a la quimioterapia presentaban expresión diferencial de los siguientes genes: *LRRC7A3*, *IL1RL*, *NOS1*, *ZNF618*, *RFX2*, *C17orf37*, *SRD5A3* y *GALNT7*. *IL1RL* por ejemplo, es un mediador importante involucrado en muchas respuestas inmunes e inflamatorias inducidas por citosinas modificando la respuesta de células T mediante la inhibición de la señalización de IL33.⁸⁶ *NOS1*, codifica una proteína que pertenece a la familia de las sintasas de óxido nítrico, que sintetizan óxido nítrico a partir de L-arginina, lo que es importante ya que las moléculas redox, como NO y ROS son mediadores clave de la inmunidad; el NO activa vías de transducción de señales específicas en células tumorales, células endoteliales y monocitos de una manera dependiente de la concentración. El balance NO / ROS es importante durante la transición de linfocitos T.⁸⁷ *RFX2* es un gen miembro de la familia de genes reguladores del factor X, que codifica factores de transcripción que contienen un dominio de unión a ADN helicoidal alado altamente conservado que se pueden unir a elementos en el promotor del gen del receptor IL-5, la cual es una interleucina producida por los Linfocitos T, y su función es estimular el crecimiento de las células B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Aunque no se sabe exactamente el papel de *LRRC7A3*, *ZNF618*, *C17orf37*, *SRD5A3* y *GALNT7* en la inmunidad, se sabe que son genes que se expresan en células de la respuesta inmune. En resumen, nuestro grupo de investigación ha encontrado dos firmas de genes que integran 2 componentes esenciales: un componente metabólico y un componente inmunológico.

III. JUSTIFICACIÓN

El CMTN es a menudo el tipo de cáncer más agresivo y está asociado con la más alta tasa de mortalidad en comparación con los otros tipos de CM. Numerosos avances se han hecho en el entendimiento de este cáncer.

En México, existen pocos trabajos de investigación que reporten el análisis de genes relacionados a CMTN, lo que resulta preocupante, pues este subtipo de CM compromete a un número considerable de casos en la población mexicana. Dado que parte de la terapia de CM está dirigida hacia los receptores, para este subtipo de CM no existe terapia específica.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han reportado una firma que está relacionada al CMTN, por lo que consideramos importante continuar con la búsqueda de genes conductores y otros factores con potencial valor pronóstico y de respuesta a tratamiento.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar biopsias de CMTN para identificar factores asociados a este subtipo de cáncer de mama.

4.1 Objetivos específicos

1. Evaluar por secuenciación un panel de genes relacionados con cáncer en un grupo de biopsias de CMTN.
2. Evaluar la expresión diferencial de una firma de genes en CMTN comparada con CMnTN.
3. Analizar cuantitativamente linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en las biopsias de pacientes con CMTN y la respuesta patológica.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Consumibles

Material requerido para la extracción de ácidos nucleicos: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de eppendorf (Hamburgo, Alemania), hojas de bisturí de Hergom (México, D.F), cajas Petri de SyM laboratorios (Puebla, Puebla), puntillas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L, tubos de 15 mL y criotubos de 2 mL de Corning (Corning, N.Y.) y perlas de acero de 5 mm (Satinless Steel Beads 5mm) de Qiagen (Maryland, USA).

Material requerido para secuenciación: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de eppendorf (Hamburgo, Alemania), puntillas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L, de Corning (Corning, N.Y.).

Material requerido para PCR tiempo real: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de eppendorf (Hamburgo, Alemania), puntillas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L, de Corning (Corning, N.Y.) y placas y films para termociclador LightCycler 480 II de Roche (California, USA).

5.1.2 Reactivos

Reactivos requeridos para la extracción de ácidos nucleicos: Rneasy mini kit de Qiagen (Maryland, USA), Dneasy Blood and Tissue kit DE Qiagen (Maryland, USA).

Reactivos requeridos para secuenciación: TruSeq Amplicon-Cancer Panel de Illumina (California, USA).

Reactivos requeridos para análisis de tiempo real: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Sondas TaqMan (GAPDH, GRAMD1A, ANKRD11, LPIN1, UGT8, BCL11A y FOXC1) y TaqMan universal Master Mix de Life Technologies (CA, USA) y agua grado molecular (Maryland, USA).

5.1.3 Material Biológico

Tejido fresco de mama (biopsia) y ácidos nucleicos (DNA genómico y RNA total y DNA complementario).

5.1.4 Equipo

Equipo utilizado para la toma de muestras: Centrífuga para tubos de 2mL y 15 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), vortex de Scientific industries (N.Y, USA).

Equipo utilizado para la extracción de ácidos nucleicos: Thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), TissueLyser de Qiagen (Maryland, USA), Qubit fluorometer de Life Technologies (CA, USA), vortex de Scientific industries (N.Y, USA) y Nanodrop de Thermo Scientific (Delaware, USA).

Equipo utilizado para PCR tiempo real: Termociclador LightCycler 480 II de Roche (CA, USA), campana de PCR de UVP (CA, USA), vortex de Scientific industries (N.Y, USA) y centrifuga minispin de Labnet (NJ, USA).

Equipo utilizado para secuenciación: MiSeq Illumina (CA, USA), termocicador Eppendorf (Hamburgo, Alemania), vortex de Scientific industries (N.Y, USA).

5.2 Lugar donde se realizó el estudio.

Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la misma Universidad.

5.3 Diseño del estudio.

Se trató de un estudio observacional de serie de casos.

5.4 Población de estudio

Características de la población:

Se seleccionaron muestras de un banco de muestras de biopsias frescas de mama. Las muestras procedieron de pacientes con adenocarcinoma ductal invasor de glándula mamaria, que con base a criterios clínicos e histopatológicos realizados por médicos oncólogos y patólogos del Hospital Universitario fueron clasificados en grupos de CMTN y CMnTN.

Criterios de inclusión: a) Sexo femenino, b) mayor de 18 años, c) registro a la respuesta del tratamiento neoadyuvante de Adriamicina y Cliclofosfamida y d) consentimiento informado firmado. Criterios de no inclusión: a) Historia o presencia de otra neoplasia, b) sin consentimiento informado y c) que tenga tratamiento

diferente. Criterios de eliminación: a) Información incompleta, b) material escaso de muestras para el análisis y/o c) muestras degradadas.

5.5 Descripción del diseño.

1. Se identificaron las muestras que cumplían con los criterios de inclusión para este estudio: 51 biopsias de tejido fresco, de las cuales 26 biopsias correspondían a tumores de CMTN y 25 correspondieron a biopsias de CMnTN. Se seleccionaron también 26 tejidos embebidos en parafina de tumores de CMTN.

2. A partir de las muestras de tejido fresco se llevaron a cabo extracciones de RNA y DNA. A las muestras de ADN se les determinó la relación 260/280, seleccionando aquellas que tuvieran índice entre 1.8-2. A todas las muestras de RNA se les determinó el índice RQI, procurando seleccionar las que tuvieran índices >8. Las muestras fueron almacenadas en un bio-banco de ácidos nucleicos.

3. Con el ADN proveniente del tumor se realizó la búsqueda de mutaciones usando un panel de genes relacionados con cáncer, mediante secuenciación de nueva generación.

4. Con el ARN del tejido se analizó la expresión de un conjunto de genes candidatos asociados a CMTN mediante PCR en tiempo real.

5. Se cuantificaron los TIL de las muestras de tejido embebido en parafina y se determinó su asociación con la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

5.6 Metodología experimental

5.6.1 Extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos.

Extracción y purificación ADN total de tejidos crio-preservados por columna

de afinidad. Se cortaron 30 mg de tejido en trozos pequeños, y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se agregaron 180 µl Buffer ATL. Posteriormente se añadieron 20 µl de proteinasa K. Se mezcló en vórtex para después incubarlo a 56 °C hasta que el tejido quedó completamente disgregado. Se agregaron 200 µl de Buffer AL a la muestra, y se mezcló bien con vórtex. A continuación, se agregó 200 µl de etanol (96-100%) y se volvió a mezclar completamente agitando en vórtex. Se agregó la mezcla en la columna DNeasy Mini spin y se colocó en un tubo de recolección de 2 ml. Se centrifugó a 6000 xg durante 1 minuto. Se desechó el tubo de recolección. Se colocó la columna DNeasy Mini spin en un nuevo tubo de recolección de 2 mL y se agregaron 500 µl de tampón AW1 y se centrifugó durante 1 minuto a 6000 xg (8000 rpm). Se colocó la columna DNeasy Mini spin en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, se agregaron 500 µl de tampón AW2 y se centrifugó durante 3 minutos a 20,000 xg (14,000 rpm) para secar la membrana DNeasy. Se desechó el tubo de recolección. Se colocó la columna DNeasy Mini spin en un tubo de microcentrífuga limpio de 2 ml y se agregaron 200 µl de tampón AE directamente sobre la membrana DNeasy. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, y luego se centrifugó durante 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm) para eluir.

Extracción y purificación de ARN total de tejido animal.

Se tomaron 30 mg del tejido. Se agregaron 20 ml del buffer RLT. Se realizó la homogenización usando TissueLyser LT. Se centrifugó el lisado durante 3 minutos a velocidad máxima. Se retiró el sobrenadante y se transfirió a un nuevo microtubo. Se agregó 1 volumen de etanol al 70% al lisado clarificado, y se mezcló inmediatamente pipeteando. Se

transfirieron 700 μ l de la muestra, a una columna y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 xg. Se agregaron 700 μ l Buffer RW1 a la columna giratoria Rneasy y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 xg. Se agregaron 2 veces, 500 μ l de buffer RPE a la columna giratoria Rneasy y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 x g ($\geq 10,000$ rpm). Se colocó la columna giratoria RNeasy en un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml y se eluyó con 30 μ l de agua libre de Rnasa, centrifugando durante 1 minuto a ≥ 8000 xg.

5.6.2 Detección de mutaciones del panel de genes de cáncer en tumores triple negativo por secuenciación.

La NGS fue realizada a partir de 10 ng de DNA; las bibliotecas fueron construidas utilizando el TruSeq Amplicon Cancer Panel. Brevemente, el ADN fue mezclado con el pool de oligonucleótidos que contienen todos los primers para generar 212 amplicones de regiones hotspot con un tamaño >35 kilobases de 48 genes. Las bibliotecas se amplificaron en el termociclador Eppendorf EP Master Faster City (California, USA). Se evaluó la calidad de la biblioteca en Agilent 2100 Bioanalyzer (California, USA). Cada biblioteca se normalizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y finalmente se trabajó con bibliotecas a concentración de 12 ρ M. Los pool de bibliotecas fueron cargados en un cartucho MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina Inc, San Diego, California) y cada pool de librerías fue secuenciado en un instrumento Illumina MiSeq usando un diseño 150 paired-end. Se empleó como genoma de referencia el constructo Human genome build 19 (hg19). El alineamiento

y el variant calling fueron realizados con el Miseq Reporter Software (Illumina Inc, San Diego, California). Las variantes fueron identificadas mediante VariantStudio 2.2 (Illumina). Se utilizó una calidad de lectura $Q > 90$ y profundidad de lectura > 60 . Se determinó la significancia clínica de las variantes empleando la herramienta ClinVar. Además, se usó la herramienta Polymorfism Phenotyping v2 (Polyphen-2) la cual predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la función de la proteína.

5.6.3 PCR tiempo real de ANKRD11, FOXC1, LPIN1, UGT8 y BCL11A.

Se analizaron muestras de mujeres con CMTN y CMnTN mediante PCR tiempo real con sondas TaqMan. Para realizar este ensayo, se utilizó el RNA total extraído a partir de tejido de biopsia. Se realizó una reacción de retrotranscripción con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription y a partir del cDNA se realizaron las amplificaciones para cuantificación mediante sondas TaqMan para cada gen. Todas las amplificaciones se hicieron en el LightCycler 480 II de Roche, se emplearon como genes reporteros *GAPDH* y *GRAMD1A*.

5.6.4 Evaluación de linfocitos infiltrantes de tumor

Se obtuvieron los TIL de 26 biopsias de CMTN siguiendo las recomendaciones del International TILs Working Group 2014. Se tomaron secciones de tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina (4 μm de espesor) en portaobjetos de vidrio recubiertos antes de la terapia con terapia neoadyuvante (NAT). Dichas secciones de tejido se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. El componente estromal de los TIL se evaluó dentro de los límites del carcinoma invasivo en un aumento de

200-400 (ocular 10X). Las siguientes áreas de las secciones de tejido se excluyeron para el estudio: bordes tumorales, áreas alrededor de carcinoma in situ, lóbulos mamarios normales y áreas del tumor que exhiben artefactos, necrosis o hialinización. Los porcentajes obtenidos se dividieron en tres grupos: 1-19% = TIL baja, 20-49% = TIL intermedia y $\geq 50\%$ = TIL12 alta.

Para la inmunohistoquímica se emplearon anticuerpos primarios contra CD3+, CD4+, CD8+, RE, RP y HER-2/neu usando el sistema de detección de polímeros Novolink min (Novacastra, Leica Biosystem Newcastle Ltd, Reino Unido). Secciones de tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina (4 μm de espesor) se tomaron en portaobjetos de vidrio recubiertos de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS). Las secciones se desparafinaron en xileno seguido de hidratación en etanol graduado. La recuperación del antígeno se realizó calentando las muestras a 100 °C durante 20 minutos en tampón de citrato de 0,01 M (pH 6.0) usando un sistema EZ de recuperación de antígenos (biogenex, EE. UU.). La peroxidasa endógena se bloqueó mediante secciones de incubación con peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 5 minutos y los sitios de unión no específicos se bloquearon con un bloque de proteína durante 5 minutos. Las secciones se cubrieron con anticuerpo primario y los portaobjetos se incubaron en una cámara húmeda durante la noche a 4 °C. Los portaobjetos se lavaron a continuación con solución salina tamponada con Tris (TbS, pH 7.4), seguido de una incubación de 30 min con bloqueo posterior primario a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron dos veces en TbS seguido de incubación con polímero Novolink durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados en TbS, las secciones se trataron con cromógeno DAb

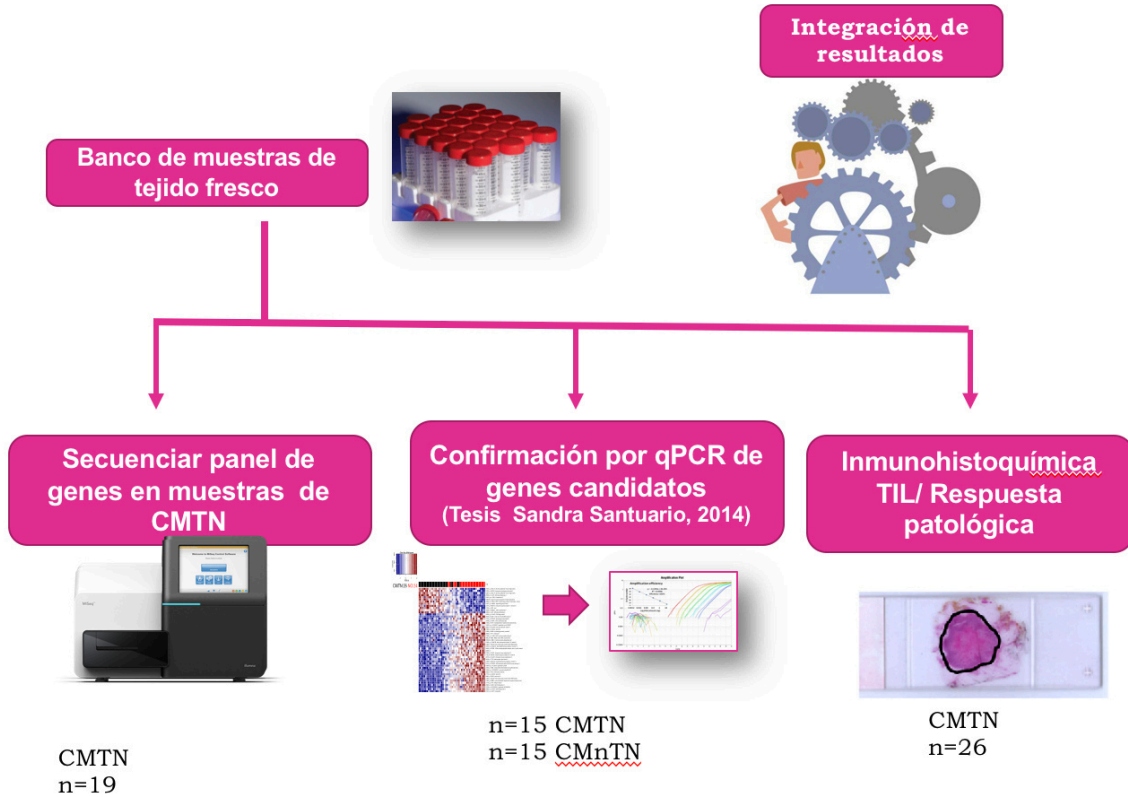
(3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloruro) durante 5-10 minutos en la oscuridad. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron con etanol y xileno, y se montaron de forma permanente con di-n-butil-ftalato en xileno (DPX). Se incluyeron controles positivos para CD3 +, CD4 +, CD8 +.

La evaluación microscópica de TIL CD3 +, CD4 + y CD8 + fue realizada por un patólogo. Se contaron las células CD3+, CD4+ y CD8+ en cinco campos seleccionados al azar con 40 aumentos y los recuentos se promediaron. El recuento de TIL se registró como: + (1-25 células), ++ (26-50 células), +++ (≥ 51 células) en el estroma. Los TIL positivos de hasta 25 células se consideraron como bajo recuento de TIL y más de 25 células (es decir, ++, +++) se consideraron como un recuento alto de TIL.

