



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN GENES DE REPARACIÓN DEL DNA EN PACIENTES
MEXICANAS CON TUMORES DE MAMA TRIPLE NEGATIVOS Y SU EFECTO EN LA
QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ERNESTO ARTURO ROJAS JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FELIPE VACA PANIAGUA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR:
DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, MARZO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio 13 de la Unidad de Investigación en Biomedicina y en el Laboratorio Nacional en Salud, Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala bajo la dirección del Dr. Felipe Vaca Paniagua.

Durante el desarrollo del trabajo, Ernesto Arturo Rojas Jiménez fue becario CONACyT con el número de beca 287674. El proyecto recibió fondos de la partida UNAM PAPIIT IN219217 y el Fondo Sectorial CONACyT 272573.

Agradecimientos

Creo que como la gran mayoría, escribo esta parte de la tesis hasta el final, justo antes de subir el manuscrito de mi tesis para continuar con las vicisitudes de la burocracia para poder graduarme. Me sorprende mucho lo rápido que pueden cambiar las cosas a lo largo de un año, hace un año no hubiera creído el lugar donde estoy hoy. A pesar de que me es complicado escribir esto por miedo a sonar presuntuoso, creo que es importante que lo exprese, pues un logro tan grande como el que estoy viviendo fue algo que alcance gracias a todas las personas que me apoyaron y me impulsaron para llegar a donde estoy; esas personas que serán las que leerán esta tesis y que seguramente leerán este apartado -por que, si somos sinceros, esta es la primera parte que leemos de una tesis recién terminada-. Existieron muchas personas que siempre me extendieron ayuda en un consejo, una enseñanza o simplemente pasando tiempo conmigo, permitiendo atesorar las buenas experiencias y afrontar los momentos más incómodos, pero hay algunas personas a las que me gustaría darles una mención especial.

Mi mamá siempre me ha inspirado, fue la que me enseñó una de las cosas más importantes, tal vez no lo recuerda por que me lo enseñó cuando iba en la primaria; cuando un dibujo no quedaba exactamente como me gustaba, para mi se trataba de un fracaso y de algo que sería complicado de resolver, pero al verme tan triste se acercó y con unos solos trazos arreglo el dibujo y me dijo que no había cosa que no se pudiera resolver, que los fracasos sólo son oportunidades que podemos tomar para cambiar las cosas y mejorarlas, y que las cosas no siempre van a resultar como uno espera, pero no por eso significa que están mal, es necesario aprender a sacar el mejor partido de lo que tenemos. Muchas gracias mamá por siempre acompañarme y enseñarme tanto. Evidentemente además de mi mamá también me encuentro muy agradecido con mi familia tanto la que herede como la que escogí. A mi papá, Brígido, y a mis hermanos (Ramón y Rodrigo), que muy a su manera siempre me han acompañado. A Lucero que es la familia que he escogido y que ha sido paciente conmigo, y que me ha inspirado a trabajar más duro para poder ser tan bueno como ella, me ha inculcado su mantra “La disciplina es la llave del éxito” a veces me es complicado seguir ese mantra al pie de la letra, pero verte trabajar me inspira a no darme por vencido.

También me gustaría hacer una mención a todas las personas que conocí en el laboratorio, como dice la Dra Clara, a veces pasamos más tiempo ahí que en nuestras casas; y así fue como mis compañeros de trabajo y profesores se convirtieron en mis amigos. Les agradezco al Dr. Vaca que me dio la oportunidad de incursionar bajo su tutela en el mundo de la genómica, le agradezco mucho su trato horizontal, siempre nos dio un lugar y escuchó lo que tenía que decir; su entusiasmo por la ciencia su perseverancia ante las múltiples adversidades son una constante recordatorio de que hacemos esto por amor a la ciencia. La Dra. Clara le debo mucho, espero que lo metódico que se me ha contagiado de trabajar con usted perdure a lo largo de toda mi carrera. Pero no son los únicos bichos que espero haber sido contagiado, su gusto por la enseñanza y su incansable búsqueda por entender el sustento de las cosas espero también permanezcan en mí. No podría dejar de mencionar a todos mis amigos del laboratorio con lo que tuve oportunidad de convivir y aprender, de lo contrario recibiría muchas quejas, pero también quiero dejarlos plasmados para poder recordarlos en años posteriores cuando por nostalgia reabra las páginas de este manuscrito, los escribo en orden para que no piensen que tengo alguna predilección. La primera persona que me extendió su ayuda y me explico como hacer y cargar un gel de Agarosa fue Monserrat, después llegó Stef para decirle que no tocara mis tubos sin guantes, a Fernanda la pude conocer meses después cuando dejó de chicolear en los gises. A los más jóvenes Fernando a quien le falle en nunca explicarle los artículos de firmas mutacionales, Jimena, Sebastian y Mariel les agradezco mucho su amistad. A los que conocí al final fueron a Miguel y al Dr. Aldo y todos los integrantes del laboratorio, espero que años después cuando reabra las páginas, como decía antes, pueda llamarlas para ponerme al corriente con ustedes.

Por último quiero agradecer a la Universidad, en esta época de incertidumbre para la ciencia, me parece importante hacer esta última mención. La Universidad me dio mi carrera y mi posgrado, espero poder regresar lo mucho que dio mi escuela transmitiendo mis conocimientos y causando un impacto con mi labor científico.

Resumen

El cáncer de mama se clasifica hoy en día por la presencia o ausencia de dos receptores hormonales (estrógeno (ER) y progesterona (PR)) y el receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Estos receptores definen tres subtipos para las neoplasias mamarias: hormono-dependientes, HER2 positivos y triple negativos (CMTN). Los tumores triple negativo no tienen una característica particular que los identifique, en realidad, están agrupados por su ausencia en la expresión de receptores, pero la etiología y su desarrollo pueden demostrar una gran variedad de fenotipos, por eso los análisis moleculares son de vital importancia para entenderlos. En este estudio realizamos un perfil genómico exhaustivo a partir del exoma completo de 29 pacientes mexicanas con CMNT de largo seguimiento clínico (hasta 11 años) para identificar alteraciones genómicas asociadas con la neoplasia a través de la integración de análisis moleculares, incluyendo mutaciones y la composición y proporción de las firmas mutacionales, con la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la respuesta patológica completa (RpC).

Se detectaron 31 genes conductores con variantes patogénicas incluyendo a *TP53* en el 53% de las muestras, seguido por *BRCA1/2* en el 27%, *CDKN1B* en el 9%, *PIK3CA* en el 9% y *PTEN* en el 9%, y 16 firmas mutacionales operativas. Interesantemente, los tumores con mutaciones en *BRCA1/2* mostraron una tendencia a la sensibilidad a las sales de platino. Encontramos una asociación entre la deficiencia en los genes de reparación y vigilancia del DNA y el desenlace clínico. En todos los tumores analizados, hallamos una complejidad molecular heterogénea en cuanto a la composición alélica y los procesos mutacionales operativos, lo que dificulta la identificación de características moleculares con utilidad clínica.

Estos tumores mostraron una heterogeneidad molecular sustancial, que sumada al número de muestras analizadas en este estudio, impidió alcanzar asociaciones significativas entre las variables moleculares y el desenlace clínico. Sin embargo, nuestros hallazgos proveen información detallada sobre las alteraciones globales y particulares en el CMTN dentro de una población poco representada. Este estudio, el primero en su tipo en América Latina, contribuye a dilucidar de manera más amplia las alteraciones moleculares generales del CMTN, proporcionando información genómica precisa que ayudará a las investigaciones futuras en la

búsqueda del tratamiento más adecuado que proporcione una sobrevida y calidad de vida de estos pacientes.

Abstract

Breast cancer is nowadays classified by the presence or absence of two hormone receptors (estrogen (ER) and progesterone (PR)) and human epidermal growth receptor type 2 (HER2). These receptors define three subtypes for breast neoplasms: hormone-dependent, HER2-positive and triple-negative (TNBC). Triple-negative tumors do not have a particular characteristic that identifies them, in fact, they are grouped by their absence in receptor expression, but the etiology and their development can demonstrate a great variety of phenotypes, that is why molecular analyses are of vital importance to understand them. In this study we performed a comprehensive genomic profiling from the whole exome of 29 Mexican patients with TNBC with long clinical follow-up (up to 11 years) to identify genomic alterations associated with the neoplasm through the integration of molecular analyses, including mutations and the composition and proportion of mutational signatures, with overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and pathologic complete response (pCR).

Thirty-one driver genes with pathogenic variants were detected including *TP53* in 53% of samples, followed by *BRCA1/2* in 27%, *CDKN1B* in 9%, *PIK3CA* in 9% and *PTEN* in 9%, and 16 operational mutational signatures. Interestingly, tumors with *BRCA1/2* mutations showed a trend toward sensitivity to platinum salts. We found an association between deficiency in DNA repair and surveillance genes and clinical outcome. In all the tumors analyzed, we found heterogeneous molecular complexity in terms of allelic composition and operational mutational processes, making it difficult to identify molecular features with clinical utility.

These tumors showed substantial molecular heterogeneity, which, added to the number of samples analyzed in this study, prevented us from reaching significant associations between molecular variables and clinical outcome. Nevertheless, our findings provide detailed information on global and particular alterations in TNBC within an underrepresented population. This study, the first of its kind in Latin America, contributes to further elucidate the general molecular alterations in TNBC, providing accurate genomic information that will help future

research in the search for the most appropriate treatment to provide survival and quality of life for these patients.

Tabla de contenido

Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	9
1. Marco terico	10
Carcinogenesis	12
Panorama genético del cáncer	14
Rasgos biológicos del cáncer	16
Incidencia y mortalidad del CM	20
Características del CM	20
Cáncer de mama triple negativo (CMTN) y su heterogeneidad	24
Cáncer de mama en México	28
Firmas mutacionales	29
Antecedentes	29
Justificación	31
Pregunta de investigación	31
Hipótesis	32
2. Materiales y métodos	33
Criterios para la elegibilidad de los pacientes	33
Evaluación histológica	33
Extracción del ADN y preparación de la muestra	34
Análisis clínico-patológico	34
Preparación de bibliotecas genómicas	35
Análisis bioinformático y filtrado de variantes	35
Preprocesamiento	35
Identificación y análisis de variantes	
Identificación de variantes	36
Análisis de variantes	
Carga mutacional tumoral	36
Filtrado	37
Hotspots	37
Firmas mutacionales	37
Vías de señalización molecular	37
Análisis estadístico y de sobrevida	37
Comparación con otras cohortes y sus mutaciones accionables	37

3. Resultados	38
Características de los pacientes y los tumores	38
Sobrevida global y Respuesta patológica completa	41
Infiltrado linfocitario	42
Métricas de calidad de secuenciación y alineamiento	42
Carga mutacional	42
Panorama de las mutaciones conductoras	44
Firmas mutacionales	46
Vías de señalización	51
Panorama molecular en comparación con otras cohortes	52
Análisis de mutaciones accionables	54
4. Discusión	55
5. Conclusiones	63
6. Referencias	63

Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
Figura 1	Mapa de árbol de las principales causas de muerte para el año 2019	10
Figura 2	Incidencia y mortalidad en cada tipo de cáncer a nivel global y nacional	11
Figura 3	Rasgos biológicos del cáncer	16
Figura 4	Estructura de la glándula mamaria	21
Figura 5	Etiología del cáncer de mama y las características de cada subtipo	26
Figura 6	Probabilidad de Sobrevida Global	40
Figura 7	Carga mutacional tumoral	42
Figura 8	Asociación entre variables de desenlace clínico y el TMB	42
Figura 9	Composición alélica y características moleculares de las muestras de cáncer de mama triple negativo	43
Figura 10	Distribución genómica del tumor según el perfil de la firma mutacional	45
Figura 11	Probabilidad de supervivencia global de cada grupo de firmas mutacionales	46
Figura 12	Comparación entre el estado de la sobrevida global (alta y baja) según la proporción de firma	47
Figura 13	Correlación lineal entre las proporciones de firmas con mayor frecuencia en las muestras y las variables clínicas y moleculares	48
Figura 14	Asociación entre la proporción del umbral en las firmas según los grupos y el resultado clínico	49
Figura 15	Diferencias entre los grupos según el resultado clínico	50
Figura 16	Procesos biológicos globales enriquecidos en los tumores	51
Figura 17	Comparación con otras cohortes de tumores TN	52
Figura 18	Análisis de mutaciones accionables	53

Índice de Tablas

Tabla	Descripción	Página
Tabla 1	Criterios para el filtrado y clasificación de variables	35
Tabla 2	Características clínicas	38
Tabla 3	Tratamientos	39

1. Marco Teórico

El cáncer ha permanecido perenne a lo largo de la historia de la humanidad. El primer tipo del que se tiene una descripción, y la primera mención del cáncer de mama (CM), fue detallada en un documento egipcio que data del 1600 a.C., conocido como Papiro Edward Smith, algunos incluso aseveran que es una copia de un tratado médico que se remonta al año 3000 a.C. (Vargas et al., 2012), en cuyo caso sería contemporánea con y el inicio de la civilización Mesoamericana. Desde entonces, el cáncer de mama así como otros tipos, se conocen como enfermedades sin tratamiento y de gran letalidad (Vargas et al., 2012). A pesar de que el diagnóstico de cualquier tipo de neoplasia sugería un padecimiento sin remedio, no era una de las principales causas de muerte, mientras que las patologías infecciosas sí. Pasaron varios siglos para que la tecnología nos permitiera entender y tratarlas, y fue hasta mediados del siglo XX, cuando gracias a la comprensión de la dinámica de transmisión y el desarrollo de antibióticos, se duplicó la esperanza de vida, provocando una transición epidemiológica que convirtió a las afecciones crónico-degenerativas, como las cardiovasculares y el cáncer, en el nuevo problema de salud pública (Figura 1) (Mercer, 2018).