5.7 Análisis estadístico

En el caso de PCR en tiempo real, se realizó la prueba T-student. Se mantuvo el nivel global de todas las comparaciones en 0.05. Se realizaron análisis de estimación de $2^{-\Delta CT}$ de las muestras examinadas para analizar estadísticamente la diferencia de expresión de los genes analizados en las muestras de CMTN y CMnTN.

5.8 Esquema general del estudio



A partir de un banco de muestras de tejido de biopsias de CMTN y CMnTN se realizó 1) la secuenciación de un panel de genes relacionados a cáncer en 19 muestras CMTN; 2) la medición de la expresión de genes, propuestos por el grupo de investigación, en 15 biopsias de CMTN y 15 biopsias de CMnTN y 3) el análisis cuantitativo de linfocitos infiltrantes de tumor en 26 biopsias de pacientes con CMTN y la evaluación de la respuesta patológica.

Figura 4. Esquema general del diseño de estudio.

VI. RESULTADOS

6.1 Caracterización molecular mediante secuenciación de CMTN.

Fueron seleccionadas 19 biopsias de tejido fresco congelado clasificadas como CMTN. El promedio de edad de las mujeres fue de 51 años, un IMC promedio de 27.5. Todas las participantes estuvieron libres de metástasis al momento de participar en el estudio. En la tabla 2, se muestran las características clínicas de las mujeres con CMTN de las que se tomó biopsia para realizar la secuenciación. La clasificación TNM coloca a las 19 muestras en T2 a T4 con estadios clínicos avanzados (II y III).

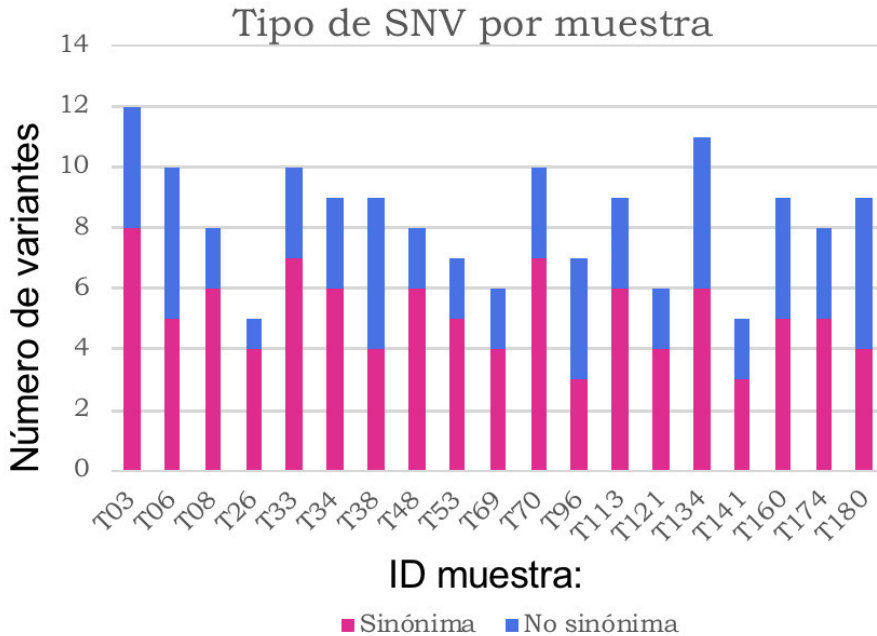
Tabla 2. Características clínicas de las mujeres con CMTN que participaron en el estudio de secuenciación.

	N=19	RANGO/%	DS
EDAD AL DIAGNÓSTICO (AÑOS)	52	41 a 71	8.63
IMC (ÍNDICE DE MASA CORPORAL, KG/M²)	27.31	20.78 a 37.01	4.27
IMC>25	12	63%	
ESTADO DE MENOPAUSIA (PRE-MENOPAUSIA)	10	53%	
DIABETES MELLITUS (POSITIVAS)	3	16%	
NIVELES DE GLUCOSA (MG/DL)	101.8	91 a 116	7.69
NÚMERO DE HIJOS			
NULIPARA	0	0%	
1 A 2	6	32%	
>3	13	68%	
LACTANCIA	8	42%	
TNM			
T1	0	0%	

T2	9	47%	
T3	6	32%	
T4	3	16%	
N0	0	0%	
N1	13	68%	
N2	4	21%	
N3	2	11%	
M0	0	0%	
ESTADIO CLINICO			
I	0	0%	
II	11	58%	
III	8	42%	

T, tamaño del tumor primario; N, estado de nódulos; TNM, tumor-nodo-metástasis; IMC (índice de masa corporal, Kg / m²).

Nosotros encontramos 65 variantes en 25 de los 40 genes analizados en el total de las muestras, de las cuales 32 (49%) se encuentran en regiones exónicas. Todas las muestras presentaron un rango de entre 18 y 26 variantes. El mayor número de variantes se encontraron en las regiones intrónicas (10 a 14 por muestra). En cuanto al tipo de variante, se identificaron en promedio 5 variantes sinónimas y de 1 a 6 variantes con cambio de sentido por muestra. Figura 5.



En el eje de las X se muestra el ID de cada muestra y en el eje de las Y se grafica el número de variantes sinónimas y no sinónimas (variantes de cambio de sentido, codón de terminación, corrimiento de marco de lectura). Las variantes fueron identificadas mediante VariantStudio 2.2 (Illumina). Se utilizó una calidad de lectura $Q > 90$ y profundidad de lectura > 60 .

Figura 5. Gráfica de tipo de variantes de cada muestra analizada.

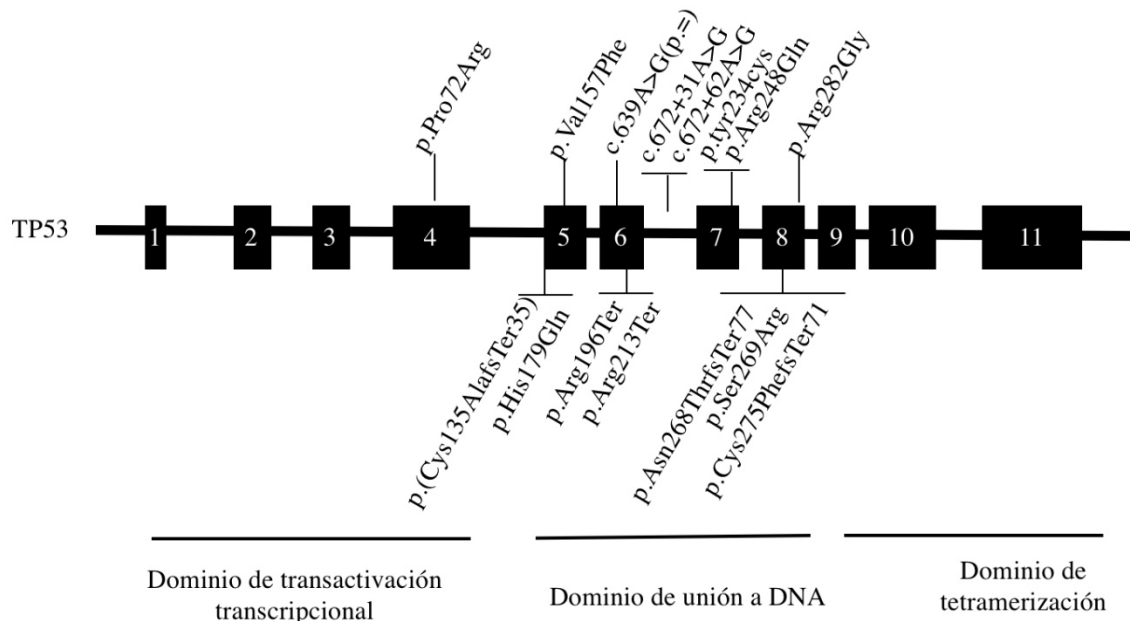
Los genes que además de las variantes intrónicas, presentaron variantes de cambio de sentido, codón de terminación o variantes en la región de corte y empalme, fueron *TP53*, *PIK3CA* y *FLT3*. El gen con mayor número de variantes fue *TP53* con 15 variantes, el 46% (7/15) son variantes de cambio de sentido. *PIK3CA* presentó 4 variantes, de las cuales el 50% (2/4) son del tipo cambio de sentido. El gen con menor número de variantes fue *FLT3*, que presentó una variante en la región de corte y empalme entre el exón 14 y 15. Tabla 3.

Tabla 3. Genes con variantes de cambio de sentido, codón de terminación o variantes en la región de corte y empalme.

Gen (Núm. de Variantes)	Variante	Muestras afectadas	Exon	HGVSc/HGVSp	Consecuencia	dbSNP	ClinVar
TP53 (15)	T>C	19	--	c.672+62A>G	Variante intrónica	rs1625895	Benigna
	G>C	18	004/11	p.Pro72Arg	Cambio de sentido	rs1042522	Respuesta a fármacos
	T>C	1	--	c.672+31A>G	Variante intrónica	rs34949160	Benigna
	T>C	1	006/11	c.639A>G(p.=)	Sinónima	rs1800372	Benigna
	G>C	1	008/11	p.Arg282Gly	Cambio de sentido	rs28934574	Patogénica
	T>C	1	007/11	p.tyr234cys	Cambio de sentido	rs5877580	**
	C>A	1	005/11	p.Val157Phe	Cambio de sentido	rs121912654	**
	C>T	1	007/11	p.Arg248Gln	Cambio de sentido	rs11540652	**
	A>ACG	1	008/11	p.Cys275PhefsTer71	Corrimiento de marco de lectura	*	**
	G>A	1	006/11	p.Arg213Ter	Codón de terminación	*	**
	A>C	1	005/11	p.His179Gln	Cambio de sentido	*	**
	G>A	1	006/11	p.Arg196Ter	Codón de terminación	*	**
	G>C	1	008/11	p.Ser269Arg	Cambio de sentido	*	**
	GT>G	1	008/11	p.Asn268ThrfsTer77	Corrimiento de marco de lectura	*	**
CA>C	1	005/11	p.Gys135AlafsTer35	Corrimiento de marco de lectura	*	**	
FLT3 (1)	A>G	16	--	--	Región de corte y empalme	rs2491231	**

PIK3CA (4)	A>G	1	--	c.1252-27A>G	Variante intrónica	*	**
	G>C	1	21/21	p.Glu1012Gln	Cambio de sentido	*	**
	A>G	1	21/21	p.His1047Arg	Cambio de sentido	rs121913279	Patogénica
	C>A	15	--	c.1059+62C>A	Variante intrónica	rs2699895	**

Al comparar las variantes encontradas en cada muestra observamos la variante exónica rs1042522 localizada en el gen *TP53* en el 94% de las biopsias de TNBC (18/19), la cual está relacionada a respuesta a fármacos. Además, encontramos las variantes rs1625895, rs34949160, rs1800372, rs5877580, rs121912654, rs28934574 y rs11540652 de *TP53*. Las primeras tres variantes, ubicadas en el intrón 6 del gen, se clasifican como benignas según la base de datos de ClinVar. Las variantes rs5877580, rs121912654 y rs11540652 son probablemente variantes perjudiciales basadas en PolyPhen-2 con una puntuación de 0.993, 0.998 y 0.992 respectivamente, mientras que rs28934574 es una variante con puntuación posiblemente perjudicial (0.583). Encontramos 7 variantes exónicas no reportadas de *TP53*. Cinco de estas variantes son del tipo SNV: p.Arg213Ter, p.His179Gln, p.Arg196Ter y p.Ser269Arg. 3 variantes corresponden a la inserción o eliminación de un nucleótido: p.Asn268ThrfsTer77, p.Gys135AlafsTer35 y p.Cys275PhefsTer71. Todas estas variantes afectan a los exones *TP53* que transcriben parte del dominio de unión al ADN. Las variantes encontradas se representan en la Figura 6.



Estructura del gen *TP53* y distribución de dominios de la proteína. Exones 1-4 corresponden al dominio de activación transcripcional. Exones 5-8 corresponden al dominio de unión al DNA. Exones 9 a 11 corresponden al dominio de tetramerización. Se encuentran por abajo del mapa del gen, las variantes no reportadas que encontramos.

FIGURA 6. Estructura del gen *TP53* y distribución de variantes.

La variante rs2491231 del gen *FLT3*, que no se había informado anteriormente para CMTN, se encontró en el 84% (16/19) de las muestras. Esta variante se encuentra en la región de empalme y se considera una variante de respuesta a los fármacos. Finalmente, encontramos 4 variantes en *PIK3CA*, de las cuales 2 no están reportadas: c.1252-27A>G y p.Glu1012Gln, la primera se localiza en una región intrónica y la segunda localizada en el exón 21 en la posición 1012 de la proteína, como consecuencia hay un cambio de ácido glutámico por glutamina.

Dos de las cuatro variantes encontradas en *PIK3CA* son de cambio de sentido; la variante exónica rs121913279 del gen *PIK3CA* se detectó en una muestra, que se ha clasificado en ClinVar como patogénica/probable patogénica y la variante no reportada exónica p.Glu1012Gln de la que aún no se ha informado su consecuencia.

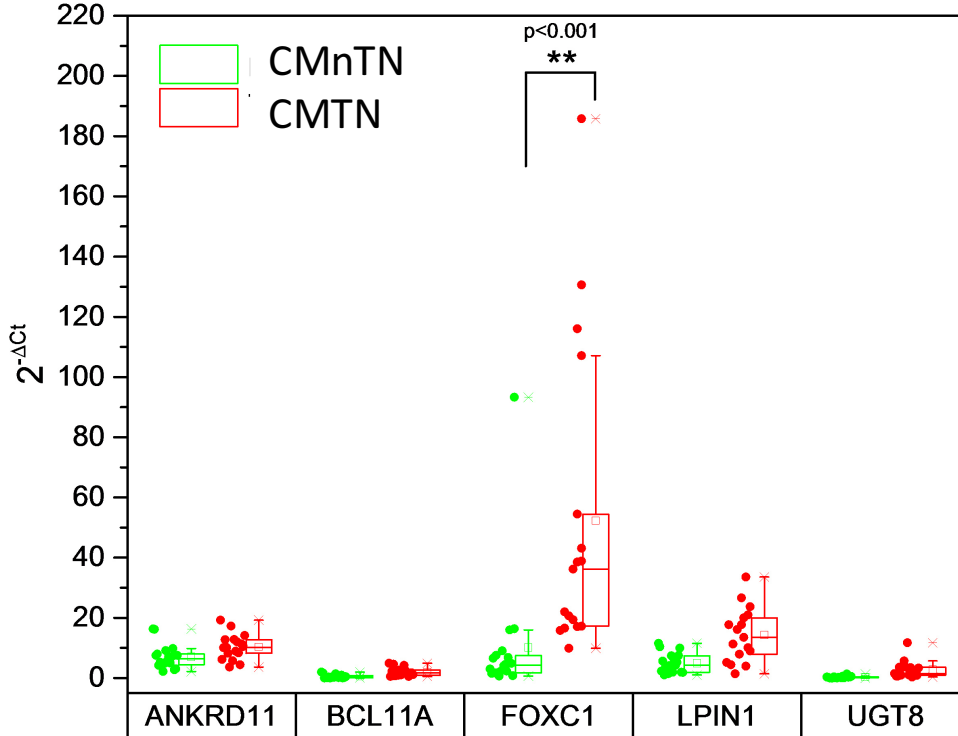
6.2 Expresión de *BCL11A*, *FOXC1*, *ANKRD11*, *LPIN1* y *UGT8* en tumores de CMTN mediante qPCR.

Fueron seleccionadas 15 biopsias de tejido fresco congelado clasificadas como CMTN y 15 biopsias de tejido fresco congelado clasificadas como CMnTN. Las características clínicas de las mujeres de las que procede la biopsia se muestran en la tabla 4. El promedio de edad de las mujeres fue de 49 años, un IMC promedio de 28.7. Todas las participantes estuvieron libres de metástasis al momento de ser tomada la biopsia. Podemos observar que no hay diferencias significativas entre las diferentes variables medidas, por lo que representa una muestra uniforme.

Tabla 4. Características clínicas de las mujeres con CMTN y CMnTN de las que se obtuvo biopsia para realizar los análisis de expresión.

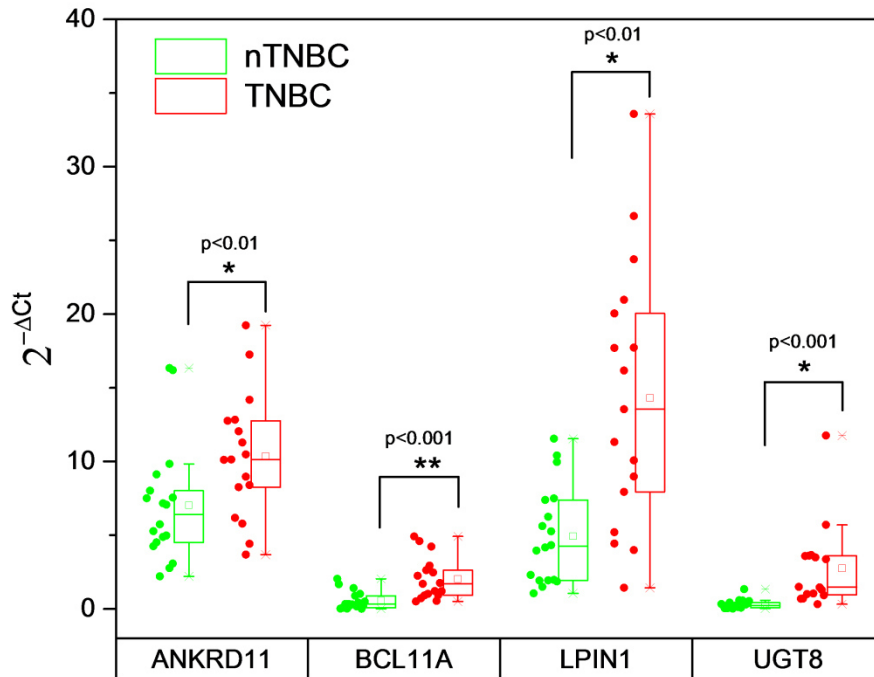
	N=30		CMTN		CMNTN		P
EDAD AL DIAGNÓSTICO (AÑOS)	49	26-71	51	39-71	47	26-61	0.1
IMC (ÍNDICE DE MASA CORPORAL, KG/M ²)	28.7	20.7-40.1	27.58	20.7-38	29.31	21.7-39	0.14
PRE- MENOPAUSIA	50%		48%		52%		1
DIABETES MELLITUS	11%		20%		4%		0.2
NIVELES DE GLUCOSA (MG/DL)	104.8	82-193	106.6	88-183	103.67	82-193	0.64
LACTANCIA	41%		40%		44%		0.75

Se determinó mediante qPCR una comparación entre la expresión de los genes *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXC1*, *LPIN1* y *UGT8* en las muestras de tejido de CMTN y CMnTN (Figura 7 y 8). Los niveles de expresión de estos genes en CMTN son más altos que los observados en los tejidos de CMnTN. Se observa una notable sobreexpresión de *FOXC1*, que es seguida por los niveles de expresión de *LPIN1*, *LPIN1*, *ANKRD11*, *BCL11A* y *UGT8*.



ANKRD11, *BCL11A*, *FOXC1*, *LPIN1* y *UGT8*, se encuentran sobreexpresados en CMTN, comparado con la expresión en CMnTN.

Figura 7. Expresión de una firma de genes propuesta en CMTN.



ANKRD11, *BCL11A*, *LPIN1* y *UGT8*, se encuentran sobreexpresados en CMTN, comparado con la expresión en CMnTN. En esta figura se excluye la expresión de *FOXC1* para poder observar la diferencia de expresión de los genes *ANKRD11*, *BCL11A*, *LPIN1* y *UGT8*.

Figura 8. Expresión de una firma de genes propuesta en CMTN, excepto *FOXC1*.

6.3 Linfocitos infiltrantes de tumor

Las características clínico-patológicas se resumen en la tabla 5. La edad media fue de 49 años (rango de 32-71 años). El 80% (21) de los tumores tenían cáncer mal diferenciado (grado 3) y el 20% restante (5) moderadamente diferenciado (grado 2). La invasión linfovascular estaba presente en el 73% de los pacientes y el 30.7% (8) presentaron metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. La estadificación tumoral según AJCC (American Joint Committee on Cancer) obtuvo 5 pacientes (19.2%) en estadio I, 15 pacientes (57.6%) en estadio II, 4 pacientes

(15.3%) en estadio III y 2 pacientes (7.6%) en el estadio IV al momento del diagnóstico. Todos los pacientes recibieron NAT después del diagnóstico de biopsia con aguja gruesa con Antraciclina + Taxol (88.4%) y esquemas de Carboplatino + Taxol (11.6%).

Tabla 5. Características clínico-patológicas.

Característica	n=26	%
Grado		
1	0	0
2	5	20
3	21	80
Invasión linfovascular		
Presente	19	73
Ausente	7	27
Estado de nódulo linfático		
Positivo	8	30.7
Negativo	18	69.2
Estadio		
I	5	19.2
II	15	57.6
III	4	15.3
IV	2	7.6

La respuesta patológica a los resultados NAT fue: sin evidencia de respuesta a la terapia 15.3% (4), respuesta parcial a la terapia 61.5% (16) y respuesta patológica completa 23% (6). En cuanto a la evaluación de TIL, 30.7% (n=8) presentaron un

bajo recuento de TIL, 38.4% (n=10) TIL intermedios y 30.7% (n=8) presentaron un alto conteo de TIL. En las pacientes con RPC el recuento de CD3+ fue alto en 83.3%, en pacientes con RPP el porcentaje de CD3+ alto fue de 93.7% y en las pacientes sin respuesta a la terapia neoadyuvante el porcentaje de especímenes con niveles altos de CD3+ fue de 50% (Tabla 6). Los casos con respuesta patológica completa presentaron 50% TIL elevados, 33% TIL bajos y 16% TIL intermedios. En las muestras con una respuesta parcial a la terapia, el 25% presentó TIL altos, el 50% como TIL intermedios y el 25% como TIL bajos. Finalmente, las muestras de mujeres sin respuesta a la terapia, el 75% presentó TIL bajos y el 25% con TIL intermedios, no hubo casos con altas TIL en este grupo.

Tabla 6. Tipo de respuesta y niveles de linfocitos.

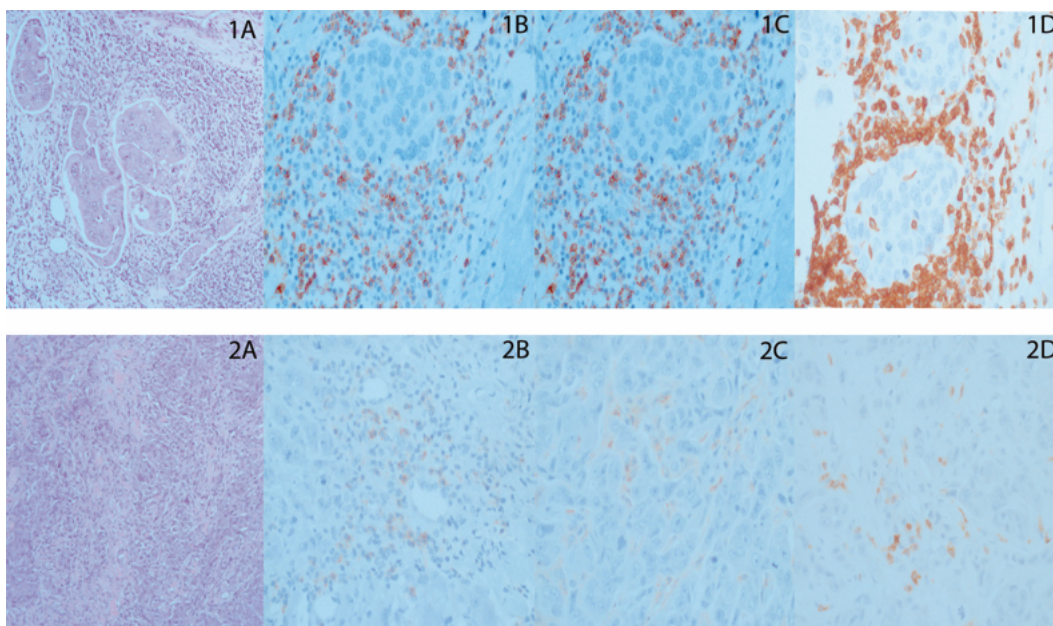
RESPUESTA PATOLÓGICA. N (%)	CD3+ (ALTO)	TIL ELEVADOS	TIL INTERMEDIO	TIL BAJO
RESPUESTA PATOLÓGICA COMPLETA 6 (23)	83.3	50	33	16
RESPUESTA PATOLÓGICA PARCIAL 16 (61.5)	93.7	25	50	25
SIN RESPUESTA 4 (15.3)	50	0	25	75

Se determinó la regresión univariable de las pacientes con RPC y el nivel alto o bajo de CD3+, CD4+ y CD8+. No se observaron valores de P significativos. Tabla 7.

Tabla 7. Regresión univariable de la respuesta patológica completa.

		REGRESIÓN UNIVARIABLE	
		OR (95% CI)	P
CD3 TILS	BAJO		Referencia
	ALTO	0.73 (0.09, 6.23)	0.77
CD4 TILS	BAJO		Referencia
	ALTO	0.28 (0.01, 6.01)	0.42
CD8 TILS	BAJO		Referencia
	ALTO	0.22 (0.01, 4.51)	0.32

Podemos observar en la figura 9 una representación de los resultados obtenidos en las IHQ.



Evaluación microscópica de tejidos de CMTN. Se contaron las células CD3+, CD4+ y CD8+ en cinco campos seleccionados al azar con 40 aumentos y los recuentos se promediaron. 1A, Niveles altos de TIL; 1B, CD3+ elevados; 1C, CD4+ elevados; 1D, CD8+ elevado; 2ª, Niveles bajos de TIL; 1B, CD3+ disminuido; 1C, CD4+ disminuido; 1D, CD8+ disminuido.

Figura 9. Representación de los resultados de Inmunohistoquímicas.

VII. DISCUSIÓN

El CMTN es una entidad heterogénea, a la cual diferentes grupos de investigación han intentado descifrar, empleando diferentes abordajes, como emplear muestras de tejido embebido en parafina o datos que se encuentran almacenados en bases de datos públicas. Con el fin de obtener resultados que puedan ser validados en nuestra población, nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de realizar un análisis de expresión génica de biopsias de CMTN comparado con CMnTN, empleando una muestra uniforme, y de esta manera eliminar el sesgo que hay en la gran mayoría de los trabajos publicados, en los que se han obtenido resultados que varían de un grupo a otro y que en algunos casos no se ha podido validar. La firma encontrada concuerda con lo reportado por Hanahan en el 2011 en la cual se encontraron alterados genes que participan en la progresión del cáncer, en vías metabólicas y en vías de inmunidad. Esto marcó la pauta de la presente investigación para continuar con la búsqueda de genes conductores del CMTN, así como de posibles marcadores pronósticos de este fenotipo tumoral. De esta manera, analizamos al CMTN en tres formas: 1) Evaluación de hotspot de genes conductores de cáncer para los que ya hay terapias en investigación; 2) Evaluación de la expresión diferencial de los genes que proponemos diferencian al CMTN del CMnTN y 3) Análisis cuantitativo de los TIL y su relación con la RPC.

La NGS es una herramienta de gran utilidad en enfermedades de origen multigénico como el cáncer, en donde la acumulación de una serie de mutaciones en varios genes es la clave para el desarrollo tumoral. La capacidad de evaluar en una sola prueba el estado mutacional de un conjunto relevante de oncogenes y genes

supresores de tumores, como los que se evalúan en este trabajo, nos permite la elucidación de mecanismos moleculares del CMTN y nos ayuda a diseñar mejores estrategias diagnósticas y terapéuticas de este tipo de tumores. TruSeq Amplicon Cancer Panel (Illumina Inc, San Diego, California) es un ensayo de secuenciación recién validado en el año 2015 ⁸⁸, dirigido para detectar mutaciones somáticas a través de cientos de hotspots mutacionales de genes importantes relacionados con el cáncer, incluyendo *PIK3CA*, *TP53* y *EGFR*. Las mutaciones en estos genes están relacionadas con el cáncer e implican innumerables vías celulares.

Anteriormente, se observó diferencia en el patrón de mutaciones somáticas entre los subtipos intrínsecos del cáncer de mama,⁶⁶ por ejemplo, los tumores con fenotipo triple negativo tienen alta prevalencia de mutaciones en *TP53* (80%) versus el cáncer de mama luminal (12%). En este trabajo analizamos al fenotipo triple negativo, observando que el gen con alta prevalencia de variantes exónicas fue *TP53*, lo que concuerda con lo señalado antes. Sin embargo, en el trabajo presentado por The Cancer Genome Atlas en el 2012,⁶⁶ se reporta que la mayoría de las variantes de *TP53* en tumores de tipo basal fueron del tipo sin sentido y cambio de marco de lectura, mientras que en este trabajo reportamos 7 de 15 variantes del tipo de cambio de sentido. *TP53* es un gen supresor de tumores que codifica una proteína multifuncional de unión al ADN que regula la transcripción de cientos de genes relacionados con la regulación del ciclo celular, diferenciación y apoptosis.^{89; 90; 91; 92; 93} La variante rs1042522 en *TP53*, corresponde a un cambio en el codón 72 del exón 4 dando lugar al cambio de arginina (CGC) por una prolina (CCC). Las proteínas p53Arg72 y p53Pro72 no difieren en su capacidad para unirse

al ADN de una manera específica de la secuencia, pero difieren de otras formas.⁹⁴ La proteína p53Arg72 induce la apoptosis más rápido y suprime la transformación más eficientemente que la proteína p53Pro72.^{95; 96} En otros procesos celulares, como aquellos relacionados con la infección por el virus del papiloma humano, se ha visto que la p53Arg72 es más susceptible a degradación por las proteínas E6 del virus del papiloma humano (HPV), y la degradación de la proteína p53 por el VPH E6 se correlaciona con un mayor riesgo de cánceres asociados al VPH.^{97; 98} Esta variante fue encontrada en 18 de las 19 muestras analizadas y está clasificada en ClinVar como de respuesta a fármacos. El CMTN, a diferencia de los demás subtipos de CM, responde mejor a la quimioterapia,⁹⁹ por lo que nuestros resultados sugieren que al presentar p53Arg72, las células activan la apoptosis con mayor eficiencia. Sin embargo, la asociación de esta variante de *TP53* con el riesgo a diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama sigue siendo controversial.^{100; 101; 102} Las variantes de cambio de sentido, rs121912654 y rs28934574, también de *TP53*, han sido asociadas anteriormente a carcinoma hepatocelular¹⁰³ y a osteosarcoma,¹⁰⁴ respectivamente. rs121912654 se localiza en el exón 5, como consecuencia, en el producto final hay sustitución de una valina por una fenilalanina. rs28934574 se localiza en el exón 8, como consecuencia en el producto final hay una sustitución de triptófano por arginina, esta última, cumple con los criterios publicados en 2013 por la ACMG¹⁰⁵ en relación con hallazgos en el exoma o la secuenciación del genoma, como una variante que recomiendan informar al paciente. Nosotros encontramos 7 variantes no reportadas del gen *TP53*. Cinco de estas variantes son del tipo SNV: p.Arg213Ter, p.His179Gln, p.Arg196Ter y p.Ser269Arg. Tres variantes corresponden a la inserción o eliminación de un

nucleótido: p.Asn268ThrfsTer77, p.Gys135AlafsTer35 y p.Cys275PhefsTer71. Todas estas variantes afectan a los exones TP53 que transcriben parte del dominio de unión al ADN, por lo que sería interesante investigar el papel de estas en el desarrollo de CMTN.

En México, Vaca-Paniagua y colaboradores, analizaron mediante secuenciación el exoma completo de 12 tejidos de CMTN embebidos en parafina y reportaron a *TP53* y *RB1*, como los genes mutados con mayor frecuencia en este tipo de cáncer⁶⁷. Nosotros empleamos 19 muestras de tejido fresco, sin embargo, no encontramos los mismos resultados respecto a *RB1*, pudiendo atribuirse esta diferencia al diseño del estudio, pues en el trabajo de Vaca-Paniagua realizan secuenciación del exoma completo, teniendo una mayor cobertura del gen y en este trabajo se realizó secuenciación de sitios hotspot, con la ventaja que nosotros tenemos una mayor profundidad de lectura. Otra posible causa, sería la diferencia de estructura genética de la población estudiada, ya que se ha visto que, a pesar del origen Mestizo, no hay evidencia de desequilibrio gamético en población del noreste de México¹⁰⁶, que es principalmente el origen de las personas que acude al Hospital Universitario de la UANL, lugar donde se recolectaron las muestras para la presente investigación. A diferencia de nuestro trabajo, el grupo de Vaca-Paniagua utilizó muestras de pacientes procedentes del centro del país.

PIK3CA es un gen que codifica la subunidad catalítica p110 alfa (p110 α) de la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).¹⁰⁷ La vía de señalización PI3K es importante para varios procesos celulares, incluyendo crecimiento celular,

proliferación, migración y supervivencia.¹⁰⁸ Diversas investigaciones han mostrado amplificaciones génicas, deleciones y, más recientemente, mutaciones de cambio de sentido en el gen *PIK3CA* en muchos tipos de cáncer humanos, incluidos los cánceres de colon, mama, cerebro, hígado, estómago y pulmón.¹⁰⁹ Estas mutaciones somáticas de cambio de sentido, se propone, aumentan la actividad quinasa de *PIK3CA* contribuyendo a la transformación celular¹¹⁰. Nosotros encontramos cuatro variantes del gen *PIK3CA*, dos variantes de este gen, ya se han identificado como rs2699895 y rs121913279. La primera es una variante en el intrón 5 y en base a su contexto genómico no representa características importantes o de asociación con riesgo a padecer cáncer. rs121913279 es una variante de cambio de sentido, el alelo ancestral es una Adenina y en este caso se cambia por una guanina, lo que representa un cambio de histidina por arginina en la posición 1047 de la proteína. En ClinVar está clasificada como probablemente patogénica, ya que se ha asociado a cáncer de mama, colorrectal, melanoma y cáncer pulmón de células no pequeñas. También encontramos 2 variantes no reportadas, c.1252-27A>G y p.Glu1012Gln, la primera se localiza en una región intrónica y la segunda localizada en el exón 21 en la posición 1012 de la proteína, como consecuencia hay un cambio de ácido glutámico por glutamina. En trabajos previos, se ha reportado que *PIK3CA* es el segundo gen más frecuentemente mutado en los CMTN,^{66; 111} Sin embargo, aunque *PIK3CA* presenta al menos una variante en 15 de las 19 muestras analizadas, sólo dos muestras presentan variante exónica en este gen. Lips y colaboradores, reportaron que las mutaciones en *PIK3CA* están asociadas con mutaciones en *BRCA1*¹¹², en este trabajo no investigamos el estado del gen *BRCA1*, por lo que sería interesante analizar esta teoría.