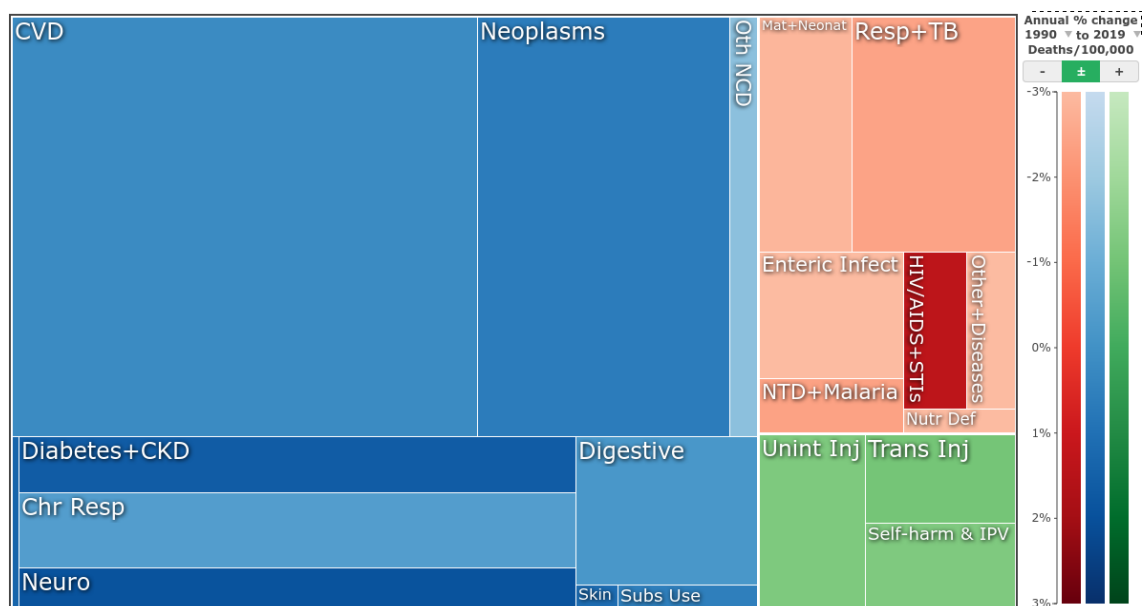


Figura 1. Representación (treemap) de las principales causas de muerte a nivel mundial para el año 2019. El tamaño del cuadro es proporcional al número de muertes por cada 100 mil habitantes. Las enfermedades se agrupan en: crónico-degenerativos (azul), infecciosas (rojo) y lesiones (verde). CVD: cardiovascular disease (enfermedades cardiovasculares), Oth NCD: other non-communicable diseases (otras enfermedades no transmisibles), CKD: chronic kidney diseases (enfermedades renales crónicas), Chr Resp: chronic respiratory diseases (enfermedades

respiratorias crónicas), Subs Use: substance use disorder (desorden de abuso de sustancias), Resp + TB: respiratory infections + tuberculosis (enfermedades respiratorias + tuberculosis, STIs: sexually transmitted infections (enfermedades de transmisión sexual), NTD: neglected tropical diseases (enfermedades tropicales desatendidas), Unint Inj: unintentional injuries (lesiones no intencionales), Trans Inj: transport injuries: lesiones de transporte, IPV: Interpersonal violence (violencia interpersonal). Tomado de The Lancet (<https://www.thelancet.com/gbd/gbd-compare-visualisation>).

Actualmente, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, lo que significa que una de cada seis muertes será por algún tipo de tumor maligno o por complicaciones derivadas del mismo (Sung et al., 2021). En México, esta enfermedad ocupa el tercer lugar como causa de muerte, después de las del corazón y la diabetes mellitus, las cuales ocupan el primer y segundo lugar, respectivamente (Población. Número de Habitantes, n.d.). De los 186,746 casos registrados al año 2018, el cáncer de mama representa el tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel nacional, es un 3.5% más que lo reportado a nivel mundial (Sung et al., 2021) (Figura 2). Con la creciente mortalidad por cáncer, su estudio se ha tornado de gran importancia, enfocando un gran esfuerzo humano y tecnológico en dilucidar desde su origen hasta su tratamiento.

En la presente tesis analizamos de manera global y minuciosa distintos componentes moleculares del CM, y en específico, del subtipo triple negativo (TN), con el objetivo de aportar información que nos ayude a comprender esta patología.

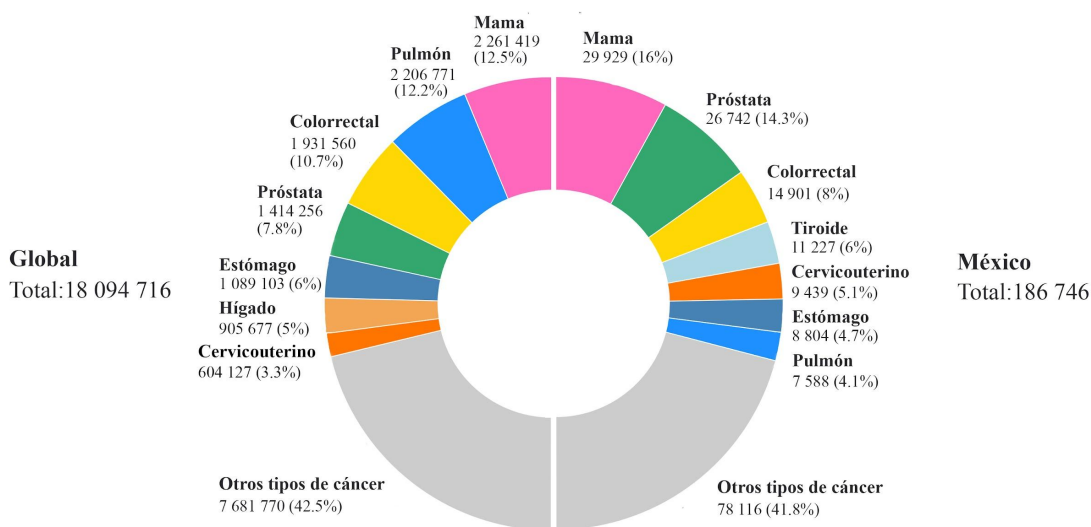


Figura 2. GLOBOCAN. Incidencia por tipo de cáncer a nivel global (izquierdo) y nacional (derecho).

Carcinogenesis

El cáncer está caracterizado por tener una reproducción descontrolada de células que alteran la arquitectura del parénquima y afectan la funcionalidad del órgano, irrumpiendo la homeostasis (Weinberg, 2014; Basanta & Anderson, 2017). En el año 1970, cuando Estados Unidos declaró la guerra contra el cáncer, los complicados mecanismos por los cuales esta enfermedad se origina y desarrolla eran totalmente desconocidos (Weinberg, 2014a), pero 50 años después los múltiples ensayos y descubrimientos tecnológicos han permitido avanzar en el entendimiento de los complejos procesos de la carcinogénesis.

Se pueden distinguir dos tipos de origen para el cáncer: uno hereditario, que provoca entre el 5 y el 10% de todos los tumores malignos, y otro esporádico, que es responsable del 90 al 95% restante (Sonnenschein & Soto, 2008). El cáncer hereditario fue identificado en 1866 por Pierre Paul Broca, quién lo describió en la familia de su esposa, la cual tenía un alta prevalencia de cáncer de mama, pues por cuatro generaciones padeció de este tipo de neoplasia (Van Der Groep et al., 2011). Después de 124 años, Mary-Claire King demostró a través de estudios de segregación, que la aparición temprana de tumores de mama en familias estaba relacionada con la alteración de un gen en el brazo largo del cromosoma 17. Cuatro años más tarde, tras diversos estudios de clonación y secuenciación de esta región, fueron reportadas la secuencia y localización del gen *BRCA1* (Hurst, 2014).

Aunque el cáncer hereditario corresponde al 10% de todas las neoplasias, las familias afectadas tienen una alta probabilidad de desarrollar en edades tempranas, tumores provocados por mutaciones hereditarias de baja frecuencia en la población, en genes como *BRCA1*, que supone un riesgo del 80% de padecer cáncer de mama antes de los 45 años de edad (Newman et al., 1988).

El cáncer esporádico es consecuencia de la interacción entre elementos ambientales, la exposición a carcinógenos endógenos o fallas intrínsecas en los mecanismos de replicación del DNA; dichas modificaciones acumulan variaciones en el DNA, promoviendo el proceso de

carcinogénesis (de Civetta & Civetta, 2011). Este proceso de acumulación de mutaciones es de larga evolución, provocando la aparición de la neoplasia a mayor edad -en comparación con el cáncer hereditario-, y con una amplia variedad de alteraciones en su etiología (Vogelstein et al., 2013; Tomasetti et al., 2017).

La tumorigénesis de los tumores hereditarios consiste en una serie de pasos de alta complejidad (Basanta & Anderson, 2017). Una de las primeras hipótesis que intento explicar este proceso fue Knudson, quien postuló en 1971 que la variante monoalélica heredada no era suficiente para provocar una neoplasia; una segunda variante debía afectar al alelo silvestre para provocar la supresión de la función del gen, fenómeno conocido como la pérdida de heterogeneidad (Anderson, 1992; Knudson, 1971), pero esto sólo explicaría el proceso en el caso de la interrupción o el mal funcionamiento de un gen y no de la ganancia de una función. Vogelstein posteriormente propuso un modelo secuencial de adquisición de mutaciones, a los que denominó “hits”, que se sumaban a las alteraciones previas durante la replicación de la célula afectada. La acumulación de siete hits, proceso que podría tomar de meses a décadas, finaliza en la malignización de la célula provocando la formación de tumores (Vogelstein & Kinzler, 1993). Las modificaciones adquiridas derivan en la ganancia o pérdida de señales secuenciales a modo de un modelo de múltiples pasos, donde las características que promueven el proceso de carcinogénesis son seleccionadas (Karakosta Agathi et al., 2005; Hanahan & Weinberg, 2011).

Estos “hits” o pasos pueden ser provocados por diversas agentes mutagénicos exógenos o endógenos que provocan diversos cambios en el DNA, que van desde el cambio de un nucleótido por otro hasta inserciones, deleciones, translocaciones e inversiones (Vogelstein et al., 2013). Una de las alteraciones que involucran grandes regiones del cromosoma son la ganancia y pérdida del número de copias de un gen que aumentan o disminuyen su expresión respectivamente (Macé et al., 2018). Más recientemente se han identificado los cambios epigenéticos, procesos mediante el cual la expresión de un gen cambia, pero sin alterar la secuencia del DNA (Deans & Maggert, 2015). Distintos mecanismos como la metilación, modificaciones postraduccionales de las histonas, la acción de RNAs no codificantes y los

cambios del estado topológico de la cromatina han sido estudiados en relación con el proceso de carcinogénesis (Flavahan et al., 2017).

Panorama genético del cáncer

A nivel global se han detectado un promedio de 8,572.8 mutaciones en los genomas de tumores malignos (Campbell et al., 2020), pero el intervalo es amplio. Algunos tipos de cáncer como la leucemia mieloide aguda en adultos tienen aproximadamente 13 mutaciones (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013), en contraste con el melanoma, del que se han reportado hasta 720 en promedio (Akbari et al., 2015). El tipo de variante que se presenta con mayor frecuencia son los del nucleótido único, en un 95%. En cambio, las deleciones e inserciones forman el 3% y el 2%, respectivamente (Campbell et al., 2020). Sería catastrófico para la viabilidad celular, incluso para las poblaciones normales si todas las variantes acumuladas en su genoma tuvieran un impacto funcional. Por ello, no todas los cambios genéticos -o mutaciones- tienen actividad biológica. Las alteraciones capaces de promover o preservar la evolución de una neoplasia han sido llamadas “*mutaciones conductoras*”, debido a que conducen el desarrollo tumoral, el resto son consideradas “*mutaciones pasajeras*”, es decir, son neutrales (Vogelstein et al., 2013). Las mutaciones conductoras pueden causar la ganancia o pérdida de la función para la proteína traducida por el gen afectado, lo cual repercute en el delicado engranaje de las vías de señalización en las que participa (Bauer et al., 2007; Joshi & Press, 2018). Estas vías pueden ser agrupadas de manera general en dos procesos celulares: ciclo celular y mantenimiento del genoma (Hanahan & Weinberg, 2011; Vogelstein et al., 2013). Los genes que alojan mutaciones conductoras son conocidos como “*genes conductores*”. Éstos genes han sido clasificados en genes supresores tumorales (TSG) y oncogenes (OG) (Vogelstein et al., 2013). Los genes que traducen proteínas para mecanismos en donde la pérdida de función suprime restricciones necesarias para el control de la proliferación o que impiden la correcta reparación de los errores del DNA han sido clasificados como TSG. En contraparte, los genes mutados que posibilitan la ganancia de una función y con esto aceleran la proliferación celular o el escape de la muerte celular, han sido catalogados como OG (Vogelstein, 2013). Distinguir entre TSG y OG puede ser una tarea sencilla, como en el caso de *TP53*, cuya falla en la funcionalidad afecta los procesos del ciclo celular, permitiendo la proliferación y el escape de la

apoptosis (Aubrey et al., 2016). Otro ejemplo es *KRAS*, que participa en la proliferación celular y con su ganancia de función promueve la multiplicación descontrolada de células (Haigis, 2017). Estos dos ejemplos son categorizados como TSG y OG, respectivamente. Por otro lado, existen casos donde la funcionalidad aún permanece ambigua para su clasificación, como son los genes *NOTCH1* y *GATA3* (Lobry et al., 2011; Takaku et al., 2015; Parmigiani et al., 2020). Es por ello que se han propuesto distintos métodos para poder catalogar la actividad de los genes en el cáncer. Un ejemplo es la regla 20/20, planteada por Vogelstein (Vogelstein et al., 2013). El método parte de la premisa que la mayoría de los TSG tendrán una disfunción que impedirá el correcto funcionamiento de la proteína traducida, mientras que los OG adquieren mecanismos de activación. Vogelstein propone que para clasificar los TSG, las mutaciones producirán en más del 20%, la pérdida de la función; y para un OG necesita que más del 20% de las mutaciones ocurran en la misma posición y que esta provoque un cambio en el residuo que traduce. Aunque es empírica, esta regla se ha sostenido a lo largo de los años.

Por otro lado, es de esperar que aunque los métodos pueden coincidir en muchos de los genes, también divergen en otros tantos. Vogelstein con su regla 20/20 propuso 125 genes conductores (Vogelstein et al., 2013), IntoGen, a su vez, tiene una lista de 514, identificados con métodos estadísticos (Martínez-Jiménez et al., 2020). A pesar de las diferencias que podrían existir entre las listas de genes conductores, hay algunos cuya alta prevalencia -entre todos los tipos de neoplasias-, los convierte en blancos atractivos de estudio para proponer hipótesis sobre el origen y tratamiento para el cáncer. Los primeros cinco genes afectados con mayor frecuencia en el cáncer son: *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF* y *LRP1B*. Estos son muy relevantes, ya que participan como intermediarios en distintas vías de señalización y son indispensables para la vida; tan sólo *TP53* actúa en 7 vías, desde donde regula el arresto celular, apoptosis, MAP-K, entre otras (Vogelstein et al., 2013; Aubrey et al., 2016; Haigis, 2017; Zaman et al., 2019; Chen et al., 2019; Arafeh & Samuels, 2019; Martínez-Jiménez et al., 2020).

Rasgos biológicos del cáncer

Como se comentó en el apartado de carcinogénesis, a través de la sucesión de múltiples pasos se adquieren mutaciones características o “*rasgos biológicos*” que permiten a las células convertirse en precursores de un tumor y eventualmente contribuyen en la malignización del mismo. Los genes alterados se suman con la complejidad de las distintas vías de señalización, con las presiones ambientales y la acción de distintas células normales que integran al tejido que hospeda al tumor o que son reclutadas y que componen el microambiente tumoral (Tabassum & Polyak, 2015). Con la finalidad de resumir y entender estos complicados circuitos Hanahan y Weinberg propusieron una lista de diez *rasgos biológicos* o “*hallmarks del cáncer*”. Su descripción permitió agrupar las distintas propiedades que le posibilitan a un tumor sobrevivir, proliferar y diseminarse (Hanahan & Weinberg, 2011): 1) *inestabilidad genómica y adquisición de mutación*, 2) *inflamación*, 3) *proliferación*, 4) *inmortalización celular*, 5) *evasión de supresores de crecimiento*, 6) *evasión de la respuesta inmunológica*, 7) *invasión y metástasis*, 8) *angiogénesis*, 9) *resistencia a la muerte celular* y 10) *regulación energética celular* (Fig 3).

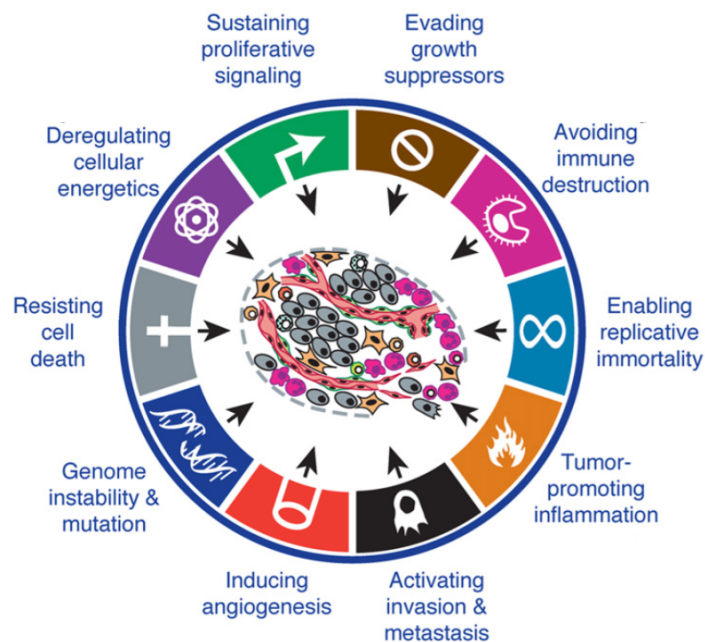


Figura 3. Hallmarks del cáncer. Modificado de Hanahan y Weinberg 2011.

Los primeros dos rasgos que mencionamos fomentan la adquisición del resto de los “hallmarks del cáncer” (Langie et al., 2015; Lin et al., 2016; Tijhuis et al., 2019). El primer evento es la *inestabilidad genómica*, que provoca mutaciones aleatorias y rearrreglos cromosómicos (Sonugür & Akbulut, 2019; Yao & Dai, 2014). La rápida acumulación de variantes aumenta la posibilidad de adquirir mutaciones patogénicas, mismas que pueden ser seleccionadas para el desarrollo de un tumor (Asatryan & Komarova, 2016). La pérdida de la función de genes que se encargan de la vigilancia o reparación del DNA o la inactivación o intercepción de moléculas mutagénicas pueden ser la etiología de la inestabilidad genómica (Asatryan & Komarova, 2016).

El segundo rasgo, la *inflamación*, es capaz de habilitar los “hallmarks del cáncer” (Colotta et al., 2009). Durante las primeras etapas de la enfermedad, la inflamación crónica deriva en una liberación persistente de quimiocinas proinflamatorias (Lin et al., 2016). La liberación de especies reactivas de oxígeno (Mittal et al., 2014) y el reclutamiento de distintas células que pueden conservar este estado, perpetúan la inestabilidad genómica a través del daño al DNA (Kidane et al., 2014; Kawanishi et al., 2017). Las células que componen al microambiente tumoral no sólo conservan el estado inflamatorio (Grivennikov et al., 2010), sino que también son capaces de fomentar la *angiogénesis* en tumores sólidos (Aguilar-Cazares et al., 2019), y el *escape a la muerte celular* (Grivennikov et al., 2010), rasgos que discutiremos más adelante.

Como mencionan Hanahan y Weinberg “la característica más fundamental de las células cancerosas es su capacidad para mantener una proliferación crónica” (Hanahan & Weinberg, 2011). Los rasgos que facilitan esto son el de la proliferación y la inmortalización celular. Las células tumorales tienen un amplio repertorio que les ayuda a sostener la multiplicación celular (Feitelson et al., 2015). Por un lado, la proliferación puede alterar la producción de señales autocrinas y paracrinas (Siriwardana et al., 2006; Tan et al., 2009; Rosen & Roarty, 2014), provocar disfunción de los circuitos de retroalimentación negativos que contrarrestan las señales de proliferación celular en condiciones normales (Hoesel & Schmid, 2013; Wu et al., 2020) e inducir la activación de receptores en ausencia de su ligando (Lyons et al., 2008; Guo et al., 2015; Du & Lovly, 2018).

Por otro lado, la *inmortalización de las células* tumorales está relacionada con la facultad de las células de preservar el tamaño de los telómeros (Jafri et al., 2016), la conservación de estas regiones cromosómicas evita que se desencadenen mecanismos de senescencia y apoptosis en las células (Maciejowski & Lange, 2017).

Para su mantenimiento, el tumor no sólo debe tener la habilidad de sostener las señales de proliferación celular, también es necesario que adquiera la capacidad para *evadir los supresores del crecimiento celular*. Éstos son regulados por las proteínas traducidas por genes supresores tumorales responsables de provocar arresto del ciclo celular, senescencia, apoptosis o necrosis de las células neoplásicas (Hanahan & Weinberg, 2011; Amin et al., 2015). La pérdida de función de estos mecanismos provoca una desregulación en los nodos centrales del ciclo celular, posibilitando a las células tumorales perpetuar su proliferación.

Además de la *evasión de los supresores de crecimiento celular*, los rasgos del cáncer también incluyen a la evasión de la muerte celular. La pérdida de función de genes supresores tumorales que controlan el ciclo celular (Pucci et al., 2000), al igual que el incremento de la expresión de reguladores anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL (Triscioglio et al., 2017) o de señales de sobrevivencia como Igf1/2 (M. Zhang et al., 2018; Yan et al., 2020), incluso mediante la baja expresión de factores pro-apoptóticos como Bax, Bim y PUMA (Ren et al., 2010; J. Zhang et al., 2016) son algunos de los mecanismos mediante los cuales las células tumorales evaden la muerte celular.

La *angiogénesis* es un proceso necesario para conservar nutrido el tejido tumoral, se logra mediante la producción de factores pro-angiogénicos como el VEGF (Lugano et al., 2020). El rápido desarrollo de los vasos sanguíneos sobre la ya desorganizada arquitectura celular permite la irrigación de la neoplasia, así como el retiro de desechos (Nishida et al., 2006). En contraparte, la ausencia de nuevos vasos por la falta de factores pro angiogénicos o la desorganizada *proliferación celular* provoca áreas de hipoxia (Muz et al., 2015).

La *reprogramación del metabolismo energético* se manifiesta principalmente, aunque no exclusivamente, en el uso de la glucólisis aeróbica, mecanismo que incluso en presencia de oxígeno es favorecido en el microambiente tumoral y que es conocido como el efecto Warburg y Cori (Carl Cori & Cori, 1925; Warburg et al., 1927; Liberti & Locasale, 2016). Por ser un proceso bioquímico menos eficiente (18 veces menos en comparación con la fosforilación oxidativa mitocondrial), es necesario compensar con un aumento en la glucólisis (Potter et al., 2016). La glucólisis aeróbica no sólo compensa el ambiente hipóxico en el que se desarrolla la célula tumoral, también sus productos intermedios pueden ser ocupados en varios vías de biosíntesis para producir nucleótidos y aminoácidos que facilitan la biosíntesis de macromoléculas necesarias para la mitosis celular (Liberti & Locasale, 2016).

El rasgo biológico que caracteriza la malignidad del cáncer, y que lo diferencia de los tumores benignos, es la capacidad para la *invasión y metástasis*. Este proceso es uno de los sistemas más complicados y menos entendidos hasta ahora. La metástasis depende de un cambio fenotípico conocido como la transición epitelio-mesénquima (Ribatti et al., 2020). Durante esta transición, las células sufren modificaciones que les permiten perder las uniones adherentes que las unen al parénquima, para posteriormente migrar a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos (Joyce & Pollard, 2009). La extravasación posibilita la llegada a otros tejidos donde pueden encontrar nichos apropiados para su colonización, y en otros casos, la célula provoca modificaciones en el tejido para adaptar el microambiente e impulsar el crecimiento en el nuevo sitio (Joyce & Pollard, 2009).

Por último, pero no menos importante, está el fenómeno de la *evasión del sistema inmunológico*. El sistema inmune puede actuar en beneficio o en contra del desarrollo tumoral. Como ya comentamos antes, la *inflamación* crónica puede fomentar distintos rasgos biológicos del cáncer, pero las células que componen al sistema inmune adaptativo, sobre todo las T citotóxicas son capaces de reconocer otras con daños en el DNA que provocan inestabilidad genética mediante la expresión de receptores de daño en las células tumorales. Este proceso es conocido como

inmunoedición (O'Donnell et al., 2018). Una vez reconocidas, las células inmunes pueden provocar la apoptosis o necrosis celular mediante la activación de caspasas o la destrucción con citotoxinas respectivamente (Schreiber et al., 2011). Sin embargo, los tumores han desarrollado mecanismos para la evasión de la respuesta inmunológica. Éste, les permite escapar de la vigilancia inmunológica, así como también promover respuestas proinflamatorias a través del reclutamiento de algunas células del sistema inmunológico o la producción de citocinas, promoviendo la inestabilidad genómica, la *angiogénesis* y la *proliferación celular* (Gonzalez et al., 2018).

Incidencia y mortalidad del CM

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) estimó más de dos millones de casos nuevos por año y 684 mil muertes durante el 2020. Justo después del cáncer de pulmón, el CM ocupa el segundo lugar en mortalidad, con 11.7% del total de casos de cáncer en el mundo; y es la principal causa de muerte por neoplasia en mujeres (Sung et al., 2021). Desde el 2006 en México, estos tumores son la primera causa de enfermedad por cáncer, (Soto-Perez-de-Celis & Chavarri-Guerra, 2016), y la tercera de muerte. La IARC estimó 27,283 casos nuevos y 6,884 muertes en el 2018, inclusive considerando ambos géneros (sólo el 1% de los tumores en hombres son CM); con un aumento nacional en la incidencia de 5.9% y en la mortalidad de 0.4% por año (Soto-Perez-de-Celis & Chavarri-Guerra, 2016; Sung et al., 2021).

Características del cáncer de mama

La glándula mamaria está compuesta por el parénquima, tejido encargado de la producción y transporte de la leche y el estroma que le da soporte al parénquima (Fig. 4 A.). El estroma está formado por tejido adiposo dispuesto sobre tejido fibroso conectivo (llamado ligamentos de Cooper). La unidad funcional de la mama está compuesta por los conductos y los alvéolos glandulares. Los primeros están formados por una bicapa de células epiteliales dispuestas sobre una membrana basal que contiene a las células troncales mamarias (Fig. 4 B.). Su función es llevar la leche producida en los lobulillos hasta el pezón.

La mama es una glándula expuesta a constantes cambios en su arquitectura, mediados por la expresión genética; principalmente durante cinco distintos períodos: 1) *el crecimiento fetal*, 2) *el crecimiento prepuberal*, 3) *la expansión puberal*, 4) *el embarazo* y 5) *la remodelación durante la lactancia*. La morfogénesis de los conductos se desarrolla durante el *crecimiento prepuberal* y la *expansión puberal*, y es controlado por los estrógenos (Fig. 4 C.). Los lobulillos, estructuras funcionales encargadas de la producción de leche durante la lactancia, se forman en la terminación de los ductos, a partir de la capa luminal, y alcanzan su máximo desarrollo durante el *embarazo* y la *lactancia* gracias a estímulos mediados por estrógenos, progesterona y prolactina (Hassiotou & Geddes, 2013). La constante remodelación en la arquitectura de la glándula, sujeta al continuo cambio hormonal, se traduce de manera directa en el tejido, donde el 80% de los tumores se localizan en los conductos mamarios, del 15 al 20% en los lobulillos y del 5 al 10% en el estroma (McDaniel et al., 2006; McCready et al., 2010).

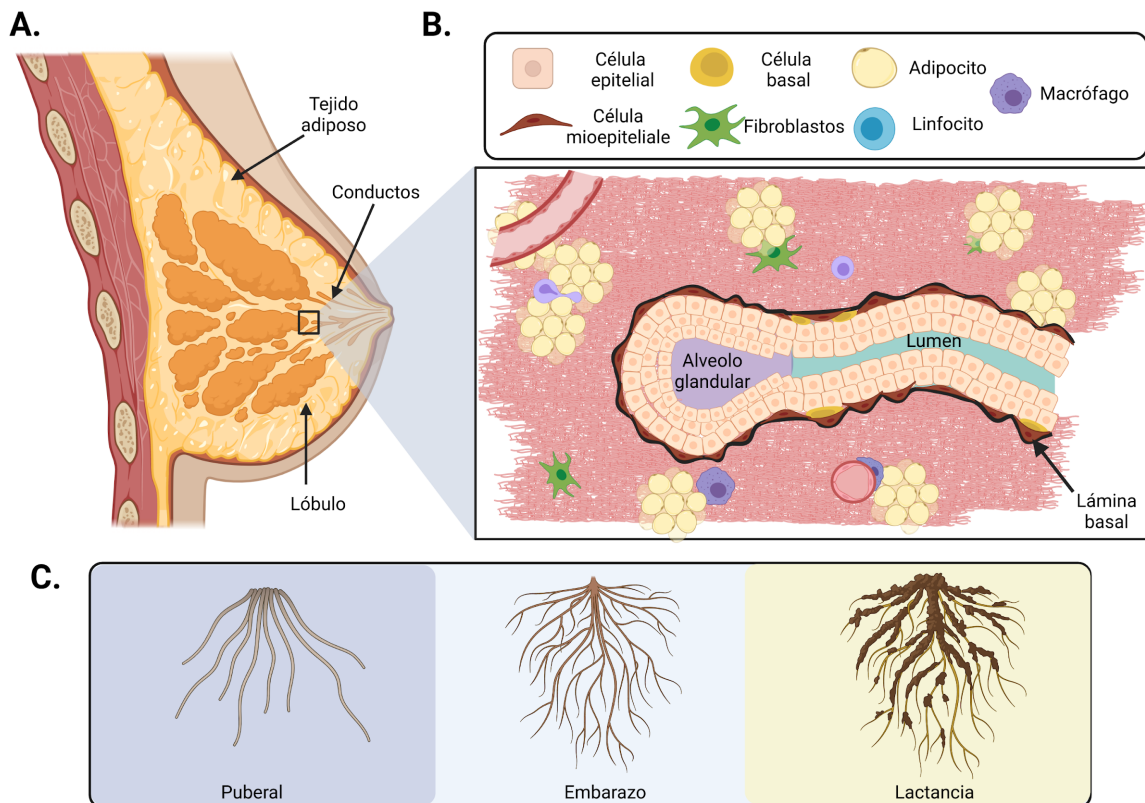


Figura 4. Estructura de la glándula mamaria. A. Esquema macroscópico. B. Estructura celular de los componentes de la glándula mamaria. C. progresión y remodelación de la glándula mamaria durante la pubertad, el embarazo y la lactancia.