Por otro lado, en este trabajo, nosotros encontramos la variante rs2491231 de *FLT3*, la cual corresponde a un cambio del tipo SNV para el que no hay evaluación en la base de datos ClinVar. Esta variante se encuentra en una región de splicing entre el exón 14 y 15 que forman parte de la región que codifica para el dominio citoplásmico de la proteína. El gen *FLT3* codifica para un receptor tirosina quinasa de clase III regulador de la hematopoyesis. Cuando este receptor es activado fosforila y activa múltiples moléculas efectoras citoplásmicas en vías implicadas en la apoptosis, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas en la médula ósea. Las mutaciones más comunes se localizan en los exones 14 o 20, y resultan en la activación constitutiva de este receptor dan como resultado leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda (LMA)^{113; 114}.

Son interesantes estas variantes debido a que actualmente hay ensayos clínicos que evalúan la inhibición de PI3K y FLT3 así como la depleción de TP53 mutante o la restauración de la actividad de TP53. La vía PI3K-AKT-mTOR es un objetivo interesante para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer: los resultados preclínicos y los hallazgos clínicos iniciales han demostrado ser muy prometedores.¹¹⁵ Muchos ensayos clínicos que evalúan inhibidores de PI3K en diferentes tipos de tumores han sido iniciados por compañías farmacéuticas e instituciones académicas. Los resultados de todos estos estudios ayudarán a comprender el potencial terapéutico de los inhibidores de PI3K como agentes anticancerígenos, y determinarán el futuro de la atención del cáncer.¹¹⁶ En un

ensayo clínico de fase 2 publicado recientemente, un inhibidor de AKT (ipatasertib) mejoró los resultados en un subconjunto de pacientes con TNBC metastásico cuando se combina con paclitaxel en el contexto de primera línea. Además, se están desarrollando nuevos compuestos con distinta especificidad y potencia dirigidas a diferentes componentes PI3K / AKT / mTOR y moléculas afines (por ejemplo, proteína quinasa activada por mitógeno)¹¹⁷.

En el 2011, se realizó el ensayo clínico aleatorizado de fase II para la molécula SU011248 o sunitinib, que es un inhibidor tirocina cinasa no específico de PDGFR, VEGFR, KIT y FLT3 en pacientes con CMTN avanzado, con recaída después de la quimioterapia basada en taxanos y antraciclina¹¹⁸. Este estudio concluyó que la monoterapia con Sunitinib no mejoró la eficacia en comparación con la quimioterapia en pacientes con CMTN avanzado previamente tratado. Sin embargo, en agosto de 2017, Stone y el grupo CALGB, publicaron los resultados del ensayo clínico fase III de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y una mutación FLT3¹¹⁹. El ensayo consistió en agregar midostaurina (un inhibidor de FLT3) a la quimioterapia estándar de los pacientes. Se realizó la aleatorización de los pacientes y se estratificó de acuerdo con el subtipo de mutación *FLT3*: mutación puntual en el dominio tirosina quinasa (TKD) o mutación interna en tándem (ITD). En este trabajo se concluyó que la adición de midostaurina a la quimioterapia estándar prolongó significativamente la supervivencia general y sin eventos entre los pacientes con AML y una mutación *FLT3* del tipo TKD o ITD. Dado estos resultados, es importante determinar la importancia clínica de la variante encontrada

por nuestro grupo de investigación, analizar su efecto y posteriormente su uso como blanco terapéutico.

Creciente evidencia revela que la estabilización de p53 mutante en tumores es crucial para sus actividades oncogénicas, mientras que la reducción de p53 mutante atenúa las propiedades malignas de las células cancerosas. Por lo tanto, p53 mutante es un objetivo susceptible de convertirse en fármaco atractivo para la terapia contra el cáncer. Se han tomado diferentes enfoques para desarrollar compuestos de moléculas pequeñas que se dirigen específicamente a la p53 mutante. Estos incluyen compuestos que restauran la conformación de tipo salvaje y la actividad transcripcional de la p53 mutante, inducen el agotamiento de la p53 mutante, inhiben las rutas río abajo de p53 mutante oncogénico e inducen letalidad sintética a la p53 mutante ¹²⁰. Recientemente, Synnot y colaboradores, reportaron la actividad anticancerígena de PRIMA-1 y PRIMA-1^{MET} (APR-246), dos compuestos que reactivan p53 mutante y lo convierten a una forma con propiedades de tipo salvaje. Utilizando un panel de 18 líneas celulares de cáncer de mama y 2 líneas celulares de mama inmortalizadas, se encontró que las líneas celulares mutadas de p53 fueron significativamente más sensibles a PRIMA-1^{MET} que las células p53 WT. Además de inhibir la proliferación celular, PRIMA-1^{MET} indujo apoptosis e inhibió la migración de una manera dependiente de p53. En base a estos datos, los investigadores concluyen que la orientación del p53 mutante en el tratamiento con PRIMA-1^{MET} es un nuevo enfoque potencial para tratar el cáncer de mama con mutaciones en p53, incluido el subgrupo de CMTN¹²¹.

Mediante la tecnología de qPCR, nosotros definimos una firma de cinco genes (*FOXC1*, *UGT8*, *BCL11A*, *LPIN1* y *ANKRD11*) que se sobreexpresa en CMTN. El papel de cada gen se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Descripción de genes con expresión aumentada en CMTN.

GEN	NOMBRE	OBSERVACIÓN
<i>FOXC1</i>	Forkhead Box C1	Codifica un factor de transcripción. Participa en la regulación del desarrollo embrionario y ocular.
<i>BCL11A</i>	B Cell CLL/Linfoma 11A	Codifica un factor de transcripción con dedos de zinc. Durante la diferenciación de células hematopoyéticas, este gen está regulado negativamente.
<i>UGT8</i>	UDP Glicosiltransferasa 8	Cataliza la transferencia de galactosa a ceramida, un paso enzimático clave en la biosíntesis de galactocerebrósidos, que son abundantes esfingolípidos de la membrana de mielina del sistema nervioso central y periférico.
<i>ANKRD11</i>	Dominio 11 de repetición de Ankirina	Regulador de cromatina que modula la acetilación de histonas y la expresión génica en células precursoras neuronales.

<i>LPIN1</i>	Lipin 1	Control del metabolismo de los ácidos grasos en diferentes niveles. Actúa como una enzima fosfatidato fosfatasa dependiente de magnesio que cataliza la conversión de ácido fosfatídico a diacilglicerol durante la biosíntesis de triglicéridos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en la membrana endoplásmica del retículo. Actúa también como un coactivador transcripcional nuclear para PPARGC1A / PPARA para modular la expresión génica del metabolismo lipídico.
---------------------	---------	---

Algunos de estos genes están claramente involucrados en las vías tumorales. Los genes *FOXC1* y *BCL11A* han sido estudiados de manera independiente y han sido considerados de utilidad clínica para CMTN como biomarcadores de diagnóstico y metastásicos, y algunos han sido considerados como posibles dianas terapéuticas. La regulación positiva de *FOXC1* promueve el crecimiento tumoral, la transición epitelial mesenquimal y el comportamiento metastásico.¹²² Se ha observado que la sobreexpresión de *BCL11A* afecta la apoptosis mediada por p53 y desempeña un papel clave en CMTN¹²³. *UGT8* codifica para una enzima implicada en la síntesis de galactosilceramidas y esfingolípidos, la regulación previa de este gen aumenta el índice de proliferación celular y disminuye la apoptosis, favoreciendo los procesos metastásicos. Además, la sobreproducción de esta enzima aumenta la resistencia a la doxorubicina ¹²⁴. *LPIN1* es un gen que codifica la enzima lipina1, una enzima

que participa en la regulación de la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos catalizando la desfosforilación de fosfatidato en diacilglicerol (DAG), además de ser un corregulador de la transcripción de genes del metabolismo mitocondrial. Recientemente, se ha descrito que lipina1 regula el fenotipo de célula cancerosa tanto en cultivo de células de CM como en líneas celulares de cáncer de próstata¹²⁵. Dadas estas observaciones, es importante la validación de estos resultados en una muestra más amplia, así como analizar su participación en el desarrollo del subtipo de CMTN.

Nuestro grupo de trabajo encontró una firma de genes que se expresa en la inmunidad y como se mencionó anteriormente se ha demostrado que la presencia de una inmunidad antitumoral del hospedador influye en la respuesta a los tratamientos citotóxicos. Recientemente, se le ha dado una gran importancia al papel que juega la respuesta inmune en la respuesta al tratamiento en CMTN, a este respecto decidimos incluir una prueba que pudiera explicar el comportamiento de los tumores de CMTN en nuestra población, ya que la firma de expresión encontrada anteriormente en nuestro grupo de investigación, representa en su mayoría a genes que se expresan en células del sistema inmune. En el CMTN, la quimioterapia neoadyuvante (NAT) sólo induce una RPC en 30-35% de los pacientes. Los factores clínicos y patológicos no son suficientes para distinguir a los pacientes que no tienen posibilidad de una RPC o no. En este trabajo se evaluaron los TIL del estroma en las biopsias con aguja gruesa, se inmunofenotipificaron y se determinó la respuesta patológica en las muestras de cirugía de cáncer de mama post-neoadyuvante. Los criterios para evaluar los TIL fueron los reportados en 2015

por el grupo internacional de trabajo sobre el TIL en cáncer de mama, que recomienda un sistema de puntuación para los TIL con tinción de hematoxilina-eosina (HE) para la práctica habitual¹²⁶. Encontramos que en la mayoría de los casos que exhibían una respuesta patológica completa (50%) presentaban un alto recuento de TIL, mientras que 33% y 17% exhibían respuesta patológica parcial y ninguna respuesta respectivamente, lo cual es consistente con lo publicado previamente, donde el recuento alto de TIL se toma en cuenta como un predictor de respuesta patológica a la terapia neoadyuvante^{127; 128}, especialmente en CMTN.

La composición exacta de la infiltración de linfocitos T varía mucho, sin embargo, puede afectar profundamente la progresión de la enfermedad y la supervivencia general del paciente. No está claro si la presencia de linfocitos CD4+/CD8+ por sí solo proporciona información pronóstica, en este trabajo encontramos que una alta expresión de CD3+ estuvo presente en la mayoría de los casos con RPC (83.3%) y en 93.7% de los casos con RPP. Anteriormente, Rathore y colaboradores¹²⁹, encontraron una relación directa entre la alta expresión de CD3+ y una mejor supervivencia; esta relación también se ha observado en otros tipos de cáncer, como el cáncer de cuello uterino y el cáncer de ovario epitelial^{130; 131}. Esta asociación es importante ya que la densidad de la expresión de CD3+ se puede medir de forma rutinaria para predecir la respuesta patológica en aquellos pacientes con CMTN. A diferencia de CD3 +, CD4 + y CD8 + dieron como resultado un recuento bajo en aquellos casos con una RPC, mientras que en otros estudios la alta densidad de CD4 + y CD8 + se relacionó con un buen pronóstico en la supervivencia general¹³⁰. Al realizar en análisis univariable de la RPC con la inmunofenotipificación de los

linfocitos T, no encontramos resultados estadísticamente significativos ($p < 0,005$), esto puede ser debido al tamaño de la muestra. La mayoría de los estudios que se han realizado en este campo son estudios que también incluyen casos con amplificación de HER2 / neu, con los que suman muestras de más de cien casos¹³²; ¹³³, a diferencia de este estudio, que sólo incluye casos de cáncer de mama triple negativo.

VIII. CONCLUSIONES

Aunque nuestro número de muestras fue pequeño, podemos sacar varias conclusiones potencialmente importantes. En primer lugar, el espectro de mutación sigue siendo diverso incluso en un grupo cuidadosamente seleccionado y no tratado de pacientes con CMTN, todas las muestras eran de la misma institución y los procedimientos de laboratorio fueron cuidadosamente monitoreados. Encontramos 65 variantes en 25 genes de los 48 secuenciados, de las cuales 17 no han sido reportadas. Nuestros resultados sugieren fuertemente que cada tumor tiene su composición molecular única, sin embargo, se observa que el total de las biopsias estudiadas tienen al menos dos variantes en el gen *TP53*, siendo la variante, de respuesta a fármacos, p.Pro72Arg, la más representativa, pues se encontró en el 94% de las muestras analizadas. Además, encontramos 8 variantes no reportadas previamente con probables características deletéreas de la proteína supresora de tumores p53. Se identificó la variante rs2491231 del gen *FLT3*, en el 84% (16/19) de las muestras, la cual no ha sido reportada antes para este tipo de cáncer. Por todo esto, es importante validar la presencia de estas variantes en una cohorte mayor, así como en cultivo celular, y de esta manera evaluar el impacto en el diagnóstico, pronóstico y en última instancia evaluar el efecto de las variantes encontradas tanto reportadas como no reportadas.

Además, este estudio validó un grupo de cinco genes útiles para discriminar CMTN, algunos de ellos independientemente asociados con este fenotipo de CM. Interesantemente, algunos de los genes están involucrados en procesos metabólicos relacionados con grasas. Por lo tanto, estos genes deberían tener

implicaciones importantes para el fenotipo CMTN. Sin embargo, la significación biológica y las interacciones moleculares deberían investigarse más a fondo para determinar la fisiopatología intrínseca de este subtipo CM.

No se encontró una diferencia significativa entre la cantidad de Linfocitos Tumorales Infiltrados y la Respuesta Patológica Completa en las muestras de CMTN analizadas, pero creemos que es necesario analizar un mayor número de muestras ya que sí se observó una tendencia cuando hay cuenta baja de TIL y no hay respuesta patológica.

Estos resultados resumen la heterogeneidad de CMTN, aun así, los hallazgos descritos pueden ser pertinentes para pacientes mexicanos y requieren evaluación en otros grupos étnicos y poblaciones.

La imperante necesidad de encontrar blancos moleculares de CMTN le da un valor sobresaliente a los genes que reportamos en este trabajo, pues pueden ser considerados para posteriores evaluaciones como blancos terapéuticos o de pronóstico de CMTN.

BIBLIOGRAFIA

- 1 USCANGA-PERALES, G. I.; SANTUARIO-FACIO, S. K.; ORTIZ-LÓPEZ, R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. **Medicina Universitaria**, v. 18, n. 71, p. 105-114, 2016/04/01/ 2016. ISSN 1665-5796. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665579616300667> >.
- 2 DESANTIS, C. et al. Breast cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 1, p. 52-62, 2015. ISSN 1542-4863. Disponible em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21203/abstract> >. Disponible em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21203/full> >. Disponible em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21203/pdf> >.
- 3 Fact Sheets by Cancer. 2015. Disponible em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx >.
- 4 Mexico - INEGI - Estadísticas a propósito del Día Mundial de la lucha contra el cáncer de mama . 19 de octubre., 2016. Disponible em: < <http://mx.noticiasol.com/inegi/estadisticas-a-proposito-del-da-mundial-de-la-lucha-contra-el-cncer-de-mama--19-de-octubre.html> >.
- 5 YADAV, B. S.; CHANANA, P.; JHAMB, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. **World J Clin Oncol**, v. 6, n. 6, p. 252-63, Dec 10 2015. ISSN 2218-4333. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v6.i6.252> >.
- 6 GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. 2013-09-01 2013. Disponible em: < <http://annonc.oxfordjournals.org/content/24/9/2206.full> >.
- 7 ALLRED, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 23, 2010-05-01 2010. ISSN 0893-3952. Disponible em: < <http://www.nature.com/modpathol/journal/v23/n2s/full/modpathol201055a.html> >.
- 8 DAI, X.; CHEN, A.; BAI, Z. Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. **Sci Rep**, v. 4, p. 6566, 2014. ISSN 2045-2322. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep06566> >.
- 9 DAI, X. et al. Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers. In: (Ed.). **Sci Rep**, v.5, 2015. ISBN 2045-2322 (Electronic).

- 10 HURVITZ, S.; MEAD, M. Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 28, n. 1, p. 59-69, Feb 2016. ISSN 1040-872x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/gco.0000000000000239> >.
- 11 PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000-08-17 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v406/n6797/full/406747a0.html> >.
- 12 SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191367098> >.
- 13 RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol**, v. 208, n. 4, p. 495-506, Mar 2006. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.1916> >.
- 14 VAN DE RIJN, M. et al. Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. In: (Ed.). **Am J Pathol**, v.161, 2002. p.1991-6. ISBN 0002-9440 (Print)1525-2191 (Electronic).
- 15 BLOWS, F. M. et al. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. In: (Ed.). **PLoS Med**, v.7, 2010. ISBN 1549-1277 (Print)1549-1676 (Electronic).
- 16 SIADATI, S. et al. Correlation of ER, PR and HER-2/Neu with other Prognostic Factors in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast. **Iran J Pathol**, v. 10, n. 3, p. 221-6, Summer 2015. ISSN 1735-5303 (Print)1735-5303. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 17 GOLDHIRSCH, A. et al. 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. In: (Ed.). **Ann Oncol**. England, v.22, 2011. p.1736-47. ISBN 1569-8041 (Electronic)0923-7534 (Linking).
- 18 VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, Dec 19 2002. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa021967> >.
- 19 VAN 'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-6, Jan 31 2002. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/415530a> >.