Aunque de manera previa ya se conocía la importancia de los estrógenos para el desarrollo del cáncer de mama, no fue hasta 1969 que se descubrieron los receptores estrogénicos (Jensen & De Sombre, 1969), los cuales, al igual que el receptor de progesterona y el de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2) favorecen la proliferación celular mediante su amplificación o mutación, aprovechando la maquinaria de remodelación del tejido en las distintas etapas fisiológicas. El CM se clasifica hoy en día por la presencia o ausencia de estos dos receptores hormonales (estrógeno (ER) y progesterona (PR)) y HER2. El estatus de los receptores hormonales y el HER2 define tres subtipos para las neoplasias mamarias: 1) hormono dependientes (25 - 65%), 2) HER2 positivos (10 - 15%) y —para aquellos tumores con ausencia de los tres— 3) triple negativos (CMTN) (10-20%) (Lara-Medina et al., 2011; X. Li et al., 2017). Esta clasificación es el estándar de oro y determina las opciones de tratamiento de cada paciente (Gradishar et al., 2019).

El subtipo hormonodependiente está caracterizado por la expresión de los dos receptores intracelulares de estrógeno y progesterona, que al recibir su ligando hormonal correspondiente, activan factores de transcripción que a su vez activan las ciclinas CDK4 y CDK6 que fosforilan a RB1, permitiendo que se libere al factor de transcripción E2F y activando así los mecanismos de proliferación (Pandey et al., 2019).

Los estrógenos también promueven la proliferación a través de una vía independiente de ligando, en la cual propicia la fosforilación de AKT, proteína que a su vez activa la vía de las MAPK y aumenta la proliferación celular (Atanaskova et al., 2002; Salazar et al., 2016).

Los receptores hormonales tienen efectos indirectos en la comunicación con HER2, ya que la expresión tanto de los receptores hormonales y HER2 coexisten en los subtipos Luminal A y Luminal B, aunque aún no se conoce bien su relación (Bauer et al., 2007; Joshi & Press, 2018). El subtipo HER2 depende principalmente de las señales proliferativas causadas por el aumento

del número de copias del gen que lo codifica (*ERBB2*), induciendo un incremento en la expresión de este receptor transmembranal, que hasta este momento permanece huérfano, es decir no tiene ningún ligando (Serova et al., 2019). Tras su homodimerización inicia la vía de las MAPK, provocando la proliferación celular (Joshi & Press, 2018).

Finalmente, el subtipo triple negativo se define por la ausencia de expresión o sobreexpresión de los tres receptores mencionados, por lo que esta categoría agrupa al resto de los tumores. Es por ello que este subtipo de cáncer de mama presenta una gran diversidad de atributos moleculares y clínicos (Bianchini et al., 2016).

Existen dos principales causas asociadas con la carcinogénesis de la mama: 1) la falla del mecanismo de reparación del DNA por recombinación homóloga (RH) y 2) la mutación de *TP53*. Las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son los genes más estudiados en el cáncer de mama, son actores principales de la reparación del DNA por recombinación homóloga, las variantes en dichos genes pueden ser provocadas por mutaciones hereditarias (presentes en un 10%), somáticas, o la metilación de los promotores de dichos genes (especialmente *BRCA1* metilado en un 30% en los tumores TN); aunque el déficit de la reparación por recombinación homóloga, también se ha vinculado con las alteraciones en otros genes que se pueden encontrar río abajo o río arriba de la vía de este mecanismo de reparación, como son *PALB2* o *ATM* (lo que se conoce como el fenotipo BRCAness). El déficit en este mecanismo de reparación provoca inestabilidad genómica.

La segunda etiología del cáncer de mama triple negativo y HER2+ son las alteraciones en *TP53* (mutado en hasta en un 75% y 85% respectivamente). Algunos estudios han asociado el déficit del RH con la adquisición de mutaciones en *TP53*. Las alteraciones en dicho gen provocan disminución de la reparación del DNA, arresto celular, apoptosis y un aumento en la angiogénesis, las cuales son importantes “*hallmarks del cáncer*” (Foulkes et al., 2010; Malorni et al., 2012; Lord & Ashworth, 2016; Spugnesi et al., 2016) (Figura 5).

Actualmente se ha creado un clasificador a nivel molecular que agrupa a los tumores mamarios de acuerdo a la expresión génica. Se distinguieron cinco diferentes subtipos: 1) luminal A, 2) luminal B, 3) HER2+, 4) normal y 5) basal. Tanto el luminal A como el luminal B están caracterizados por la expresión de *KRT5* (queratina 5), *KRT17* (queratina 17), *ITGB4* (integrina β 4), laminina y receptores de estrógeno, presente en un 87% para el luminal A y 72% para el luminal B. Estos son clasificados, la mayoría de las veces, como tumores hormonodependientes. El tercer subtipo es el HER2+, que como su nombre lo indica, está caracterizado por la sobreexpresión de *ERBB2*, dentro de este grupo, cuando se realizó el diagnóstico por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, 51% se diagnosticaron como HER2+, 15% corresponde a tumores ER/HER2+, 16 % a ER+/HER2- y 18% a TN. La cuarta categoría son las neoplasias de tipo normal también conocido como el subtipo intrínseco, se ha identificado como el subtipo con mejor respuesta y pronóstico. Por último el tipo basal, coincide con el 80% de los tumores triple negativos, mientras que el otro 20% está compuesto por otros subtipos con predominio de HER2+, expresa genes característicos de las células basales/mioepiteliales: *KRT5*, *KRT14* y *KRT17* (que corresponden a la citoqueratina 5, 14 y 17) y una alta expresión de claudina (Perou et al., 2000); Bianchini et al., 2016).

Cáncer de mama triple negativo (CMTN) y su heterogeneidad

La presencia de los receptores que diferencia a los tumores que no son triple negativos (No-TN) (homonodependientes y HER2 positivos) de los triple negativos, representa una vulnerabilidad que permitió el desarrollo de tratamientos dirigidos como sería el caso de los inhibidores de los receptores y de la aromatasa o moduladores selectivos de receptores hormonales, mejorando de manera significativa la respuesta a la quimioterapia y la supervivencia global de las pacientes (X. Li et al., 2017). Estas ventajas fueron útiles sólo para los subtipos con expresión de receptores, dejando a la quimioterapia como la única opción de terapia sistémica aprobada hasta este momento, en los tumores triple negativos (Gradishar et al., 2019).

En el principio de la oncología como especialidad, algunas quimioterapias fueron descubiertas por serendipia, como es el gas mostaza que provoca depleción de los elementos sanguíneos, y como consecuencia podría funcionar como manejo para distintos tipos de linfoma y leucemia

(Hajdu & Vadmal, 2013). Aunque alentadores en un principio, algunos de los investigadores obtuvieron resultados desfavorables, por lo que se concluyó que no todos los tratamientos funcionan de la misma manera en todos los pacientes, incluyendo aquellos con el mismo tipo de neoplasia.

Al tratar los tumores triple negativos como si se fueran un subtipo homogéneo se crean desventajas evidentes en la sobrevida global, que es 20% menor a los tres años para pacientes que no lograron la respuesta patológica completa (RpC) en comparación con los no triple negativos con enfermedad residual (No-TN 94%, CMTN: 68%) (Liedtke et al., 2008). En los tumores triple negativo se utiliza la RpC como marcador subrogado para valorar la sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante. La RpC se define como: “La ausencia de todos los signos de cáncer en muestras de tejido obtenido durante una cirugía o una biopsia después del tratamiento o la quimioterapia” (Definition of Pathologic Complete Response - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute, n.d.). En presencia de una RpC, la probabilidad de una sobrevida mayor a cinco años aumenta (Liedtke et al., 2008), pero esto sólo se logra en el 35% de los pacientes (Von Minckwitz et al., 2014). Al contrario, los casos con enfermedad residual tienen mayor recurrencia y menor sobrevida global, alcanzando menos de cinco años en el 50% de los casos (Liedtke et al., 2008). Paradójicamente, aunque en el CMTN existe una RpC dos veces mayor con respecto a los subtipos no triple negativos (22% vs 11%, respectivamente), la sobrevida global es menor (Liedtke et al., 2008); diferencia que aumenta con un mayor estadio tumoral (X. Li et al., 2017). Esta paradoja es consecuencia de la falta de características fenotípicas específicas del CMTN que permitan definir de manera más precisa a este subtipo. Globalmente la gran variedad de fenotipos expresados en este tipo de tumor presentan una tasa de proliferación más alta, con respecto a los otros subtipos, un grado histológico superior, un nivel variable de infiltrado linfocitario tumoral y un amplio repertorio de variantes genéticas; características que vuelven a estos tumores más agresivos (Foulkes et al., 2010) (Figura 5).

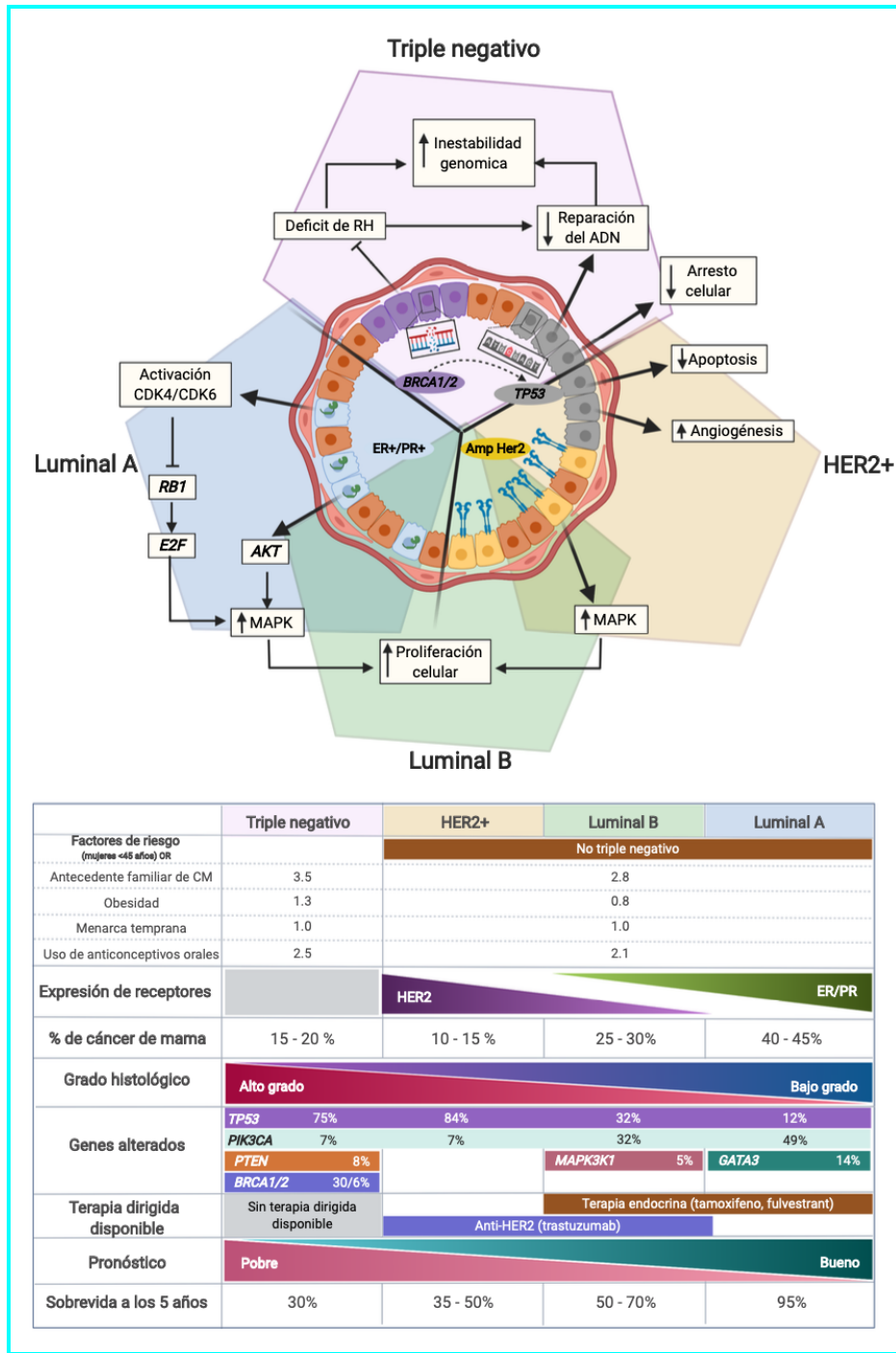


Figura 5. Etiología del cáncer de mama y las características de cada subtipo. En la figura superior se describen en un esquema algunos de los mecanismos etiológicos del cáncer de mama; mientras que los tumores hormonodependientes dependen de la presencia de los receptores (ER, PR y HER2) para activar los mecanismos de proliferación, los tumores triple negativos dependen del fallo de mecanismos del ciclo celular como la reparación del DNA el fallo en proteínas como TP53 que puede provocar el arresto del ciclo celular. En el panel inferior se observan las características clínicas de los tres subtipos tumorales del cáncer de mama (subdividiendo al subtipo luminal en luminal A y B), así como los genes de mayor expresión.

La complejidad fenotípica del CMTN es consecuencia de una elevada heterogeneidad molecular, en los niveles de expresión génica y a nivel epigenético (Lehmann et al., 2011; Shah et al., 2012; Dawson et al., 2013). Diferentes aproximaciones ómicas han intentado definir distintas subclases en el CMTN (Lehmann et al., 2011; Dawson et al., 2013; Burstein et al., 2015), pero, hasta este momento ninguno ha probado una utilidad clínica a través de estudios replicativos independientes.