- 20 PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 27, p. 2817-26, Dec 30 2004. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa041588> >.
- 21 _____. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 23, p. 3726-34, Aug 10 2006. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.04.7985> >.
- 22 MOOK, S. et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 116, n. 2, p. 295-302, Jul 2009. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-008-0130-2> >.
- 23 DRUKKER, C. A. et al. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. **Int J Cancer**, v. 133, n. 4, p. 929-36, Aug 15 2013. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28082> >.
- 24 KNAUER, M. et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 3, p. 655-61, Apr 2010. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-010-0814-2> >.
- 25 PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1160-7, Mar 10 2009. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.18.1370> >.
- 26 MARTIN, M. et al. PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 138, n. 2, p. 457-66, Apr 2013. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-013-2416-2> >.
- 27 DOWSETT, M. et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 22, p. 2783-90, Aug 1 2013. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2012.46.1558> >.
- 28 JANKOWITZ, R. C. et al. Prognostic utility of the breast cancer index and comparison to Adjuvant! Online in a clinical case series of early breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 5, p. R98, 2011. ISSN 1465-5411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3038> >.
- 29 FILIPITS, M. et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 18, p. 6012-20, Sep 15 2011. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-0926> >.

- 30 CUZICK, J. et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 32, p. 4273-8, Nov 10 2011. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.31.2835> >.
- 31 BRENTON, J. D. et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol**, v. 23, n. 29, p. 7350-60, Oct 10 2005. ISSN 0732-183X (Print)0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.03.3845> >.
- 32 FOULKES, W. D. et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 19, p. 1482-5, Oct 1 2003. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 33 BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**, v. 109, n. 9, p. 1721-8, May 1 2007. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.22618> >.
- 34 MERSIN, H. et al. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. **Breast**, v. 17, n. 4, p. 341-6, Aug 2008. ISSN 0960-9776 (Print)0960-9776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2007.11.031> >.
- 35 PHIPPS, A. I. et al. Reproductive History and Oral Contraceptive Use in Relation to Risk of Triple-Negative Breast Cancer. 2011-02-23 2011. Disponível em: < <http://jnci.oxfordjournals.org/content/early/2011/02/23/jnci.djr030> >.
- 36 TAMIMI, R. M. et al. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 131, n. 1, p. 159-67, Jan 2012. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1702-0> >.
- 37 GAUDET, M. M. et al. Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger. **Breast Cancer Res Treat**, v. 130, n. 2, p. 587-97, Nov 2011. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1616-x> >.
- 38 XING, P.; LI, J.; JIN, F. A case-control study of reproductive factors associated with subtypes of breast cancer in Northeast China. **Med Oncol**, v. 27, n. 3, p. 926-31, Sep 2010. ISSN 1357-0560. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-009-9308-7> >.

- 39 PHIPPS, A. I. et al. Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 3, p. 454-63, Mar 2011. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-10-0974> >.
- 40 KWAN, M. L. et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. In: (Ed.). **Breast Cancer Res**, v.11, 2009. p.R31. ISBN 1465-5411 (Print)1465-542X (Electronic).
- 41 KIM, B. K. et al. Metabolic syndrome, insulin resistance, and mammographic density in pre- and postmenopausal women. **Breast Cancer Res Treat**, Aug 18 2015. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-015-3544-7> >.
- 42 MAITI, B. et al. The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 121, n. 2, p. 479-83, Jun 2010. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-009-0591-y> >.
- 43 DAVIS, A. A.; KAKLAMANI, V. G. Metabolic syndrome and triple-negative breast cancer: a new paradigm. **Int J Breast Cancer**, v. 2012, p. 809291, 2012. ISSN 2090-3189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/809291> >.
- 44 DAVISON, Z. et al. Insulin-like growth factor-dependent proliferation and survival of triple-negative breast cancer cells: implications for therapy. **Neoplasia**, v. 13, n. 6, p. 504-15, Jun 2011. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 45 AMIRIKIA, K. C. et al. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women : Implications for breast cancer screening recommendations. **Cancer**, v. 117, n. 12, p. 2747-53, Jun 15 2011. ISSN 0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25862> >.
- 46 DAWOOD, S. et al. Triple receptor-negative breast cancer: the effect of race on response to primary systemic treatment and survival outcomes. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 2, p. 220-6, Jan 10 2009. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.17.9952> >.
- 47 CHLEBOWSKI, R. T. et al. Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 6, p. 439-48, Mar 16 2005. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/dji064> >.
- 48 ZAHARIA, M. et al. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. **Rev. perú. med. exp. salud pública**, v. 30, n. 4, p. 649-656, 10/2013 2013. ISSN 1726-4634. Disponível em: < http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342013000400018&lng=es&nrm=iso&tlng=es >.Disponível em: <

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000400018&lng=es&nrm=iso&tlng=es >.Disponível em: <
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v30n4/a18v30n4.pdf> >.

- 49 VALLEJOS, C. S. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. **Clin Breast Cancer**, v. 10, n. 4, p. 294-300, Aug 1 2010. ISSN 1526-8209. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3816/CBC.2010.n.038> >.
- 50 CINTRA, J. R. et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 2, p. 178-87, Mar-Apr 2012. ISSN 0104-4230 (Print)0104-4230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 51 FERNANDEZ, A.; REIGOSA, A. [Molecular classification of breast cancer patients obtained through the technique of chromogenic in situ hybridization (CISH)]. **Invest Clin**, v. 54, n. 4, p. 406-16, Dec 2013. ISSN 0535-5133 (Print)0535-5133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 52 LARA-MEDINA, F. et al. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. **Cancer**, v. 117, n. 16, p. 3658-69, Aug 15 2011. ISSN 0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25961> >.
- 53 NISHIMURA, R.; ARIMA, N. Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? **Breast Cancer**, v. 15, n. 4, p. 303-8, 2008. ISSN 1340-6868. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-008-0042-3> >.
- 54 DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4429-34, Aug 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-3045> >.
- 55 ABDULKARIM, B. S. et al. Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 21, p. 2852-8, Jul 20 2011. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.33.4714> >.
- 56 NGUYEN, P. L. et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 14, p. 2373-8, May 10 2008. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2007.14.4287> >.

- 57 MASUDA, H. et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 19, p. 5533-40, Oct 1 2013. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-0799> >.
- 58 VON MINCKWITZ, G. et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 15, p. 1796-804, May 20 2012. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2011.38.8595> >.
- 59 LIEDTKE, C. et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. 2008-03-10 2008. Disponível em: < <http://jco.ascopubs.org/content/26/8/1275> >.
- 60 KREIKE, B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. In: (Ed.). **Breast Cancer Res**, v.9, 2007. p.R65. ISBN 1465-5411 (Print)1465-542X (Electronic).
- 61 RODY, A. et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 5, p. R97, 2011. ISSN 1465-5411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3035> >.
- 62 LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. 2011-07-01 2011. Disponível em: < <http://www.jci.org/articles/view/45014> >.
- 63 BURSTEIN, M. D. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 7, p. 1688-98, Apr 1 2015. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-0432> >.
- 64 CAREY, L. A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 8, p. 2329-34, Apr 15 2007. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1109> >.
- 65 ZHANG, C. et al. Higher locoregional recurrence rate for triple-negative breast cancer following neoadjuvant chemotherapy, surgery and radiotherapy. **Springerplus**, v. 4, p. 386, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-015-1116-2> >.
- 66 Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct 04 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature11412> >.

- 67 VACA-PANIAGUA, F. et al. Revealing the Molecular Portrait of Triple Negative Breast Tumors in an Understudied Population through Omics Analysis of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0126762, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126762> >.
- 68 BRUNELLO, A. et al. Targeted approaches to triple-negative breast cancer: current practice and future directions. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 5, p. 605-12, 2013. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 69 D'AGOSTINO, R. B., SR. Changing end points in breast-cancer drug approval--the Avastin story. **N Engl J Med**, v. 365, n. 2, p. e2, Jul 14 2011. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp1106984> >.
- 70 ARUN, B. et al. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. **Int J Oncol**, v. 47, n. 1, p. 262-8, Jul 2015. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2015.3003> >.
- 71 CAREY, L. A. et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 21, p. 2615-23, Jul 20 2012. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.34.5579> >.
- 72 GUCALP, A. et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 19, p. 5505-12, Oct 1 2013. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3327> >.
- 73 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> >.
- 74 DEGNIM, A. C. et al. Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 144, n. 3, p. 539-49, Apr 2014. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-2896-8> >.
- 75 DENKERT, C. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 1, p. 105-13, Jan 1 2010. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2009.23.7370> >.
- 76 CORONELLA-WOOD, J. A.; HERSH, E. M. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 52, n. 12, p. 715-38, Dec 2003. ISSN 0340-7004 (Print)0340-7004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-003-0409-4> >.

- 77 WONG, P. Y. et al. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. **J Surg Res**, v. 76, n. 1, p. 95-103, Apr 1998. ISSN 0022-4804 (Print)0022-4804. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/jsre.1998.5301> >.
- 78 AALTOOMAA, S. et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 28a, n. 4-5, p. 859-64, 1992. ISSN 0959-8049 (Print)0959-8049. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 79 KOHRT, H. E. et al. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. **PLoS Med**, v. 2, n. 9, p. e284, Sep 2005. ISSN 1549-1277. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020284> >.
- 80 CHIN, Y. et al. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. **Anticancer Res**, v. 12, n. 5, p. 1463-6, Sep-Oct 1992. ISSN 0250-7005 (Print)0250-7005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 81 DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. In: (Ed.). **Breast Cancer Res**, v.9, 2007. p.212. ISBN 1465-5411 (Print)1465-542X (Electronic).
- 82 LOI, S. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 7, p. 860-7, Mar 1 2013. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2011.41.0902> >.
- 83 ADAMS, S. et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.55.0491>, 2016-09-22 2016. Disponível em: < <http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2013.55.0491> >.
- 84 DIECI, M. V. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. **Ann Oncol**, v. 26, n. 8, p. 1698-704, Aug 2015. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv239> >.
- 85 ALTHOBITI, M. et al. Heterogeneity of Tumour Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer and its prognostic significance. **Histopathology**, Jun 27 2018. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/his.13695> >.

- 86 FABER, T. E. et al. IL1RL1 Gene Variants and Nasopharyngeal IL1RL-a Levels Are Associated with Severe RSV Bronchiolitis: A Multicenter Cohort Study. In: (Ed.). **PLoS One**, v.7, 2012. ISBN 1932-6203 (Electronic).
- 87 WINK, D. A. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. In: (Ed.). **J Leukoc Biol**, v.89, 2011. p.873-91. ISBN 0741-5400 (Print)1938-3673 (Electronic).
- 88 SIMEN, B. B. et al. Validation of a next-generation-sequencing cancer panel for use in the clinical laboratory. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, n. 4, p. 508-17, Apr 2015. ISSN 0003-9985. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2013-0710-OA> >.
- 89 XU, H.; EL-GEWELY, M. R. P53-responsive genes and the potential for cancer diagnostics and therapeutics development. **Biotechnol Annu Rev**, v. 7, p. 131-64, 2001. ISSN 1387-2656 (Print)1387-2656. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 90 LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-31, Feb 07 1997. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 91 LIU, M. C.; GELMANN, E. P. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. **Semin Oncol**, v. 29, n. 3, p. 246-57, Jun 2002. ISSN 0093-7754 (Print)0093-7754. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 92 LIU, L. et al. Combined effect of genetic polymorphisms in P53, P73, and MDM2 on non-small cell lung cancer survival. **J Thorac Oncol**, v. 6, n. 11, p. 1793-800, Nov 2011. ISSN 1556-0864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182272273> >.
- 93 WALLACE-BRODEUR, R. R.; LOWE, S. W. Clinical implications of p53 mutations. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 1, p. 64-75, Jan 1999. ISSN 1420-682X (Print)1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050270> >.
- 94 JONES, J. S. et al. p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5845-9, Sep 01 2004. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0590> >.
- 95 THOMAS, M. et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 1092-100, Feb 1999. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 96 DUMONT, P. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 357-65, Mar 2003. ISSN 1061-4036 (Print)1061-4036. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ng1093> >.

- 97 STOREY, A. et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 229-34, May 21 1998. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/30400> >.
- 98 JI, X. et al. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 4, p. 875-9, Apr 2008. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgn039> >.
- 99 FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v. 363, n. 20, p. 1938-48, Nov 11 2010. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1001389> >.
- 100 SOLEIMANI, A. et al. The Evaluation of p53 Polymorphism at Codon 72 and Association With Breast Cancer in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. In: (Ed.). **J Cancer Prev**, v.21, 2016. p.288-93. ISBN 2288-3649 (Print)2288-3657 (Electronic).
- 101 BANSAL, A. et al. Effect of p53 codon 72 polymorphism on the survival outcome in advanced stage cervical cancer patients in India. In: (Ed.). **Indian J Med Res**, v.144, 2016. p.359-65. ISBN 0971-5916 (Print).
- 102 JOHNSON, N. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 9, p. 1051-7, May 01 2007. ISSN 0964-6906 (Print)0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddm050> >.
- 103 BRESSAC, B. et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. **Nature**, v. 350, n. 6317, p. 429-31, Apr 04 1991. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/350429a0> >.
- 104 SMITH-SORENSEN, B. et al. Screening for TP53 mutations in osteosarcomas using constant denaturant gel electrophoresis (CDGE). **Hum Mutat**, v. 2, n. 4, p. 274-85, 1993. ISSN 1059-7794 (Print)1059-7794. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/humu.1380020407> >.
- 105 PMC, E. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. - Abstract - Europe PMC. 2013/07 2013. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/23788249> >.
- 106 CERDA-FLORES, R. M. et al. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosí and Zacatecas to Nuevo Leon in Mexico. **Hum Biol**, v. 63, n. 3, p. 309-27, Jun 1991. ISSN 0018-7143 (Print)0018-7143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- 107 VOLINIA, S. et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. **Genomics**, v. 24, n. 3, p. 472-7, Dec 1994. ISSN 0888-7543 (Print)0888-7543. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 108 KATSO, R. et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 615-75, 2001. ISSN 1081-0706 (Print)1081-0706. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.615> >.
- 109 KARAKAS, B.; BACHMAN, K. E.; PARK, B. H. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 4, p. 455-459, 2006-01-31 2006. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.nature.com/bjc/journal/v94/n4/full/6602970a.html?foxtrotcallback=true> >.
- 110 SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 554, Apr 23 2004. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1096502> >.
- 111 SHAH, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 395-9, Apr 04 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature10933> >.
- 112 LIPS, E. H. et al. Next generation sequencing of triple negative breast cancer to find predictors for chemotherapy response. In: (Ed.). **Breast Cancer Res**, v.17, 2015. ISBN 1465-5411 (Print)1465-542X (Electronic).
- 113 URAS, I. Z. et al. Palbociclib treatment of FLT3-ITD+ AML cells uncovers a kinase-dependent transcriptional regulation of FLT3 and PIM1 by CDK6. In: (Ed.). **Blood**, v.127, 2016. p.2890-902. ISBN 0006-4971 (Print)1528-0020 (Electronic).
- 114 ADAMIA, S. et al. NOTCH2 and FLT3 gene mis-splicings are common events in patients with acute myeloid leukemia (AML): new potential targets in AML. In: (Ed.). **Blood**, v.123, 2014. p.2816-25. ISBN 0006-4971 (Print)1528-0020 (Electronic).
- 115 COCCIOLONE, V. et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a dose-dense schedule in real life and putative role of PIK3CA mutations. **Oncotarget**, v. 9, n. 44, p. 27380-27396, Jun 8 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25270> >.
- 116 DE LINT, K. et al. Sensitizing Triple-Negative Breast Cancer to PI3K Inhibition by Cotargeting IGF1R. **Mol Cancer Ther**, v. 15, n. 7, p. 1545-56, Jul 2016. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-15-0865> >.

- 117 COSTA, R. L. B.; HAN, H. S.; GRADISHAR, W. J. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. **Breast Cancer Res Treat**, v. 169, n. 3, p. 397-406, Jun 2018. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4697-y> >.
- 118 CURIGLIANO, G. et al. Randomized phase II study of sunitinib versus standard of care for patients with previously treated advanced triple-negative breast cancer. **Breast**, v. 22, n. 5, p. 650-6, Oct 2013. ISSN 0960-9776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.037> >.
- 119 STONE, R. M. et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1614359>, 2017-06-23 2017. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1614359> >.
- 120 PARRALES, A.; IWAKUMA, T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. **Front Oncol**, v. 5, 2015. ISSN 2234-943X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2015.00288> >.
- 121 SYNNOTT, N. C. et al. Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? **Int J Cancer**, v. 140, n. 1, p. 234-246, Jan 1 2017. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.30425> >.
- 122 HAN, B. et al. FOXC1-induced non-canonical WNT5A-MMP7 signaling regulates invasiveness in triple-negative breast cancer. **Oncogene**, Dec 18 2017. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-017-0021-2> >.
- 123 KHALED, W. T. et al. BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells. **Nat Commun**, v. 6, p. 5987, 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6987> >.
- 124 OWCZAREK, T. B. et al. Galactosylceramide affects tumorigenic and metastatic properties of breast cancer cells as an anti-apoptotic molecule. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84191, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084191> >.
- 125 BROHEE, L. et al. Lipin-1 regulates cancer cell phenotype and is a potential target to potentiate rapamycin treatment. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11264-80, May 10 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3595> >.
- 126 SALGADO, R. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Ann Oncol**, v. 26, n. 2, p. 259-71, Feb 2015. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdu450> >.