La clasificación que más se utiliza es la del grupo de Lehmann (Bianchini et al., 2016; Lehmann et al., 2011). Ésta propone seis subtipos agrupados por su perfil de expresión: 1) BL1 (Basal-Like 1), 2) BL2 (Basal-Like 2), 3) IM (Immunomodulatory), 4) M (Mesenchymal-Like), 5) MSL (Mesenchymal Stem-Like) y 6) LAR (Luminal Androgen-Receptor) (Lehmann et al., 2011). Los distintos subtipos están enriquecidos en un amplio espectro de vías de señalización. El subtipo BL1, que se encuentra entre los más representados en esta clasificación, tiene la tasa más alta de RpC con el uso de la quimioterapia convencional. En este subtipo la falla en vías de reparación y del ciclo celular ocasionada por frecuentes mutaciones en genes como *BRCA1* y *BRCA2*, explica los constantes rearrreglos cromosómicos que presenta y lo vuelve susceptible a los inhibidores de la polimerasa ADP-ribosa (iPARP). El BL2, que comparte la tasa con menor RpC con los subtipos LAR y MSL, presenta la sobreexpresión de receptores de crecimiento como EGFR, IGF1R y marcadores mioepiteliales. Los tumores IM sobreexpresan genes relacionados con el sistema inmune adaptativo (vías Th1/Th2, células Natural Killer y dendríticas, y los receptores de las células T y B) así como de citocinas (IL-12 e IL-7). Tanto el subtipo M como el MSL comparten vías relacionadas con la motilidad, diferenciación y crecimiento celular que permiten la transición epitelio-mesénquima. Igualmente, distintas vías como la de Wnt/ β -catenina, TGF- β , Rho y ALK son compartidas por ambos subtipos, mientras que presentan mayor expresión de factores de crecimiento para los MSL y menor en los de proliferación celular. Finalmente, los LAR tienen un gran enriquecimiento en las vías hormonales, con una expresión de receptores de andrógeno (Lehmann et al., 2011; Bianchini et al., 2016; Omarini et al., 2018).

Cáncer de mama en México

Debido a que en México el 90% del CM es detectado a través de la autoexploración, más de la mitad de estos tumores son desafortunadamente diagnosticados en estadios avanzados (López-Carrillo Lizbeth, 2001), en los cuales la sobrevida tiene un intervalo entre el 67 al 75.6% (Ángeles-Llerenas et al., 2016). Aunque los porcentajes de sobrevida representan más de la mitad de las pacientes con CM tendrán un pronóstico favorable, el número total de casos (6,884) es una cifra abrumadora para los pacientes y las familias que sufren la enfermedad.

En particular, el CM es una de las primeras nueve enfermedades no transmisibles que contribuye a la carga de enfermedades en México; es la neoplasia que provoca el mayor número de años de vida ajustada por discapacidad, y representa el 1.9% y el 28.7% del total del presupuesto del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Fondo de Protección contra Gastos Catastróficos, respectivamente (Unar-Munguía et al., 2017).

Para nuestro país, un análisis retrospectivo en 854 pacientes realizado por Ángeles-Llerenas y colaboradores (2016), determinó que el CM afecta de manera homogénea a los tres estratos socioeconómicos categorizados: a) el alto, en un 35.1%; b) el medio, con 33% y c) el bajo, con 32%. A pesar de que la enfermedad permea de manera equitativa en los diferentes niveles, la sobrevida a cinco años posterior al diagnóstico en estadios iniciales (cuando aún no existe metástasis de tipo local o distante) sí presenta diferencias, con 12.5% menos de sobrevida para el estrato bajo con respecto al alto, y 3.7% menos para el medio en relación al alto. Mientras que, en estadios avanzados (tumores con metástasis locales y distantes) el margen de la sobrevida disminuye a un 8.6% y 6.9% en el estrato bajo y medio con respecto al alto, respectivamente (Ángeles-Llerenas et al., 2016).

Entre los pacientes de América Latina, el CMTN ha mostrado una mayor frecuencia que en otros grupos étnicos, alcanzando hasta un 14-20% (Kwan et al., 2009; Lara-Medina et al., 2011; Lehmann et al., 2011; Soto-Perez-de-Celis & Chavarri-Guerra, 2016). A pesar de su alta incidencia y prevalencia, existen muy pocos estudios genómicos en estas poblaciones y, la

mayoría de las pacientes estudiadas son mujeres latinas que viven en los Estados Unidos, en donde han sido examinadas (Weitzel et al., 2019).

La acumulación de mutaciones ha permitido documentar los procesos operativos exógenos y endógenos, lo que nos permite entender mejor el origen de algunos de los mecanismos que provocan las mutaciones como se explica en el siguiente apartado.

Firmas mutacionales

Las mutaciones son procesos normales que se presentan en todas las células a través del tiempo, los procesos que permiten la acumulación de mutaciones generan patrones de mutaciones que pueden ser agrupados y distinguidos, atribuyéndose a un procesos en específico (Alexandrov, 2020). La primera de las firmas mutacionales descubierta fue el cambio de citocina por timina en sitios de di-pirimidina (Alexandrov Consortium, 2020). Presente en el 60% de los casos fue el primer patrón mutacional registrado, eventualmente, a través del agrupamiento sistemático de mutaciones por métodos estadísticos en sitios de trinucleótidos (Cosmic V2) (Alexandrov Consortium, 2020) y posteriormente en sitios de pentanucleótidos (V3), las 30 distintas firmas mutacionales descubiertas hasta este momento cobran sentido mientras se asocian con su etiología. Mecanismos como los fallos en la maquinaria de reparación del DNA (Firma 3, 5, 21, 26, 44), o la replicación (Firma 31, 32, 35, 42); diversos factores exógenos como el tabaco, el tratamiento con quimioterápicos o la exposición directa o indirecta a la luz UV (firma 4, 7, 24, 29 y 38), han contribuido a discernir las causas de algunos tipos de tumores (Alexandrov Consortium, 2020). En específico el cáncer de mama se encuentra enriquecido en las firmas por déficit en la reparación del DNA, y el subtipo negativo representa uno de los tipos de cáncer con mayor frecuencia en esta firma mutacional.

Antecedentes

A pesar de tener una gran importancia clínica, los tumores TN son las neoplasias con menos estudios (alrededor de 16 mil publicaciones en Pubmed hasta agosto de 2021) en comparación con los otros subtipos. El primer estudio molecular a escala genómica se realizó en

2012. Se estudiaron un total de 104 pacientes, a los que se les realizó secuenciación de exoma completo y del mRNA. De este primer análisis se confirmó que la gran mayoría eran tumores basales (según la clasificación de Perou y coautores (2000)), con una gran heterogeneidad molecular, presentando una carga mutacional muy variable, con más de 200 variantes para algunas pacientes y solamente una para otras, pero con una alta frecuencia de alteraciones en genes como *TP53* (Shah et al., 2012).

En 2016 Nik-Zainal y colaboradores (2016) analizaron 560 tumores mamarios, de estos, el 26% (148) eran CMTN. Su estudio identificó, al igual que el de Shah y coautores (2012), una alta frecuencia de mutaciones en genes como *TP53* y *RBI*, además de variantes en *BRCA1/2*. Por otra parte, también efectuaron un análisis de firmas mutacionales; las que son detectadas a partir de un análisis global de variantes puntuales en un contexto de trinucleótidos. Lo anterior se basa en que, a lo largo del tiempo, la acumulación de variantes en el DNA provocada por los diversos tipos de daño directos e indirectos, exógenos o endógenos, así como los errores intrínsecos a la replicación y la falla de reparación de estos, deja un patrón de mutaciones característico de su etiología. La organización y posterior clasificación de patrones de alteraciones permite identificar estas firmas mutacionales y rastrear posibles causas en una neoplasia (Alexandrov et al., 2013). Asimismo, producto de este análisis, se detectó que los tumores CMTN tienen fallas en mecanismos de reparación dependientes de la recombinación homóloga y de bases mal apareadas (MMR: Mismatch repair) (Nik-Zainal et al., 2016).

Posteriormente en 2019, el mismo grupo de Nik-Zainal realizó otro estudio, esta vez de 245 tumores TN que obtuvo de la Red de Análisis del Canceroma de Mama en Suecia (SCAN-B (Sweden Cancerome Analysis Network-Breast)). Al igual que en sus estudios previos, identificaron una gran heterogeneidad molecular de los tumores TN, pero con un patrón de daño en la reparación del DNA por RH (determinada a través de firmas mutacionales y distintos algoritmos). Las pacientes portadoras de este presentaron una mejor respuesta a los iPARP con una mayor probabilidad de sobrevida (Staaft et al., 2019).

Finalmente, el único estudio molecular de CMTN en México (además del que aquí se presenta), se publicó hace tres años, e incluyó 19 tumores TN, en los que se secuenció un panel de 48 genes asociados al cáncer. Se encontraron mutaciones de gran importancia en genes como *TP53*, *FLT3* y *PIK3CA* (Uscanga-Perales et al., 2019). Sin embargo, no se evaluaron características moleculares adicionales como carga mutacional, firmas mutagénicas o vías asociadas a los genes encontrados, ni se realizaron asociaciones con variables clínicas de pronóstico y respuesta terapéutica.

En este trabajo, mediante la secuenciación de exoma (WES, por sus siglas en inglés), se caracterizaron las alteraciones genómicas de 29 pacientes mexicanas diagnosticadas con CMTN y asociamos su perfil genómico con varias características clínicas para evaluar su papel como marcadores predictivos en la respuesta al tratamiento.

Justificación

Por lo anterior, una de las alternativas propuestas como biomarcador predictivo potencial es la deficiencia en mecanismos de reparación del DNA, la cual se presenta de manera frecuente en los tumores triple negativos. Entre estos mecanismos destaca la deficiencia en la reparación por recombinación homóloga. Se han identificado a las alteraciones en *BRCA1/2*, que participan como mediadores importantes en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga, como un factor que aumenta la sensibilidad a tratamientos que provocan el incremento de rupturas de doble cadena en el ADN, como pueden ser los derivados de las sales de platino.

Pregunta de investigación

Existen patrones genómicos a distintos niveles asociados a la deficiencia en mecanismos de reparación al ADN, que causan una alta sensibilidad a agentes platinados e impactan en la sobrevida global.

Hipótesis

Existen patrones genómicos a distintos niveles asociados a la deficiencia en mecanismos de reparación al ADN, que causan una alta sensibilidad a agentes platinados e impactan en la sobrevida global.

2. Materiales y métodos

Criterios para la elegibilidad de los pacientes

Un total de 97 pacientes diagnosticados con CMTN y tratados en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) de México fueron seleccionados para este estudio. Todos los pacientes fueron diagnosticados como CMTN y tratados entre abril del 2007 y abril del 2010, presentaron tumores invasivos localmente avanzados con tratamiento neoadyuvante y cirugía así como una evaluación de RpC, que fue definida como la muestra libre de células de cáncer residual en mama y en nodos linfáticos de la axila (ypT0/isypN0) (*Pathologic Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer: Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval* | FDA, n.d.) que es utilizada por el departamento de patología del INCAN. Después del control de calidad del ADN, solamente 29 muestras fueron amplificables y adecuadas para su análisis por WES (ver más adelante). Todas las muestras que fueron analizadas fueron libres de tratamiento. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INCAN (protocolo #016/013/IBI CEI/1021/16) y fue conducido de acuerdo con la Declaración de Helsinki; las muestras fueron anonimizadas y enviadas para ser procesadas al Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

Evaluación histológica

Todas las evaluaciones histopatológicas fueron realizadas por médicos patólogos expertos adscritos al Departamento de Patología del INCAN. El estatus de los receptores ER, PR y HER2 fue evaluado por inmunohistoquímica utilizando los estándares de las guías de la ASCO/CAP (Hammond et al., 2010): menos de uno por ciento del score de la tinción para los receptores de

ER, PR y HER2. El infiltrado linfocitario (TILs) fue evaluado para cada paciente con tinciones de Hematoxilina y Eosina en los compartimentos estromal y peritumoral. El infiltrado estromal fue considerado para clasificarlo en alto o bajo con un umbral $\geq 30\%$. La RpC fue evaluada según el Residual Cancer Burden Index del MD Anderson (Residual Cancer Burden Calculator, n.d.) por los médicos tratantes.

Extracción del ADN y preparación de la muestra

Se obtuvieron 97 biopsias primarias de cada caso de los archivos del Departamento de Patología, como bloques de parafina. De estos bloques se extrajo alrededor de 50 mg de tejido a través de tres cortes de 50 μm de tejido viable no necrótico con contenido tumoral $>90\%$; a ésta se le removió la parafina con baños de xilol y etanol para posteriormente ser digerida toda la noche con proteinasa K. La formación del entrecruzamiento por el formaldehído fue revertida con incubaciones de 90° C durante una hora. Finalmente se extrajo el DNA de los tejidos obtenidos con el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el objetivo de eliminar el RNA, se aplicó RNAsa A a 37° C durante 1 hora al DNA extraído. Se cuantificó el rendimiento de nuestra extracción a través de fluorimetría, con el Kit Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Verificamos la integridad mediante la electroforesis de un gel de agarosa y pureza a través de espectrometría con el equipo NanoPhotometer NP80 (IMPLEN). Tras este control de calidad 29 muestras cumplieron los requerimientos mínimos para la secuenciación y análisis por WES.

Análisis clínico-patológico

Se recolectó la información de cada una de las pacientes y se generó un registro electrónico. La información recogida fue: **(1) datos demográficos:** edad de diagnóstico, comorbilidades, índice de masa corporal (IMC), paridad, antecedentes de uso de métodos anticonceptivos orales, antecedentes familiares de CM, tipos de tratamiento; **(2) desenlace clínico:** sobrevida global, periodo libre de enfermedad (periodo libre de enfermedad), RpC; y **(3) características microscópicas del tumor:** tipo histológico, grado histológico e infiltrado linfocitario. Evaluamos la probabilidad de sobrevida de las 29 pacientes desde el primer día,

diagnóstico, hasta el último día de seguimiento o fallecimiento. Tres pacientes (F39_133, F2_5 y F85_261) no contaban con la información de seguimiento y por lo tanto los datos fueron censurados en el análisis de supervivencia. El seguimiento más largo fue de 11 años y el más corto de menos de un año (257 días).

Preparación de bibliotecas genómicas

Con una cantidad inicial de 175 ng de DNA se realizó la preparación de bibliotecas, utilizando SureSelect XT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequence Library (Agilent Technologies, Santa Clara C.A., USA). Se capturaron las regiones exónicas con el kit de captura de híbridos SureSelect All Exon V6 (Agilent Technologies, Santa Clara C.A., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región capturada cubre 60 Mb del genoma que codifican proteínas. La secuenciación se realizó en la plataforma de Illumina en un HiSeq 2500 (125 x 2) en Novogene (Sacramento, California).