- 127 ONO, M. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 132, n. 3, p. 793-805, Apr 2012. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1554-7> >.
- 128 BAXEVANIS, C. N. et al. Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Cancer**, v. 74, n. 4, p. 1275-82, Aug 15 1994. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 129 RATHORE, A. S. et al. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. **Indian J Med Res**, v. 140, n. 3, p. 361-9, Sep 2014. ISSN 0971-5916 (Print)0971-5916. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 130 LIU, S. et al. CD8 + lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 2, 2012-03-15 2012. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3148> >.
- 131 MAHMOUD, S. M. et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 15, p. 1949-55, May 20 2011. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.30.5037> >.
- 132 KIM, S. T. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. **Am J Clin Oncol**, v. 36, n. 3, p. 224-31, Jun 2013. ISSN 0277-3732. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/COC.0b013e3182467d90> >.
- 133 SEO, A. N. et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. **Br J Cancer**, v. 109, n. 10, p. 2705-13, Nov 12 2013. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.634> >.
- 134 KARN, T. et al. Homogeneous datasets of triple negative breast cancers enable the identification of novel prognostic and predictive signatures. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28403, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028403> >.
- 135 CASCIONE, L. et al. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55910, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055910> >.

- 136 KOMATSU, M. et al. Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis. **Int J Oncol**, v. 42, n. 2, p. 478-506, Feb 2013. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1744> >.
- 137 AL-EJEH, F. et al. Meta-analysis of the global gene expression profile of triple-negative breast cancer identifies genes for the prognostication and treatment of aggressive breast cancer. **Oncogenesis**, v. 3, n. 4, 2014-04-01 2014. ISSN false. Disponível em: < <http://www.nature.com/oncsis/journal/v3/n4/full/oncsis201414a.html> >.
- 138 HE, J. et al. Molecular Features of Triple Negative Breast Cancer: Microarray Evidence and Further Integrated Analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129842, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129842> >.
- 139 PACHECO-VELAZQUEZ, S. C. et al. Identification of a metabolic and canonical biomarker signature in Mexican HR+/HER2-, triple positive and triple-negative breast cancer patients. **Int J Oncol**, v. 45, n. 6, p. 2549-59, Dec 2014. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2014.2676> >.
- 140 GARCIA-VAZQUEZ, R. et al. A microRNA signature associated with pathological complete response to novel neoadjuvant therapy regimen in triple-negative breast cancer. **Tumour Biol**, v. 39, n. 6, p. 1010428317702899, Jun 2017. ISSN 1010-4283. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1010428317702899> >.
- 141 UVA, P. et al. miRNA-135b Contributes to Triple Negative Breast Cancer Molecular Heterogeneity: Different Expression Profile in Basal-like Versus non-Basal-like Phenotypes. In: (Ed.). **Int J Med Sci**, v.15, 2018. p.536-48. ISBN 1449-1907 (Electronic).

GU

ANEXO I

Principales genes reportados de investigaciones que analizan el perfil de expresión génica de CMTN. CMTN: cáncer de mama triple negativo; CMnTN: cáncer de mama no triple negativo.

Autor	Observación	Principales genes	Objetivo de firma	Diseño de experimento	
				Característica de la muestra	Comparación
Rody, 2011 ⁶¹	16 metagenes: fenotipo basal, señalización de receptor de andrógenos, diversas células inmunes, estroma, Claudina CD24, marcadores de células sanguíneas y adipocitos, inflamación y angiogénesis (VEGF).	EPHB3, GABRP, AR, FOXA1, IgG, TCR, LCK, ITK, HLA-DR, -DM, -DP, -DQ, HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, OAS1, OAS2, OAS3, MX1, Decorina, Osteonectina, Fibronectina. COL5A1, CLDN3, CLDN4, CD24, ELF3, BUB1, CDC2, STK6, BIRC5, TOP2A, HBA1, HBA2, HBB, FABP4, PLIN, ADIPOQ, ADH1B, VEGF, adrenomedulina, ANGPTL4, IL-8, CXCL1, CXCL2,	Pronóstico/ Blanco terapéutico	Base de datos pública	394 CMTN

			HOXA-4, -5, -7, -9, -10, -11, Histonas H2A, H2B			
Karn, 2011 ¹³⁴	2 firmas (26 genes principales)	genes	IL8, SCD, AQP3, SERPINE1, LYPDC1, PGK1, SEC23A, SNAPC1, SNF7DC2, SORT1, SPOCK, SRPX2, STC1, STMN2, SYNCRIP, TAX1BP3, TBC1D22B, TGFB2, TGFBI, THBS1, TIAM1, TLE6, TNFAIP1, TNFRSF10B, TRIM23, TSGA10, TXNDC9, U2AF1L1, ULBP2, UQCRC1, VLDLR, VMD2, WFDC1, WWTR1, ZA20D1, ZP2.	Pronóstico	Base de datos pública	394 CMTN
Cascione, 2013 ¹³⁵	2 firmas de microRNA y 4 subgrupos de genes.		miR-16, 155, 125b, 374 ^a y miR-16, 125b, 374 ^a , 374b, 421, 655, 497 Subgrupo molecular 1: SPP1, MMP9, MYB12, BIRC5, TOP2A, CDC2,CDKN2A. Subgrupo molecular 2: BCL2, EGF, ERBB4, AR, ESR1, IL1A, FGFR2, WT1, MYC, FGF2, AKT1, CASP10. Subgrupo molecular 3: MET,	Subclasificación/ Blanco terapéutico	Tejido embebido en parafina	CMTN vs Tejido adyacente y lesiones en nódulos linfáticos.

Komatsu,2013 ¹³⁶	322 genes desregulados	<p>L1CAM, IGFBP3. Subgrupo molecular 4: TIMP1, TIMP2, CDKN1A, CCND2, MAP3K8, CAV1, LAMB1, JUN, CEBPA.</p> <p>Principales genes sobreexpresados: UBE2C,S100P, UCHL1, PTTG1, UBE2T, SIX1, PRC1, TOP2A, HORMAD1, FABP5, ATAD2.</p> <p>Principales genes subexpresados: PIP, DNAL11, WIF1, SCUBE2, TBC1D9, TFF3, ERBB4, GATA3, MLPH. LAMAB, LTBP2, LIFR, LRP2, MASP2, MATN2, MGP, NTN4, NRG1, PTHLH, PI15, PLAT, PDGFA, PTN, PIGR, PIP, SCGB1D1, SCGB1D2, SCGB3A1, SEMA3G, STC2, THSD4, TFF3.</p>	Blanco terapéutico	Tejido fresco	CMTN vs células ductales epiteliales
Al-ejeh, 2014 ¹³⁷	8 genes	<p>MAPT, MYB, MELK, MCM10, CENPA, EXO1, TTK and KIF2C.</p>	Pronóstico/ Blancos terapéuticos	Meta-análisis	CMTN vs CMnTN

GU

Khaled, 2015 ¹²³	1 gen	BCL11A	Blanco terapéutico	Base de datos pública	CMTN vs CMnTN
He, 2015 ¹³⁸	3 genes	DUSP1 y FOXA1. DUSP1	Blancos terapéuticos	Base de datos pública	CMTN vs CMnTN
Pacheco, 2014 ¹³⁹	4 genes	HIF-1α + c-MYC + 2OGDH + E-cadherina	Pronóstico	Tejido fresco	CMTN vs CMnTN vs Tejido normal
García Vazquez, 2017 ¹⁴⁰	11 microRNA	miR-30a, miR-9-3p, miR-770 y miR-143-5p	Pronóstico	Tejido embebido en parafina	10 CMTN
Uva, 2018 ¹⁴¹	1 microRNA	135b	Pronóstico	Tejido embebido en parafina	102 CMTN

A New Gene Expression Signature for Triple-Negative Breast Cancer Using Frozen Fresh Tissue before Neoadjuvant Chemotherapy

Sandra K Santuario-Facio,^{1,7*} Servando Cardona-Huerta,^{2*} Yadira X Perez-Paramo,³ Victor Trevino,⁴ Francisco Hernandez-Cabrera,⁵ Augusto Rojas-Martinez,^{1,7} Grecia Uscanga-Perales,⁶ Jorge L Martinez-Rodriguez,^{2,8} Lizeth Martinez-Jacobo,⁶ Gerardo Padilla-Rivas,⁶ Gerardo Muñoz-Maldonado,⁹ Juan Francisco Gonzalez-Guerrero,¹⁰ Javier Valero-Gomez,² Ana L Vazquez-Guerrero,² Herminia G Martinez-Rodriguez,⁶ Alvaro Barboza-Quintana,² Oral [Reducir el documento](#) Raquel Garza-Guajardo,¹¹ and Rocio Ortiz-Lopez^{1,7}

¹Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ²Tecnologico de Monterrey, Hospital San Jose, Centro de Cancer de Mama, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ³Pharmaceutical Sciences Department, College of Pharmacy, Washington State University, Spokane, Washington, United States of America; ⁴Tecnológico de Monterrey, Escuela Nacional de Medicina, Grupo de Investigación en Bioinformática, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ⁵Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Facultad de Ciencias Fisico Matematicas, Centro Investigación en Ciencias Fisico Matemáticas, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ⁶Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ⁷Tecnologico de Monterrey, Escuela Nacional de Medicina, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ⁸Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, Centro Universitario Contra el Cancer, Servicio de Oncología, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ⁹Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, Servicio de Cirugia General, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ¹⁰Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, Centro Universitario Contra el Cancer, Servicio de Oncología, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; and ¹¹Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, Servicio de Anatomia Patologica y Citopatologia, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype of breast cancer tumors. Comparisons between TNBC and non-triple-negative breast cancer (nTNBC) may help to differentiate key components involved in TNBC neoplasms. The purpose of the study was to analyze the expression profile of TNBC versus nTNBC tumors in a homogeneous population from northeastern Mexico. A prospective study of 50 patients (25 TNBC and 25 nTNBC) was conducted. Clinic parameters were equally distributed for TNBC and nTNBC: age at diagnosis (51 versus 47 years, $p = 0.1$), glucose level (107 mg/dl versus 104 mg/dl, $p = 0.64$), and body mass index (28 versus 29, $p = 0.14$). Core biopsies were collected for histopathological diagnosis and gene expression analysis. Total RNA was isolated and expression profiling was performed. Forty genes showed differential expression pattern in TNBC tumors. Among these, nine overexpressed genes (*PRKX/PRKY*, *UGT8*, *HMGAT1*, *LPIN1*, *HAPLN3*, *FAM171A1*, *BCL11A1A*, *FOXC1*, and *ANKRD11*), and one underexpressed gene (*ANX9*) are involved in general metabolism. Based on this biochemical peculiarity and the overexpression of *BCL11A* and *FOXC1* (involved in tumor growth and metastasis, respectively), we validated by quantitative polymerase chain reaction the expression profiles of seven genes out of the signature. In this report, a new gene signature for TNBC is proposed. To our knowledge, this is the first TNBC signature that describes genes involved in general metabolism. The findings may be pertinent for Mexican patients and require evaluation in other ethnic groups and populations.

Online address: <http://www.molmed.org>
doi: 10.2119/molmed.2016.00257

*SKS-F and SC-H should be considered as co-first authors, as both contributed equally to this manuscript.

Address correspondence to Rocio Ortiz-Lopez, Tecnológico de Monterrey, Escuela Nacional de Medicina. CITES 3er Piso. Av. I. Morones Prieto 3000 Poniente. Los Doctores. 64710 Monterrey, N.L. MEXICO. Telephone: + 52 81 8888 2000. Email: rortiz@itesm.mx
Submitted December 17, 2016; Accepted for Publication April 17, 2017; Published Online (www.molmed.org) May 4, 2017.



INTRODUCTION

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a breast cancer (BC) subtype characterized by aggressive behavior (1,2), a characteristic immunohistochemistry (IHC) with negative pattern for estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Since TNBC lacks targeted therapies, treatment options are limited to nonselected chemotherapy (3). These tumors represent 12–17% of all BCs, and predominantly affect premenopausal women (<50 years). It is recognized that TNBC is more frequent in African American and Hispanic women belonging to low-income groups with increased hormonal exposure and obesity (4,5). These characteristics merge as potential etiologic factors influencing the tumor's nature.

Mexico is a country with a high prevalence of obesity, where women 40–59 years old have an average body mass index (BMI) >30 kg/m² (6). The BC rate in Mexico is also increasing, becoming the primary cause of diagnosed cancer nowadays (7,8). The association between obesity and the risk of BC in postmenopausal women has been consistently observed in epidemiological studies (9,10). Regardless, most studies of premenopausal women have not found a similar relationship between BC and obesity. The prognosis for obese pre- and postmenopausal BC patients is substantially worse. Increasing evidence suggests that such associations may be related to sex hormones, insulin, and certain adipokines (10,11). Most of the studies have evaluated European-American Caucasian women. Investigations in African American and Hispanic women with BC are particularly important due to higher TNBC prevalence and health disparities in these groups.

General BC gene expression profiles have been useful to investigate tumor profiles and to define prognosis and therapy. These studies have discovered genes associated with different tumor subtypes and their outcomes (12,13). Several gene expression profile analyses

have also been proposed for TNBC to identify biomarkers and targets for personalized therapy (2,14–17). Despite some progress, large heterogeneity in the gene profiles has been noticed in studies for TNBC, and there is a lack of a useful gene signature for this tumor subtype (1,14,17–21).

The purpose of the study was to define a distinctive gene signature for TNBC using a homogeneous population from northeastern Mexico, which will be useful in characterizing biological pathways involved in TNBC. To our knowledge, this is the first report describing a differential gene signature for TNBC.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population and Tumor Tissue Samples

The study was approved by the Ethics Committee of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon (No. B111-005), in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained from all patients participating in this study. A total of 149 biopsy samples were collected prospectively (from July 2011 to October 2014), with suspicious diagnosis (clinical, radiological, or both) of BC (tumor >2 cm, palpable ipsilateral lymph nodes, or ulceration). Out of 149 collected biopsies, 29 were pathologically diagnosed as TNBC (19.5%). In all, 27 TNBC samples were selected for inclusion in this study based on whole RNA quantity and quality. An additional 27 samples diagnosed as nTNBC were paired to the TNBC samples per clinical stage and were used in the expression profile analysis comparing TNBC versus nTNBC. The study design is illustrated in Figure 1.

Tumor Sample Collection and RNA Isolation

Ultrasound-guided core biopsies were obtained using a 12 Fr gauge biopsy needle (Bard®). Six to eight core samples were obtained from each patient. Four core samples were used for histopathological analysis, including hematoxylin

and eosin and IHC (PR/ER/HER2, Ki67, and p63). Two or three core samples were preserved in RNAlater solution for gene expression analysis (microarrays and quantitative polymerase chain reaction [qPCR] validation).

RNA extraction from biopsies was done using RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA), which allowed for obtaining high-quality RNA in small tissue biopsies. RNA quality was assessed by capillary electrophoresis using the Experion™ Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). RNA concentration was determined by NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Microarrays Analysis (Expression Profiles)

From the selected RNA, sample processing, microarray hybridization, and gene expression analysis were conducted using the GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The hybridization mixture was prepared and applied to the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix), measuring >43,000 transcripts representing >20,000 human genes. Washing and scanning processes were realized in the Fluidics Station 400 and GeneChip Scanner 3000 7G, respectively, and preliminary data analysis was completed using Microarray Suite software version 5.0.0.032.

Microarray Data Processing

Normalization was performed using robust microarray analysis and quantile normalization. Four samples showed poor quality in microarray data and were removed from the analysis. The analysis was performed using 50 patients. Probes whose mean expression (log scale) was <4 (in logarithm scale resulting from robust microarray analysis) were removed. Molecular classification was done using the PAM50 algorithm (22).

Gene expression signature between 25 TNBC and 25 nTNBC was performed using *t* test and Kolmogorov test, with a

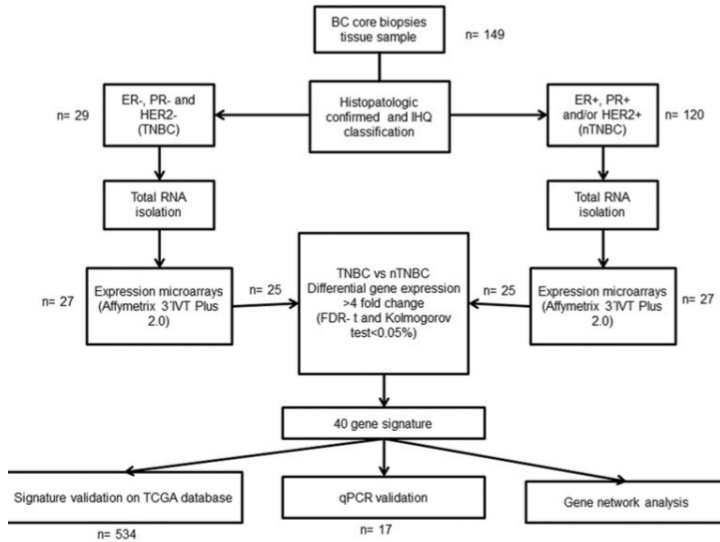


figure 1. Study design. This diagram shows sampling and workflow of experiments and analysis of data.

multiple comparison correction using the false discovery rate (FDR) method (23). We considered as positive those probes having significant p values in both tests (FDR t and Kolmogorov test $<0.05\%$). These analyses were performed in R software package (24).