Análisis bioinformático y filtrado de variantes

El análisis bioinformático se realizó en dos partes: A) el preprocesamiento y B) la identificación y análisis de variantes. Para implementar el flujo de trabajo, se consideró el método de enriquecimiento y la plataforma de secuenciación.

A. Preprocesamiento

Se obtuvo la calidad de las secuencias crudas de los archivos .fastq con el programa FastQc (Wingett & Andrews, 2018) y se utilizaron las lecturas con un Phred >30, para asegurar el 99.9% de certeza de la base secuenciada. Las secuencias fueron alineadas con bwa-mem (H. Li & Durbin, 2009), utilizando como referencia el genoma hg19. Las siguientes herramientas de GATK fueron utilizadas para el resto del preprocesamiento (Van der Auwera et al., 2013): 'SortSam' para ordenar, las secuencias alineadas, del primer cromosoma hasta los cromosomas sexuales; 'SamFormatConverter' para convertir las secuencias en archivos binarios; 'MarkDuplicates' identificó los duplicados de PCR, que son artefactos del método de la elaboración de bibliotecas; 'BaseRecalibrator' y 'ApplyBQSR' para recalibrar el score de la calidad de las bases secuenciadas y por último 'Mutect2' para el llamado de variantes.

B. Identificación y análisis de variantes

a) Identificación de variantes

Los archivos derivados del llamado de variantes fueron anotados utilizando wAnnoVar (<http://wannovar.wglab.org/>) (Wang et al., 2010). Con los archivos resultantes se consolidó un documento único del que se extrajeron las variantes patogénicas y las variantes de significado clínico incierto (VUS). Para la identificación de dichas variantes se considera una fracción alélica (AF) >0.05 y que la lectura mutada estuviera presente por lo menos dos veces en cada sentido de las lecturas. Los criterios para filtrar y clasificar las variantes se muestran en la tabla 1. Finalmente, filtramos los genes conductores utilizando la lista propuesta por Intogen (Gonzalez-Perez et al., 2013). No fue posible distinguir entre mutaciones germinales de mutaciones somáticas, debido a que sólo teníamos muestra del tumor.

Tabla 1. Criterios para el filtrado y clasificación de variables	
Variantes patogénicas	VUS
Localizadas en la región exónica, 5'UTR, 3'UTR, ncRNA o de splicing	
Clasificadas patogénicas por ClinVar (Laundrum 2018).	Frecuencia <0.001 gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/) (Karczewski et al. 2019) y ESP6500 (https://evs.gs.washington.edu/EVS/) (Exome Variant Server n.d.).
	Predicción de alelo deletéreo en por los menos dos de los tres predictores: SIFT, PolyPhen-1 y Mutational Taster (Adzhubei et al. 2010; Ng and Henikoff 2003; Schwarz et al. 2014).

b) Análisis de variantes

1. Carga mutacional tumoral

La carga mutacional tumoral (TMB) se definió como el número de mutaciones somáticas, codificantes, de sustitución de bases y deleciones por megabase en el genoma examinado. Las variantes germinales conocidas reportadas en dbSNP (151) fueron descartadas.

2. *Filtrado*

Todas las mutaciones filtradas fueron curadas manualmente mediante la inspección de los archivos binarios con el software Integrative Genomic Viewer (IGV) del Broad Institute (GSEA, n.d.; Robinson et al., 2011). Del resultado del curado de bases se interpretaron con la herramienta Cancer Genome Interpreter (CGI) (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/home>) (Tamborero et al., 2018) del BBGLab para seleccionar las mutaciones conductoras. El CGI también se utilizó para identificar mutaciones específicas que tenían tratamiento disponibles y aprobados por la FDA.

3. *Hotspots*

Se utilizó la base de datos del Kravis Center para Oncología Molecular en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center para filtrar los Hotspots. Aquí se almacenan las mutaciones recurrentes estadísticamente significativas identificadas a partir de datos genómicos de estudios de gran escala (MT Chang et al., 2016, 2018).

4. *Firmas mutacionales*

El análisis de las firmas mutacionales se realizó mediante la identificación de la fracción de mutaciones en cada uno de los 96 contextos de trinucleótidos con R (versión 3.5.1 Feather spray) con el paquete deconstructSigs desarrollado por Rosenthal (Rosenthal et al., 2016). Para el análisis del mapa de calor, se consideró una proporción ≥ 0.20 como positiva para la firma 3. Para clasificar los tumores por patrones de las diferentes firmas mutacionales, condujimos un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado calculando las distancias con el método Euclidiano y agrupando con un método aglomerativo.

5. *Vías de señalización molecular*

Las diversas vías de señalización fueron enriquecidas con la herramienta David Functional Annotation Tools 6.8 (david.ncifcrf.gov) (Huang et al., 2009), utilizando los genes con mutaciones potencialmente conductoras obtenidos del filtrado de variantes.

6. *Análisis estadístico y de sobrevida*

Todas las curvas de sobrevida entre las diferentes variables de desenlace clínico y moleculares fueron generadas utilizando el método de Kaplan-Meier. Para medir las diferencias

entre TMB y el estatus de la menopausia, la proporción de firmas mutacionales y la sobrevida global, aplicamos la prueba de Wilcoxon. Finalmente una correlación lineal fue aplicada para evaluar la asociación entre la proporción de la Firma 3, el desenlace clínico (sobrevida global y periodo libre de enfermedad) y la edad. Todos los análisis estadísticos (descriptivos e inferenciales) y la visualización de datos se realizaron con R (v-3.5.2) con ayuda de los paquetes base, ggplot2, survminer (0.4.6) y pvcust (2.2-0).

7. Comparación con otras cohortes y sus mutaciones accionables

Para comparar con otros estudios y complementar las mutaciones con oportunidad de tratamiento en CMTN, se obtuvieron los datos de la TCGA (The Cancer Genome Atlas) (Ciriello et al., 2015), METABRIC (Curtis et al., 2012; Pereira et al., 2016; Rueda et al., 2019) y el estudio de Nik-Zainal del 2016 (Nik-Zainal et al., 2016); la información se extrajo del cBioPortal (cBioPortal for Cancer Genomics, n.d.) para las dos primeras y del material suplementario de la publicación de Nik-Zainal. Seleccionamos los tumores TN clasificados por inmunohistoquímica para los receptores hormonales (ER y PR) y FISH para la amplificación de HER2. De los casos elegidos descargamos la información sobre la sobrevida global y las mutaciones presentes. Por último, las variantes fueron anotadas con las bases de datos CGI y OncoKB (Chakravarty et al., 2017; Tamborero et al., 2018) para distinguir mutaciones accionables con tratamientos aprobados por la FDA, en todos los tipos de cáncer.

3. Resultados

Características de los pacientes y los tumores

A partir de una cohorte de 29 pacientes con un promedio de seguimiento de cuatro años (rango 0.7-11.1), y un promedio en la edad de diagnóstico a los 50.1 años (rango 29-68). Encontramos en el 10.3% de los casos un antecedente familiar de CM. Más del 72% de los diagnósticos se realizaron en las etapas II y III. El resto de las características clínicas de las 29 pacientes se resumen en la tabla 2.

Los tratamientos de las pacientes se basan en el enfoque convencional (antraciclinas y taxanos), otros agentes se agregaron posteriormente (Tabla 3). Identificamos dos grandes grupos: (1) quimioterapia convencional 66% (CCT; 19/29) y (2) quimioterapia convencional más derivados de sales de platino 34%(Ch-PLA; 10/29).

Tabla 2. Características clínicas de la población del estudio			
Edad al momento del diagnóstico		Antecedente de cáncer de mama hereditario	
Promedio	50.1 (\pm 8.72)	Sí	3 (10.34%)
Rango	29-68	No	26 (89.66%)
Estatus menopausia *		Estadio del tumor al momento del diagnóstico	
Premenopausia	10 (34%)	IIB	5 (17.24%)
Postmenopausia	16 (55%)	IIIA	14 (48.28%)
Comorbilidades		IIB	7 (24.24%)
Diabetes mellitus	7 (24%)	IIIC	3 (10.34%)
Hipertensión arterial	7 (24%)	Respuesta patológica completa	
IMC		RpC	10 (34.48%)
Promedio	27.94 (\pm 5.10)	Enfermedad residual	19 (65.52%)
Embarazos previos		Quimioterapia neoadyuvante con sales de platino	
Sí	24 (82.76%)	Sí	10 (34.48%)
No	5 (17.24%)	No	19 (65.51%)
Anticonceptivos orales		Periodo libre de enfermedad (años)	
Sí	7 (24.24%)	Promedio	2 (\pm 2.24)
No	22 (75.86%)	Rango	0 - 7.1
Sobrevida Global (años)			
Promedio	5 (\pm 2.24)		
Rango	0.7 - 11.1		

*Datos incompletos por falta de información en los expedientes.

Tabla 3. Tratamientos				
ID	Tipo de QT	Quimioterapia neoadyuvante	Quimioterapia adyuvante	Tratamiento paliativo
F1_2	CCT	FAC+Paclitaxel+RT	NA	NA
F101_313	CCT	ADR+Paclitaxel+RT	Capecitabine	NA
F102_317	CCT	FAC+Paclitaxel+RT	Capecitabine	NA
F11_33	CCT	NA	CDDP+Paclitaxel+GMZ+CBP	NA
F2_5	CCT	ADR+FOS+RT+Tamoxifen	Paclitaxel+CDDP+CBP	Docetaxel/GMZ
F21_75	CCT	FAC+Paclitaxel+RT	CBP	Capecitabine
F23_81	ChPLA	ADR+CDDP+Paclitaxel	RT+Capecitabine	NA
F27_97	CCT	FAC+Paclitaxel+RT	NA	Capecitabine
F29_105	ChPLA	FAC+CDDP+Paclitaxel+GMZ+RT	NA	CBP+Docetaxel+Capecitabine
F3_8	CCT	FAC+Paclitaxel+Capecitabine	Capecitabine+CBP+Navelbine	NA
F31_110	CCT	FAC+Paclitaxel	RT	NA
F36_122	ChPLA	FAC+CDDP+Paclitaxel	RT	NA
F39_133	ChPLA	CDDP+Paclitaxel	RT+CDDP+GMZ+Capecitabine+CBP	NA
F42_147	CCT	FAC+Paclitaxel	CDDP+Navelbine	GMZ+CBP
F44_153	CCT	FAC+Paclitaxel	RT+CDDP+GMZ	NA
F49_165	ChPLA	CDDP+ADR+Paclitaxel	RT+Capecitabine	NA
F50_167	ChPLA	CDDP+DOXO+Paclitaxel	RT+Capecitabine	NA
F55_181	ChPLA	FAC+Paclitaxel+CDDP	NA	NA
F63_205	CCT	FAC+Paclitaxel	NA	NA
F64_206	CCT	FAC+Paclitaxel+RT	Navelbine	CDDP+GMZ
F65_208	CCT	FAC+Taxol	Capecitabine	CBP+Docetaxel
F67_215	CCT	FAC+Paclitaxel+GMZ+RT	NA	Capecitabine+Zometa+Xeloda+Navelbine
F77_245	ChPLA	FAC+Paclitaxel+CDDP+GMZ+RT	Capacitabine	NA
F82_248	ChPLA	FAC+Paclitaxel+CDDP	RT	NA
F85_261	CCT	FAC+Paclitaxel	RT	Capecitabine+CBP+GMZ
F9_27	CCT	FAC+Paclitaxel+GMZ+RT	Capecitabine+Navelbine	NA
F91_27 6	CCT	FAC+Paclitaxel	RT	NA
F92_281	ChPLA	CDDP+ADR+Paclitaxel+RT	NA	NA
F97_299	CCT	FAC+Paclitaxel+RT	Capecitabine	NA

Abreviaciones: CCT: quimioterapia convencional, ChPLA: quimioterapia convencional más derivados de sales de platino, FAC: fluorouracilo/adriamicina/citoxano, RT: radioterapia, ADR: adriamicina, GMZ: gemzar, CBP: carboplatino, FOS: ciclofosfamida, CDDP: cisplatino, DOXO: doxorubicina, NA: no disponible.

Sobrevida global y Respuesta patológica completa

La sobrevida global a cinco años se encontró en el 50% de las pacientes (Figura 6A). Se observó una tendencia de mejor probabilidad de sobrevida en pacientes con RpC (figura 6B). Entre los grupos de tratamiento, CCT y Ch-PLA no se identificaron diferencias significativas en la probabilidad de sobrevida (Figura 6C).

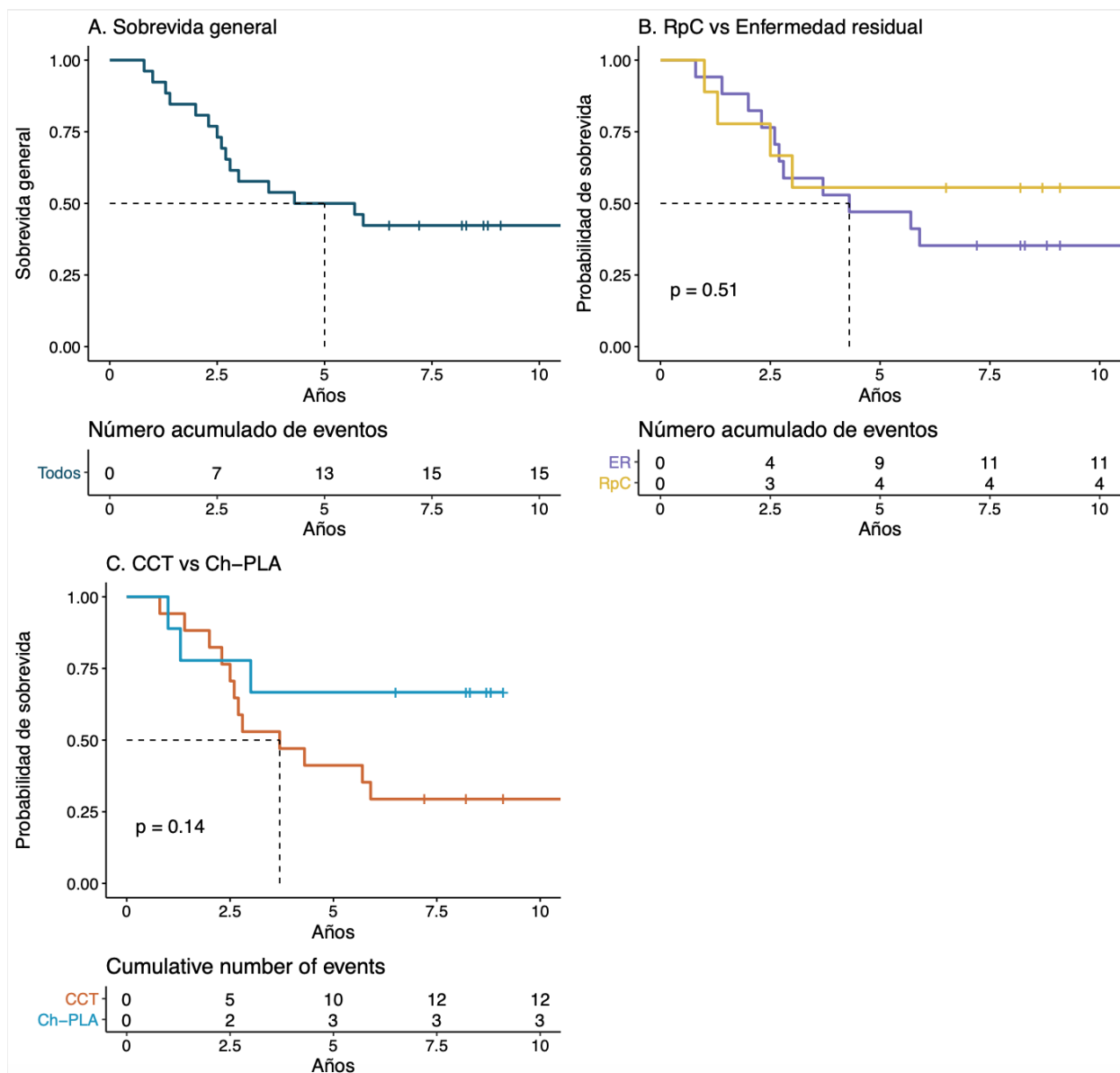


Figura 6. Probabilidad de sobrevida global A. en todas las pacientes, B. según si presentaron RpC y C. según el tratamiento recibido.

Infiltrado linfocitario

El infiltrado, evaluado mediante la histopatología, mostró 13 tumores con un infiltrado alto y 10 bajos, seis muestras no pudieron ser evaluadas (Figura 9, panel inferior). Los TILs fueron analizados en asociación con las variables moleculares, pero no encontramos asociaciones significativas.

Métricas de calidad de secuenciación y alineamiento

Todas las muestras analizadas tuvieron un Phred Score por arriba de 30, asegurando una certeza del 99.9% de la base secuenciada. Las muestras tuvieron una profundidad media >30X, con una cobertura del 100% a 1X y 92% a 50X. Encontramos un promedio de 20% de lecturas duplicadas y un 20% de lecturas fuera del blanco (*off target*).

Carga mutacional

Identificamos un total de 2,690,172 mutaciones. Todas las regiones intrónicas, SNPs (≥ 0.01) y secuencias de baja calidad fueron descartadas, dejando un total de 10,040 mutaciones. La distribución de mutaciones entre muestras fue heterogénea con una alta frecuencia de variaciones de un solo nucleótido (SNVs) (70.3%), seguidas por mutaciones no codificantes (splicing y RNA no codificante; 24.4%), inserciones y deleciones (5.11%). La carga mutacional también mostró una distribución heterogénea con una mediana de 5.52 mutaciones por megabase (rango intercuartílico 2.5-6.2/Mb) (Figura 7). De todas las mutaciones encontradas, solamente 51 fueron detectadas en genes conductores (ver materiales y métodos). El estatus menopáusico, la RpC, el tratamiento, la supervivencia global y la edad no tuvieron ninguna asociación con la carga de mutaciones (Figura 8 A-F). La carga mutacional más alta se encontró en tumores con mutaciones patogénicas en *MSH6* (F50_167).

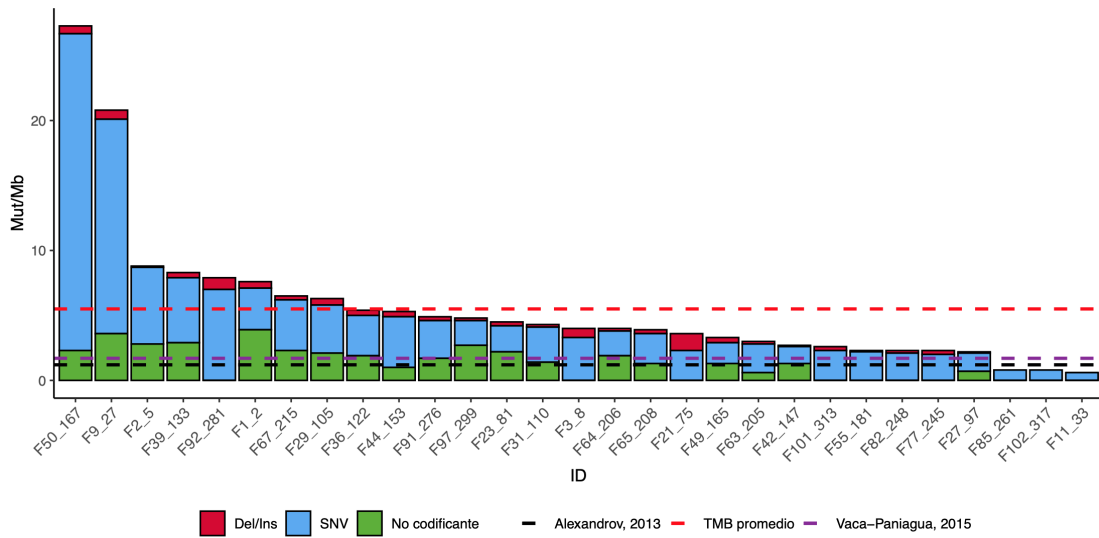


Fig 7. Carga mutacional tumoral (TMB) de cada muestra y de acuerdo al tipo de variante. En las líneas punteadas de color negro, rojo y morado muestran el promedio de TMB encontrado en los estudios de Alexandrov, nuestro estudio y el de Vaca-Paniagua respectivamente.

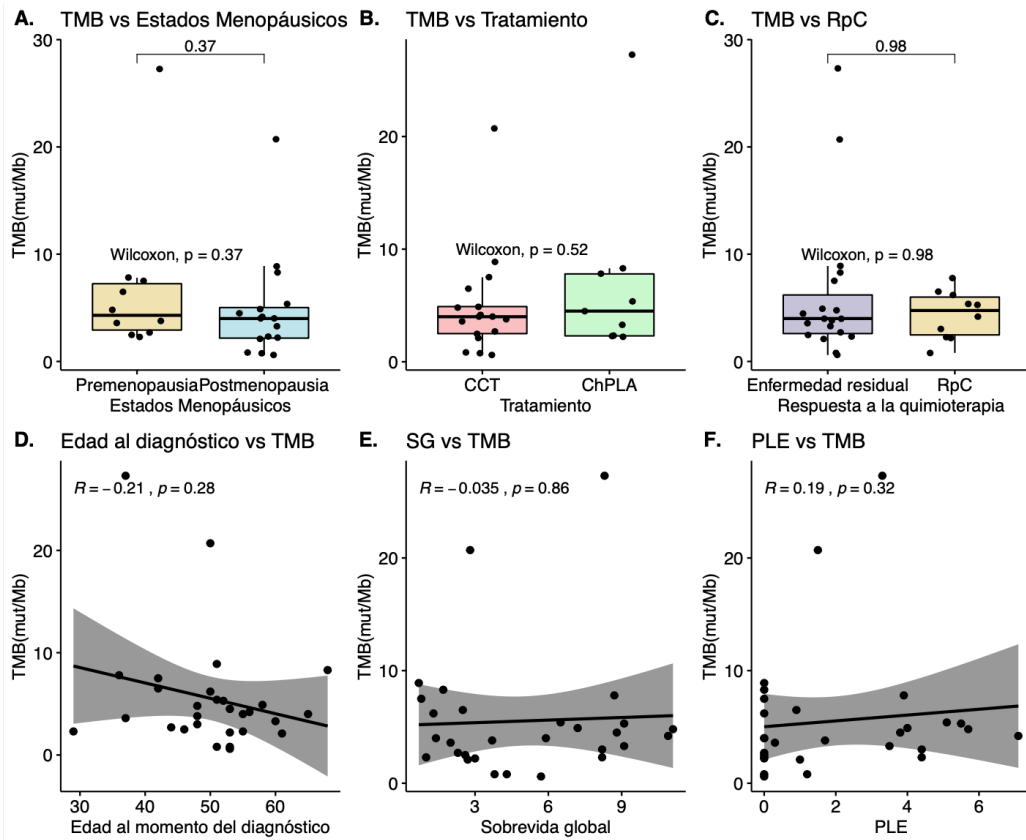


Fig 8. Asociación entre variables de desenlace clínico y el TMB. A. Estatus de la menopausia B. Tipo de tratamiento C. RcpD. Edad al momento del diagnóstico E. Sobrevida global F. Periodo libre de tratamiento

Panorama de las mutaciones conductoras

En el conjunto de todos los tumores detectamos 51 mutaciones conductoras en 31 genes conductores en 22 de las 29 pacientes, de las cuales 41.9% (8/31) fueron clasificadas como supresoras tumorales, 32.3% (10/31) como oncogenes y 25.8% (8/31) tienen una función ambigua, de acuerdo con CGI. En 22.5% (7/31) de las muestras no se detectó ninguna mutación conductora. Además, los genes con mayor frecuencia de variantes patogénicas fueron *TP53* (41.4%, 12/29), *BRCA1* (13.8%, 4/29) y *BRCA2* (6.9%, 2/29) (Figura 9).

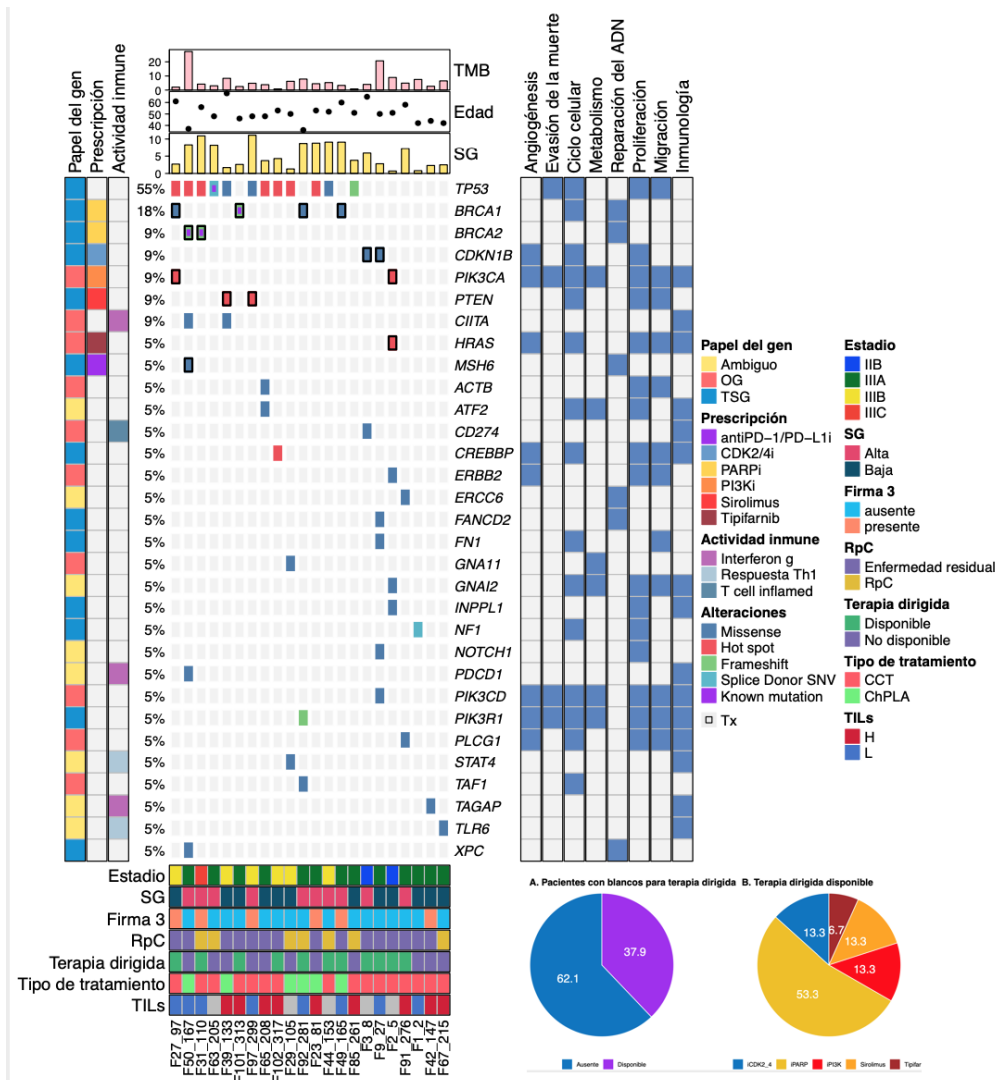


Figura 9. Composición alélica y características moleculares de las muestras de cáncer de mama triple negativo. Las mutaciones conductoras se representan según el tipo de mutación (missense, hot spot, frameshift, splicing). Las mutaciones específicas ya notificadas en otros estudios se muestran con la etiqueta "mutación conocida". La disponibilidad de tratamiento para mutaciones específicas se marca con un marco negro. Las funciones del gen conductor se clasificaron como oncogén (OG), gen supresor de tumores (TSG) o ambiguo, según Vogelstein (2013) e IntOGen. La disponibilidad de prescripción (ensayos clínicos o aprobados por la FDA) para las mutaciones específicas detectadas se representa de acuerdo con la vía molecular a la que se dirige; el tratamiento de *TP53* está en fase de ensayos clínicos tempranos y actualmente no está aprobado por la FDA; los genes que participan en las vías inmunológicas se clasificaron como INF- γ (interferón g), actividad de inflamación de células T (célula T inflamada) y respuesta Th1 (Th1_response). El panel inferior muestra las anotaciones de las características clínicas (estadio, sobrevida global y RpC), la disponibilidad de un posible tratamiento dirigido (target treatment), el uso de sales de platino en el entorno neoadyuvante (NeoCh) y la presencia de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs). Las vías en las que participa cada gen se muestran en el panel de la derecha (ver Materiales y Métodos). Los gráficos superiores ilustran la SG, la edad en el momento del diagnóstico y la TMB.