Signature Validation on the Cancer Genome Atlas Database

The Cancer Genome Atlas Database (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov/>), located at SurvExpress (25), contains clinical and genetic information on 17,814 genes in 534 tissue samples. This database was used to compare TNBC versus nTNBC expression profiles and to evaluate the matching with the 40 gene expression signatures found in our study. Statistical analysis was replicated in TCGA to compare profiles between TNBC and nTNBC patients from this study. All TCGA data and figures were accessed, analyzed, and generated using R language. All TCGA data included in this manuscript agree with the TCGA publication guidelines.

Gene Network

An analysis of gene network was generated using GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>) (26) to find a relationship between genes of our signature. GeneMANIA used a very large set of functional association data, including protein and genetic interactions, pathways, coexpression, colocalization, and protein domain similarity.

Real-Time qPCR Validation

To validate microarray data, seven genes were selected: six overexpressed (*HMGAI*, *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXCI*, *LPINI*, and *UGT8*) and one underexpressed (*ANXA9*). Expression analysis of these genes, including one endogenous control (*GRAMD1A*), was assessed using predesigned hydrolysis probes (*HMGAI*: Hs.PT.58.38699366; *FOXCI*: Hs00559473_s1; *LPINI*: Hs00299515_m1; *UGT8*: Hs00409961_m1; *ANKRD11*: Hs00946580_m1; *BCL11A*: Hs01093197_m1; *ANXA9*: Hs.PT.58.1414783; and *GRAMD1A*: Hs.PT.5840681431) (Thermo-Fisher Scientific and IDT). Total RNA samples used for microarrays assays were analyzed by

qPCR using the Lightcycler 480 instrument (Roche). C_t mean for each gene was used for dC_t (problem minus endogenous). The 2^{-dC_t} analysis was done using calculated dC_t for all genes. To compare gene expression of TNBC versus nTNBC groups, the relative expression 2^{-dC_t} was evaluated from qPCR data of all genes (*HMGAI*, *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXCI*, *LPINI*, *UGT8*, and *ANXA9*) after normalization with *GRAMD1A*. Two sample Kolmogorov-Smirnov tests were used in both datasets, since the number of samples was distinct in each group and in unknown distributions. Moreover, the Kolmogorov-Smirnov test is sensitive to shape, position, and dispersion behavior of distributions to determine whether two independent samples belong to the same group (homogeneity test), or whether they have one statistical significant difference. We used $p < 0.05$ to establish this difference. The results of expression values are represented in box plots for microarray and qPCR data. OriginPro software (version 9.2, OriginLab, Northampton, MA, USA) was used for statistical data analysis.

All supplementary materials are available online at www.molmed.org.

RESULTS

Patients

A total of 149 core biopsies were prospectively collected. Out of 149, 29 tumors were diagnosed as TNBC (19.5%). From the 29 TNBC samples, RNA quality for microarray was obtained in 27 biopsies. Paired nTNBC samples were selected according to clinical stage. Clinicopathological characteristics were similar in TNBC versus nTNBC patients (Table 1). Age at diagnosis, high BMI (obese or overweight), and glucose levels (>100 mg/dl) were similar in both groups.

Molecular Classification Using PAM50

According to immunohistochemistry (IHC) analysis, out of 25 TNBC patient samples, 18 (72%) were basal-like subtype, 5 (20%) were normal-like subtype, and

Table 1. Patient and tumor characteristics.

	All patients, n = 54		TNBC, n = 25		nTNBC, n = 25		P value
Age at diagnosis (years)	49	26–71	51	39–71	47	26–61	0.1 ^e
Body mass index (kg/m ²)	28.7	20.7–40.1	27.58	20.78–38.01	29.31	21.83 α 39.65	0.14 ^e
<25	9	17%	4	16%	4	16%	0.67 ^f
≥25	38	70%	17	68%	19	76%	0.75 ^f
Menopause status							
Pre	27	50%	12	48%	13	52%	1 ^f
Post	27	50%	13	52%	12	48%	1 ^f
Background cancer ^a							
Yes	26	48%	14	56%	10	40%	0.4 ^f
No	28	52%	11	44%	15	60%	0.4 ^f
Diabetes mellitus ^b							
Yes	6	11%	5	20%	1	4%	0.2 ^f
No	48	89%	20	80%	24	96%	0.2 ^f
Glucose levels (mg/dl)	104.84	82–193	106.62	88–183	103.67	82–193	0.64 ^e
Number of children ^c							
Nulliparous	4	7%	1	4%	3	12%	0.6 ^f
1–2	16	30%	8	32%	7	28%	1 ^f
>3	33	61%	16	64%	15	60%	1
Lactation ^d							
Yes	22	41%	10	40%	11	44%	1 ^f
No	15	28%	8	32%	6	25%	0.75 ^f
Smoking							
Yes	8	15%	2	8%	5	20%	0.42 ^f
No	45	83%	22	88%	20	80%	0.7 ^f
TNM							
T1	1	2%	0	0%	1	4%	1 ^f
T2	25	46%	12	48%	11	44%	1 ^f
T3	16	30%	8	32%	6	25%	0.75 ^f
T4	11	20%	4	16%	7	28%	0.75 ^f
N0	8	15%	3	12%	5	20%	0.5 ^f
N1	32	59%	14	56%	16	64%	0.77 ^f
N2	12	22%	6	24%	4	16%	0.72 ^f
N3	2	4%	2	8%	0	0%	0.47 ^f
M0	54	100%	25	100%	25	100%	1 ^f
Clinical stage							
I	1	2%	0	0%	1	2%	1 ^f
II	25	46%	12	48%	12	48%	0.78 ^f
III	28	52%	13	52%	12	48%	1 ^f

^aAt least one relative (first, second, or third grade).^bConfirmed at BC diagnosis.^cNumber of pregnancies.^dAt least 6 months.^eT test, confidence level at 95%.^fZ test, confidence level at 95%.

2 (8%) were HER2 subtype, based on molecular subtypes (Figure 2).

TNBC Expression Profile

To identify a TNBC signature, 27 TNBC and 27 nTNBC biopsy expression profiles

were compared. After normalization of the microarray expression performance, 25 samples from each group met the adequate sample quality for data analysis.

A supervised classification was applied based on TNBC versus nTNBC according

to IHC status. Data analysis for 50 patients showed 49 differentially expressed probes (Supplementary Table S1) corresponding to 40 gene signatures with FDR < 0.0005. A heat map for these 40 genes was generated, representing their relative

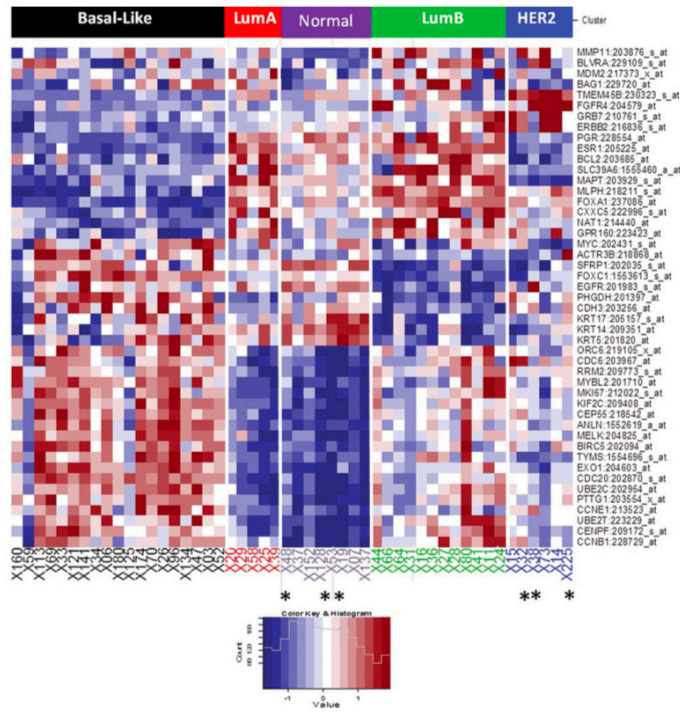


Figure 2. Molecular classification using PAM50 algorithm. Heat map from 50 samples (TNBC and nTNBC). Five different molecular subtypes are at the top of the heat map. Blue represents low gene expression, while red represents high gene expression. In the heat map, each column is for a different patient and each row is for a gene. Asterisk (*) represents TNBC samples according to IHQ analysis that are not in the basal-like subtype.

expression values (Z score = -1.5 to 1.5) (Figure 3A). The upper left side shows the group of nine overexpressed genes (*FOXCl*, *PRKX/PRKY*, *UGT8*, *BCL11A*, *HMGAl*, *LPIN1*, *FAM171A1*, *HAPLN3*, and *ANKRD11*). Conversely, there are 31 underexpressed genes in TNBC at the bottom left side. The center of the heat map shows a not quite defined area shared by four TNBC and five nTNBC patients with an undifferentiated expression pattern.

External Database Validation

To compare our results against other databases, a differential expression

analysis of TNBC versus nTNBC tumors was done using the TCGA database. Sample data from this database were selected and classified as TNBC or nTNBC (using expression data ER, PR, and HER2). The analysis was performed using two approaches. In the first one, we used the TCGA gene expression database and compared TNBC versus nTNBC. We obtained 87 gene signatures with high significance ($q < 1e-40$) (Supplementary Figure S1), among which only nine (*ERBB4*, *DNAJC12*, *TBC1D9*, *MLPH*, *ANXA9*, *NAT1*, *BCAS1*, *TEF1*, and *BCL11A*) overlapped our signature

(Figure 3B). The TCGA gene expression database contains only 33 genes from the 40 genes in our signature. As a second approach, we compared the differential expression of TNBC versus nTNBC using only these 33 genes. This second analysis showed that the genes had similar behavior (overexpressed or underexpressed) that they had in our signature (Supplementary Figure S2), with a smaller statistical significance ($p < 1e-8$).

Gene Network

Figure 4 shows the networking of the 40 genes included in our TNBC signature. In this gene network, the main functions are related to chromatin (red) or phosphatidylcholine (blue) biosynthetic process (26). Table 2 shows the main functions of the networked processes including the genes of the signature. In this, the biosynthetic and metabolic processes concerning phosphatidylcholine have the lowest FDR (1.83e-4 and 8.71e-3).

Real-Time qPCR Validation

Validation by qPCR was performed in 35 of the 50 samples analyzed by microarray (17 nTNBC and 17 TNBC) due to remaining amounts of RNA. A comparison between microarray expression and 2^{ct} qPCR levels (after normalization with *GRAMD1A* gene) demonstrates similar expression values for all genes (*HMGAl*, *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXCl*, *LPIN1*, *UGT8*, and *ANXA9*) (Figure 5). qPCR expression levels (A) are higher than those observed in the microarray expression analysis ($p < 0.05$) (B). Remarkable overexpression of *FOXCl*, *UGT8*, and *BCL11A* in TNBC is observed by qPCR, which is followed by expression levels of *LPIN1*, *ANKRD11*, *ANXA9*, and *HMGAl*. This clearly differs with the gene expression levels displayed by nTNBC samples. *GRAMD1A* was used as a normalizing gene, based on the low variability observed in all samples tested by the microarray analysis. *GAPDH* and *BACTIN* showed high variability among samples.

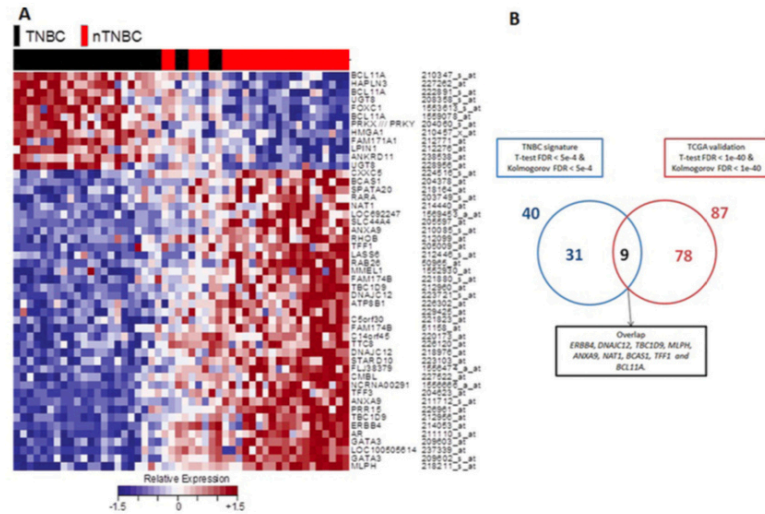


Figure 3. TNBC signature. (A) The heat map shows 49 differentially expressed probes (corresponding to 40 genes) in TNBC versus nTNBC. At the bottom of the figure is a color code that shows expression intensity (Z score). Blue represents low gene expression, red high gene expression. At the top of the figure is a color code for TNBC (black) and nTNBC (red) patients. In the heat map, each column is for a patient and each row is for a single probe. The right side of the heat map shows official symbol gene and probe identification. (B) Venn diagram of TNBC signature and TCGA validation. Blue circle represents 40 genes of our TNBC signature. Red circle represents 87 genes from TCGA data. Overlap of both circles (blue and red) represents nine genes that are present in both sample data using same analysis.

DISCUSSION

Molecular characterization of BC by gene expression profiling (gene signature) has positively influenced the diagnosis, prognosis, and therapies for this tumor, having a clear impact on the disease-free survival and quality of life of affected patients. These developments have paved the way for the translation of molecular tests to the clinical care of oncologic patients (12,13).

Regardless of advances in the molecular biology of BC, TNBC, an aggressive form of this neoplasm, remains undecipherable to current molecular tests, and patients are still in need of rational therapies. After several efforts, there are no gene expression profiles available to characterize TNBC, because studies with this purpose have demonstrated heterogeneous and nonconclusive results (2,14-17). This heterogeneity may result from differences in study design (i.e.,

group comparisons as TNBC versus normal breast tissue), data expression sets (i.e., microarray data from fresh tissue versus public tumor-expression databases), social stratifications by factors like ethnicity and income status, and so on. These studies were valuable to define sets of genes participating in tumorigenesis. They have demonstrated involvement of common pathways related to cell differentiation, epithelial mesenchymal transition (EMT), immune function, androgen receptor (AR) pathways, inflammation, and angiogenesis (1,14,17-21). However, the collection of genes identified in each study is different, and they are not useful to discriminate TNBC from nTNBC (1,14,17-21). Thus, the search for a useful gene signature for TNBC continues.

The purpose of this study was to identify a gene signature for TNBC with hallmark genes profiling this tumor subtype. To achieve this, we decided to compare

TNBC against the rest of BC subtypes (nTNBC). Emphasis was considered in the selection of samples. Our study population (TNBC and nTNBC) was composed of therapy-naïve women with BC who came from the same geographical region, sharing similar sociodemographic and clinical-pathological characteristics. The sampling process was the same for all patients, and biopsied tumors were >2 cm and/or had angiolymphatic invasion.

Gene expression profiles were assessed in tumor samples of 50 northeastern Mexican women. Sample collection was performed consecutively (n = 149) until we reached the TNBC population for this study. Subsequently, nTNBC samples were paired according to clinical stage. We observed a higher TNBC prevalence (19.5%) than reported for Caucasian women (10-13%) (5). Contrastingly, this prevalence is lower than that reported for the central Mexican population (23%)

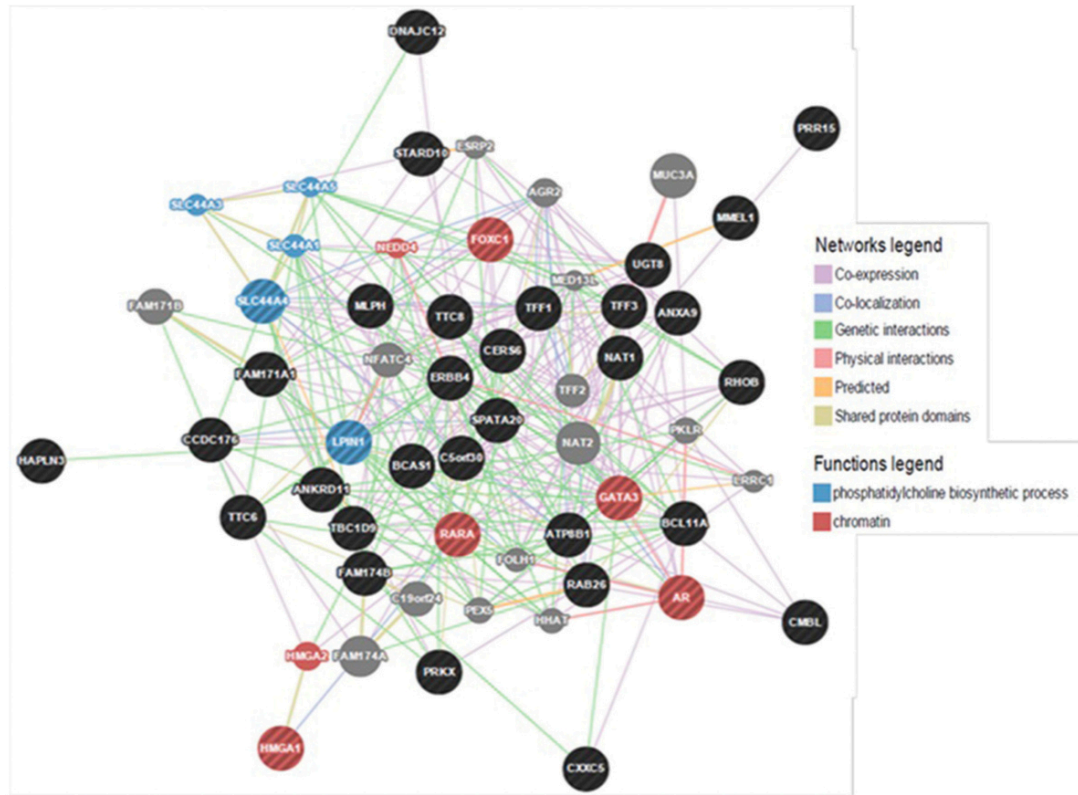


Figure 4. TNBC signature's gene network. The left side represents the gene network from the TNBC signature. Each black circle signifies a gene from the TNBC signature, while gray ones symbolize other genes not included in TNBC signatures. Lines denote a relationship between circles (genes), and line thickness correlates to relationship intensity. The right side shows color codes for lines that connect circles (genes) and functions of some genes from the gene network. Main functions are in blue (phosphatidylcholine biosynthetic process) and red (chromatin).

(27). Other similarities that caught our attention were age at cancer diagnosis, BMI (patients were overweight or obese), and glucose levels in both groups. This allowed us to pair patients with homogeneous clinical characteristics, differing only by tumor subtype (nTNBC or TNBC). We consider this crucial for identifying an intrinsic signature between these two groups of tumors.

BC classification was performed according to IHQ and microarray analysis.

IHQ was the first criterion for tumor classification. However, molecular classification by PAM50 displayed a different BC subtype in six tumor samples (Figure 2). Four of these were originally classified as TNBC by IHQ, but as a different BC subtype by the microarray analysis. The two remaining samples were reclassified inside the nTNBC group. Interestingly, these six samples are located at the center of the heat map for our gene signature (Figure 3A), implying the

heterogeneity of these tumors, probably containing a mixture of cancer clones representing different BC subtypes.

The signature described here is defined by overexpression of nine genes (*FOXC1*, *PRKX/PRKY*, *UGT8*, *BCL11A*, *HMGAI*, *LPIN1*, *FAM171A1*, *HAPLN3*, and *ANKRD11*) and downregulation of an additional 31 genes. Some of these deregulated genes are clearly involved in tumor pathways. Genes like *HMGAI*, *FOXC1*, and *BCL11A* have been inde-

Table 2. Gene network.

Feature	FDR	Genes in network	Genes in genome
Phosphatidylcholine biosynthetic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i>	1.83e-04	5	25
Phosphatidylcholine metabolic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i>	8.71e-03	5	60
Organic hydroxy compound biosynthetic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i> <i>GATA3</i>	1.11e-02	6	125
Ethanolamine-containing compound metabolic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i>	1.11e-02	5	74
Chromatin <i>FOXC1</i> <i>GATA3</i> <i>RARA</i> <i>AR</i> <i>HMGAI</i>	1.11e-02	7	212
Cellular amine metabolic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i> <i>GATA3</i>	2.87e-02	6	171
Chromatin DNA binding <i>RARA</i> <i>FOXC1</i>	2.87e-02	3	15
Amine metabolic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i> <i>GATA3</i>	2.87e-02	6	177
Alcohol biosynthetic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i>	2.87e-02	5	101
Cellular biogenic amine metabolic process <i>SLC44A4</i> <i>LPIN1</i>	3.97e-02	5	113

pendently studied and considered of clinical utility for TNBC as diagnostic and metastatic biomarkers, and some have been considered as potential therapeutic targets. For example, upregulation of *FOXC1* promotes tumor growth, EMT, and metastatic behavior (28). *BCL11A* overexpression affects p53-mediated apoptosis and plays a key role in TNBC (16). On the contrary, downregulation of *NATI*, which codifies for the n-acetyl transferase 1, is implied in the signature. *NATI* has been reported as underreg-

ulated in breast tumors and associated with tamoxifen resistance. In TNBC cells, downregulation of this gene is associated with overexpression of *SNAIL* and downregulation of N-cadherin and β -catenin, which regulate the EMT behavior (29).

Most interestingly, several of the overregulated and downregulated genes from this signature are involved in the metabolism of lipids. Some of these metabolic abnormalities may suggest some peculiarities of the biology and poor

prognosis of TNBC, which have been independently tied to aggressive BC. For example, upregulation of *HMGAI* is associated with insulin resistance and metabolic syndrome, with increased levels of cholesterol and triglycerides and low levels of high-density lipoprotein (30–32). This gene is observed as overexpressed in breast cancer, particularly in TNBC and its metastases (33). *LPIN1* codes for an enzyme directly involved in the synthesis of triglycerides and phospholipids. This gene is crucial for the homeostasis of the endoplasmic reticulum and membrane biogenesis. Recently, it has been demonstrated that overexpression of this gene is critical for TNBC cell survival, and thus it is considered a poor prognosis marker. *LPIN1* is an attractive target for personalized cancer therapy (34). *UGT8* encodes for an enzyme involved in the synthesis of galactosyl-ceramides and sphingolipids (35). Upregulation of this gene increases the cell proliferative index and decreases apoptosis, favoring metastatic processes. In addition, overproduction of this enzyme increases resistance to doxorubicin (36). On the other hand, other genes are also involved in lipid metabolism and cancer in their underregulated state. An example is *LASS6*, which encodes for the ceramide synthase 6. This enzyme was recently implicated in EMT. Downregulation of this gene induces decreased autophagy and increased drug resistance (37). *STARD10* codifies for the StAR-related lipid transfer protein 10 (or PCTP-like protein), a phospholipid transfer protein. Downregulation of *STARD10* is associated with defective insulin secretion and has been considered a biomarker of TNBC aggression (38). *ATP8B1* gene encodes for the ATPase phospholipid transporting 8B1 enzyme, which translocates phospholipids from the outer to the inner bilayer membrane and is crucial in maintaining the cell lipid balance. Downregulation of this gene is observed in liver cholestasis and in liver and colorectal cancer (39). Finally, the *AR* gene encoding for the androgen receptor protein was also downregulated in the signature. This gene is overexpressed in some TNBC

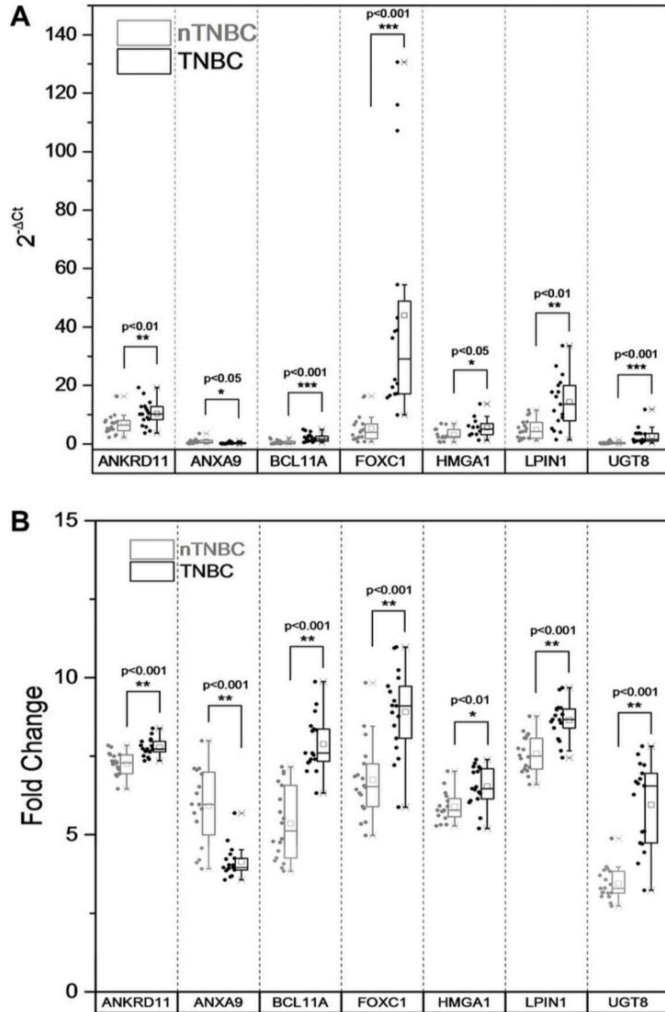


Figure 5. Real-time qPCR validation. Black and gray color show box plots for TNBC (black) and nTNBC (gray). (A) qPCR data ($2^{-\Delta Ct}$ values) from *HMGA1*, *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXC1*, *LPIN1*, *UGT8*, and *ANXA9* genes (using *GRAMD1A* for normalization). (B) Microarray data (fold change) from *HMGA1*, *ANKRD11*, *BCL11A*, *FOXC1*, *LPIN1*, *UGT8*, and *ANXA9* genes (using *GRAMD1A* for normalization).

patients, making the protein a candidate for targeted therapy, but its prognostic role is not yet clear (40). Recently, down-regulation of *AR* has been associated with

diabetes mellitus in TNBC patients, and it has been suggested that hyperglycemia directly regulates *AR* levels. This observation is of interest for the present study, in

which several patients showed high glucose levels (20% were diabetic) and an increased average BMI. This study remarks on the implication of lipid metabolism in the physiopathology of TNBC and, to some extent, the possible implications of increased insulin resistance, overweight, and metabolic syndrome for this aggressive breast cancer subtype. However, further studies are required to understand these plausible associations.

As mentioned above, previous reports analyzed global profiles for TNBC. However, the methodological approach is different in all of them. Kreike *et al.* compared TNBC frozen fresh tissues versus nTNBC data available from public databases (1). The androgen receptor gene (*AR*) is the only gene shared with our signature. Al-ejeh *et al.* performed an *in silico* expression profile comparison for TNBC versus nTNBC using public databases. They selected eight genes, two of them involved in the estrogen receptor pathway (*MAPT* and *MYB*) and six in chromosomal instability (*MELK*, *MCM10*, *CENPA*, *EXO1*, *TTK*, and *KIF2C*). None of these eight genes were identified in our signature (29). Rody *et al.* studied publicly available TNBC expression data to evaluate 5-year recurrence-free survival. Sixteen genes from the metagene analysis were differentially expressed. *AR* is again the only gene that matches our signature (2). Cascione *et al.* analyzed profiles of mRNA and microRNAs for TNBC paraffin-embedded tissues, comparing tumor- and nontumor-adjacent tissue to evaluate cancer survival. They identified genes related to overall survival and distant disease-free survival (17). Interestingly, *ERBB4* and *AR* genes were underexpressed, which are also underexpressed in our signature. Karn *et al.* selected TNBC data from public databases and identified a predicted signature of 264 genes not described in previous signatures, none of which match our study (20). Komatsu *et al.* described 301 overexpressed and 321 underexpressed genes in 30 TNBC and 13 normal ductal epithelial cells, all isolated by single-cell microdissection. They found

subexpression of *TBC1D9*, *TF3*, *ERBB4*, *GATA3*, and *MLPH*, which also matches this study (14).

These reports summarize the heterogeneity of the samples, the data, and the different approaches used to define gene signatures for TNBC. However, these studies define some underexpressed genes that were also discovered in our signature.

Considering the epidemiologic characteristics and the genetic background of our analyzed population, we decided to verify whether the signature obtained in this study was consistent in other populations. To achieve this, we looked for differences in TNBC versus nTNBC in microarray gene expression datasets stored in the TCGA. This comparison showed an overlap of nine genes (*ERBB4*, *DNAJC12*, *TBC1D9*, *MLPH*, *ANXA9*, *NAT1*, *BCAS1*, *TF3*, and *BCL11A*) with our signature. Of these, eight were underexpressed and one overexpressed. These nine genes could represent general pathways of carcinogenesis in TNBC, while the rest (31 nonoverlapping genes) could represent dysfunctional metabolism in this study (high BMI and glucose levels), probably affecting carcinogenic pathways. Still, the findings described in this article may be pertinent for Mexican patients and require evaluation in other ethnic groups and populations.

CONCLUSION

This study describes a genomic signature of 40 genes useful to discriminate TNBC, few of them independently associated with TNBC by other researchers. Interestingly, some of the genes in our signature are involved in metabolic processes related to fats and carbohydrates. A comparison of TNBC versus nTNBC in the TCGA database revealed a match of only nine genes with our signature. Thus, these genes should have important implications for the TNBC phenotype. To our knowledge, this is the first TNBC signature describing genes involved in general metabolism. However, the biological significance and molecular interactions should be further researched to

determine the intrinsic pathophysiology of this BC subtype.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CONACYT-Mexico through an approved grant (SALUD-CONACYT-2011-C01-162301). We are very grateful to the personnel of the Unidad de Genómica, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León for their technical assistance. SKSF and YXPP had scholarships from CONACYT (CVU nos. 369726 and 217104, respectively).

DISCLOSURE

The authors declare they have no competing interests as defined by *Molecular Medicine*, or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

REFERENCES

- Kreike B, et al. (2007) Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 9:R65.
- Rody A, et al. (2011) A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 13:R97.
- Hudis CA, Gianni L. (2011) Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist.* 16 Suppl1:1–11.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer.* 109:1721–8.
- Carey LA, et al. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 295:2492–502.
- Barquera S, Campos-Nonato I, Hernandez-Barera L, Pedrosa A, Rivera-Dommarco JA. (2013) [Prevalence of obesity in Mexican adults 2000–2012]. *Salud publica de Mexico.* 55 Suppl2:S151–60.
- de la Vara-Salazar E, Suarez-Lopez L, Angeles-Llerenas A, Torres-Mejia G, Lazcano-Ponce E. (2011) [Breast cancer mortality trends in Mexico, 1980–2009]. *Salud publica de Mexico.* 53:385393.
- Knaut FM, et al. (2009) [Breast cancer in Mexico: an urgent priority]. *Salud publica de Mexico.* 51 Suppl2:s335–44.
- Swisher A, et al. (2015) Exercise and dietary advice intervention for survivors of triple-negative

breast cancer: effects on body fat, physical function, quality of life, and adipokine profile. *Support Care Cancer.* 23:2995–3003.

- Coughlin SS, Smith SA. (2015) The Insulin-like Growth Factor Axis, Adipokines, Physical Activity, and Obesity in Relation to Breast Cancer Incidence and Recurrence. *Cancer Clin. Oncol.* 4:24–31.
- Seo BR, et al. (2015) Obesity-dependent changes in interstitial ECM mechanics promote breast tumorigenesis. *Sci. Transl. Med.* 7:301ra130.
- van de Vijver MJ, et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347:1999–2009.
- Paik S, et al. (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 351:2817–26.
- Komatsu M, et al. (2013) Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis. *Int. J. Oncol.* 42:478–506.
- Al-Ejeh F, et al. (2014) Meta-analysis of the global gene expression profile of triple-negative breast cancer identifies genes for the prognostication and treatment of aggressive breast cancer. *Oncogenesis.* 3:e100.
- Khaled WT, et al. (2015) BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells. *Nat. Commun.* 6:5987.
- Cascione L, et al. (2013) Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One.* 8:e55910.
- Lehmann BD, et al. (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121:2750–67.
- Hennesy BT, et al. (2009) Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 69:4116–24.
- Karn T, et al. (2011) Homogeneous datasets of triple negative breast cancers enable the identification of novel prognostic and predictive signatures. *PLoS One.* 6:e28403.
- Tchou J, et al. (2012) Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med. Genomics.* 5:39.
- Parker JS, et al. (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 27:1160–7.
- Benjamini Y, Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 57:289–300.
- R Core Team. (2014) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Aguirre-Gamboa R, et al. (2013) SurvExpress: An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis. *PLoS One.* 8:e74250.

26. Warde-Farley D, et al. (2010) The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 38:W214–20.
27. Lara-Medina F, et al. (2011) Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer.* 117:3658–69.
28. Tkocz D, et al. (2012) BRCA1 and GATA3 co-repress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers. *Oncogene.* 31:3667–78.
29. Smid M, et al. (2006) Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J. Clin. Oncol.* 24:2261–7.
30. Chiefari E, et al. (2013) A polymorphism of HMGA1 is associated with increased risk of metabolic syndrome and related components. *Sci. Rep.* 3:1491.
31. Foti D, et al. (2005) Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat. Med.* 11:765–73.
32. Pullinger CR, et al. (2014) Evidence that an HMGA1 gene variant associates with type 2 diabetes, body mass index, and high-density lipoprotein cholesterol in a Hispanic-American population. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 12:25–30.
33. Shah SN, et al. (2013) HMGA1: a master regulator of tumor progression in triple-negative breast cancer cells. *PLoS One.* 8:e63419.
34. He J, et al. (2017) Lipin-1 regulation of phospholipid synthesis maintains endoplasmic reticulum homeostasis and is critical for triple-negative breast cancer cell survival. *FASEB J.* 31:1–12.
35. Sprong H, et al. (1998) UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 273:25880–88.
36. Owczarek TB, et al. (2013) Galactosylceramide affects tumorigenic and metastatic properties of breast cancer cells as an anti-apoptotic molecule. *PLoS One.* 8:e84191.
37. Schiffmann S, et al. (2009) Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis.* 30:745–52.
38. Murphy NC, et al. (2010) Loss of STARD10 expression identifies a group of poor prognosis breast cancers independent of HER2/Neu and triple negative status. *Int. J. Cancer.* 126:1445–53.
39. Eldai H, et al. (2013) Novel genes associated with colorectal cancer are revealed by high resolution cytogenetic analysis in a patient specific manner. *PLoS One.* 8:e76251.
40. Rahim B, O'Regan R. (2017) AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers.* 9:21.

Cite this article as: Santuario-Facio SK, et al. (2017) A new gene expression signature for triple-negative breast cancer using frozen fresh tissue before neoadjuvant chemotherapy. *Mol. Med.* 23:101–111.