Las mutaciones de cambio de sentido se presentaron en 42 de las 50 variantes detectadas; 12 de ellas son sitios hipermutables —o hotspots. De manera importante, los hotspots se detectaron en genes supresores tumorales, nueve en *TP53*, una en *PTEN* y una en *CREBBP*, solamente con una excepción en *PIK3CA*. De la distribución en las mutaciones cabe destacar la muestra F50_167 que fue aquella con mayor número de variantes patogénicas en genes conductores. Las alteraciones de cambio de sentido en los genes involucrados tanto en la vía de reparación por cambio de sentido, como en la vía por escisión de bases *MSH6* y *XPC* respectivamente también son de gran importancia, puesto que podría explicar la acumulación de una alta carga tumoral en esta paciente, una de las más jóvenes de nuestra cohorte con 29 años de edad.

Desafortunadamente no encontramos ningún tipo de asociación entre las variantes moleculares y las tres variables clínicas analizadas. Aunque encontramos una tendencia a una probabilidad más alta en la sobrevida global para las pacientes con mutaciones en genes involucrados en vías de la reparación del DNA ($p = 0.07$).

Agrupamos las vías enriquecidas, cuyos resultados se detallarán más adelante, para cada gen de acuerdo a los Hallmarks del cáncer. De manera importante 14 genes participan en vías de evasión para la muerte celular, 20 en ciclo celular, 8 en mecanismos de reparación del DNA, 19 en

proliferación y 16 en migración. Por último, encontramos en 11 de 29 pacientes (37.9%) mutaciones específicas asociadas con un tratamiento dirigido disponible.

Firmas mutacionales

Identificamos los procesos operacionales de la mutagénesis y cuantificamos su proporción en el exoma de los tumores a través del análisis de firmas mutacionales (Figura 10). Fueron detectadas dieciséis de las 30 firmas reportadas por Alexandrov (2013). Las firmas más representadas fueron la: 1, 3, 5, 9 y 26, en por lo menos 15 tumores. En particular la firma 3, asociada con la deficiencia en *BRCA1/2* y característica del CMTN, se identificó en 69% (20/29) de las muestras. Por otro lado, no encontramos asociación entre la firma 3 la RpC, el periodo libre de enfermedad y la sobrevida global (Figura 10).

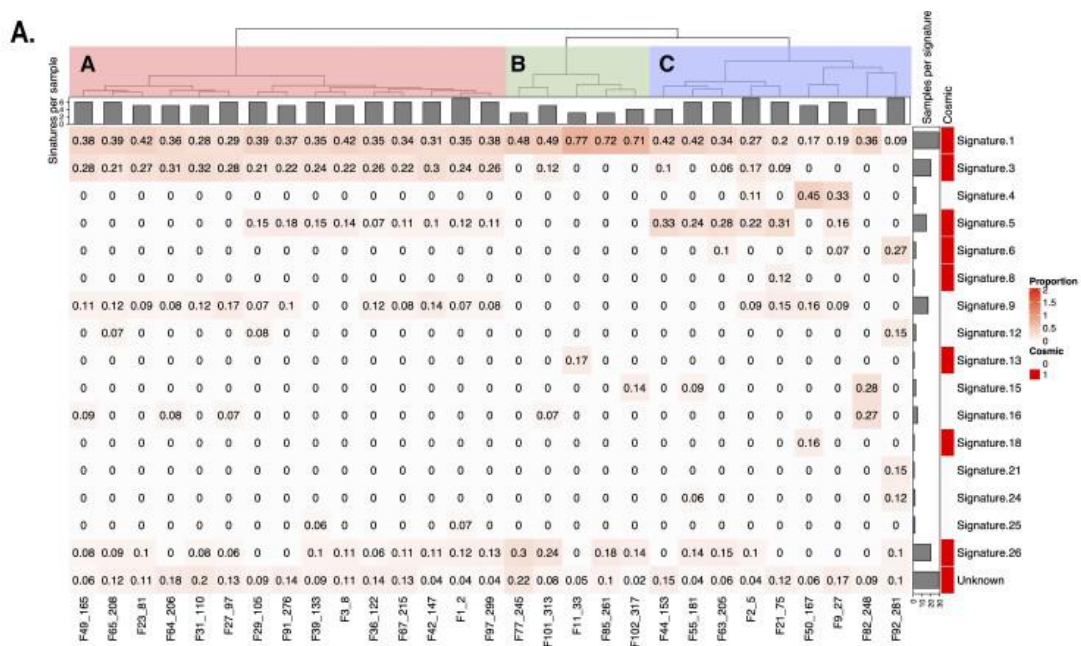


Figura 10. Distribución genómica del tumor según el perfil de la firma mutacional. Mapa de calor de las firmas mutacionales agrupadas con el método de Ward (véase la sección de materiales y métodos). Se observan las distintas firmas (filas) para cada una de las muestras secuenciadas (columnas). Se identificaron tres grupos de firmas mutacionales diferentes y se definieron como A, B y C.

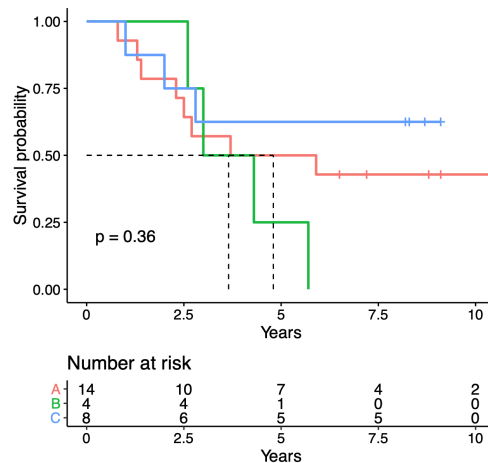


Figura 11. Probabilidad de supervivencia global de cada grupo de firmas mutacionales, grupo A (rojo), grupo B (verde) y grupo C (azul).

Adicionalmente, agrupamos todas las muestras, con base en la composición de las firmas mutacionales. Con este análisis detectamos tres grandes grupos (A-C) (Figura 10, parte superior). El grupo A está definido por tener la proporción más alta de firma 3, estas muestras presentaron con una frecuencia mayor a 0.2 de esta firma. El grupo B, se caracterizó por tener una alta proporción de firma 1, prácticamente la ausencia de firma 3 y un enriquecimiento de la firma 26. Por último el grupo C fue el más heterogéneo, compuesto por dos subgrupos, el primero enriquecido por la firma 5 y el segundo con la distribución más heterogénea de todos los grupos. Para buscar una relación entre los grupos con el desenlace clínico, calculamos la probabilidad de sobrevida y el periodo libre de enfermedad, para cada uno de los grupos. Observamos que el grupo B tiene la peor sobrevida global, pero los resultados no tuvieron significancia estadística (p-value = 0.36; Figura 11).

Aún más, evaluamos la asociación del estatus de la SG con la proporción de cada una de las firmas. Dado que el 50% de los pacientes tuvieron una probabilidad de sobrevida mayor a 5 años, agrupamos la sobrevida global en alta y baja, dependiendo del umbral de 5 años. Después de eliminar a los pacientes censurados, los grupos resultaron en un 44.8% (13/29) de sobrevida global alta y 55.2% (15/29) de sobrevida global baja. Las firmas 18, 21 y 24 se detectaron de manera exclusiva en pacientes con mayor sobrevida global, mientras que la firma 8 y 25

estuvieron presentes solamente en los pacientes con menor sobrevida global. Pero, no encontramos asociación estadística entre las firmas antes mencionadas y el estatus de la sobrevida global (Fig 12).

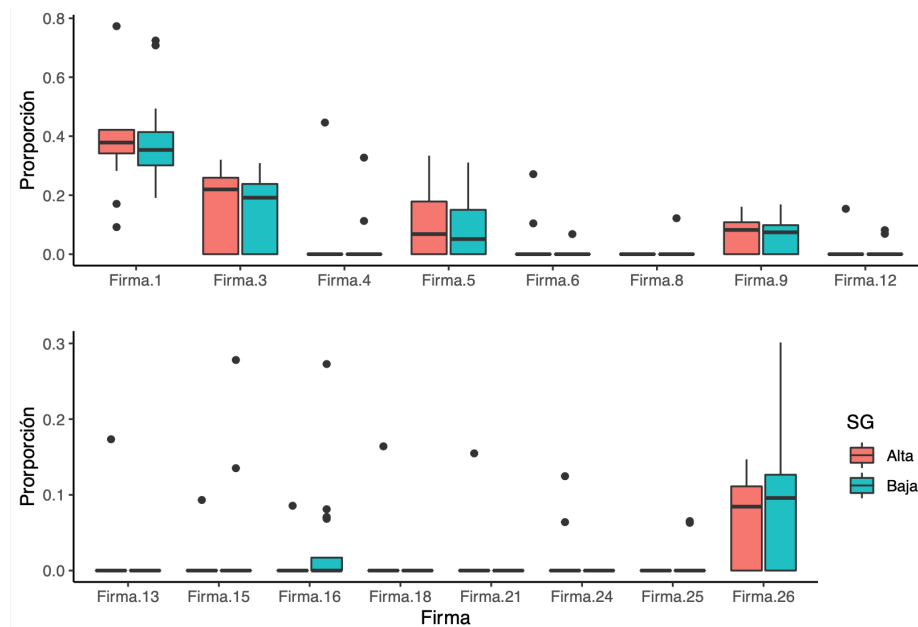


Figura 12. Comparación entre el estado de la sobrevida global (alta y baja) según la proporción de firma

Además, las firmas ubicuas 1 y 5 fueron identificadas de manera común en todas y en 15 muestras, respectivamente. Tanto la firma 1 como la 5 están asociadas con el envejecimiento, contribuyen del 9-77% y del 7 al 33% del total de mutaciones presentes, respectivamente (Figura 10). Sin embargo, no identificamos una asociación lineal entre la edad y la proporción de la firma 1 y 5 (Pearson $R=0.28$; Figura 13 A-B). Después comparamos las firmas detectadas asociadas al déficit de reparación del DNA: la firma 3 (déficit del mecanismo de reparación por RH) y las firmas 6, 15, 21 y 26 (déficit de la reparación por desapareamiento de bases MMR) con el TMB (Figura 13 C-G). No encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa (Firma 3 $R=0.17$, Firma 6 $R=0.24$, Firma 15 $R=0.4$, Firma 21 $R=0.23$, Firma 26 $R=0.31$).

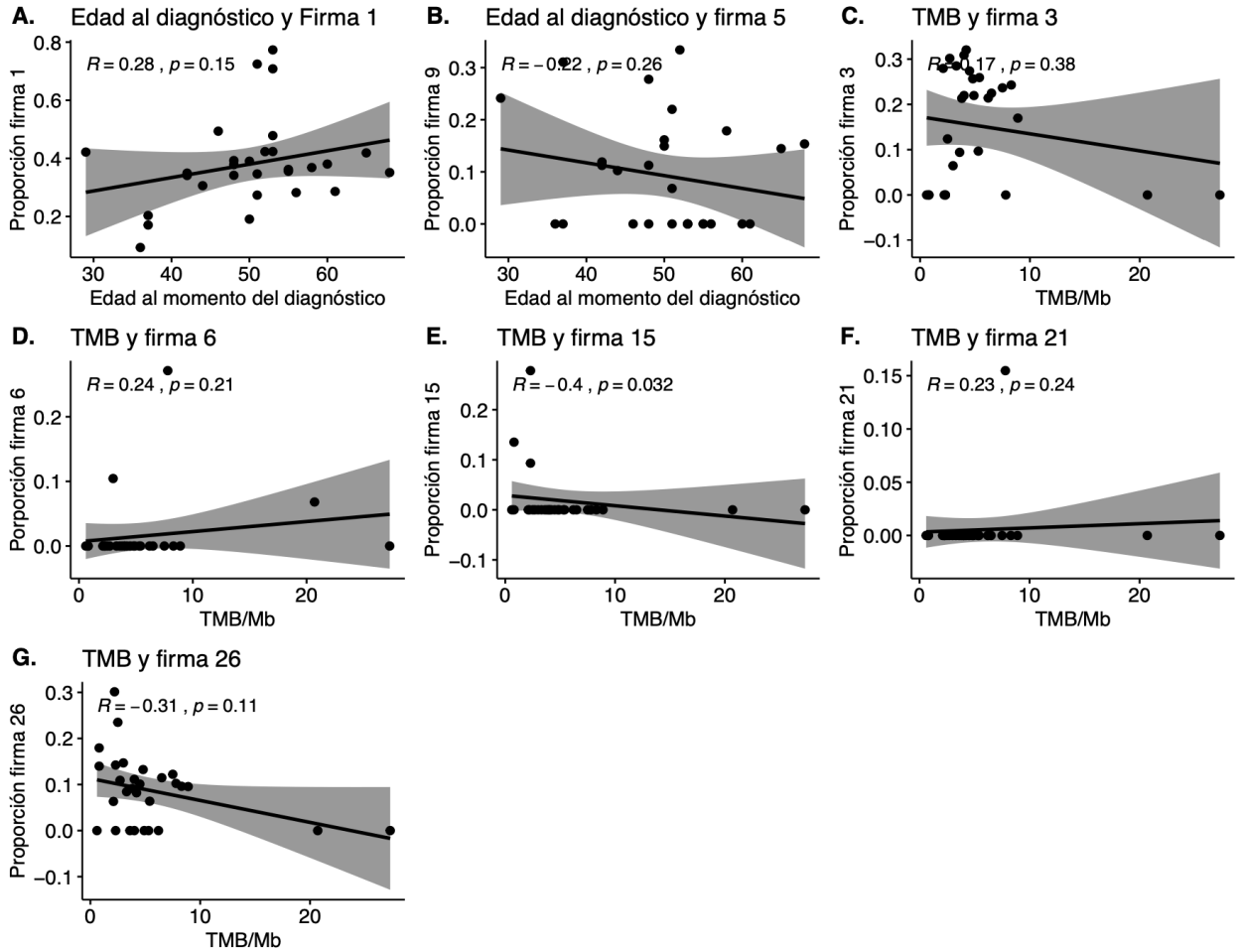


Fig 13. Correlación lineal entre las proporciones de firmas con mayor frecuencia en las muestras y las variables clínicas y moleculares. Edad al diagnóstico vs A. proporción de firmas y B. proporción de firmas 9. TMB vs C. proporción de firmas 3, D. proporción de firmas 6, E. proporción de firmas 15, F. proporción de firmas 21 y G. proporción de firmas 26.

En suma, observamos que más de la mitad de las muestras presentaron una proporción ≥ 0.2 de la firma 3 (todo el grupo A, $n=15/29$), y la otra mitad tuvo ≤ 0.2 de esta firma (grupos B y C, $n=14/29$). Evaluamos la posible asociación de la sobrevida global y el periodo libre de enfermedad con la proporción alta (≥ 0.2) y baja (≤ 0.2) de la Firma 3, sin encontrar asociaciones entre estas variables clínicas (Figura 14).

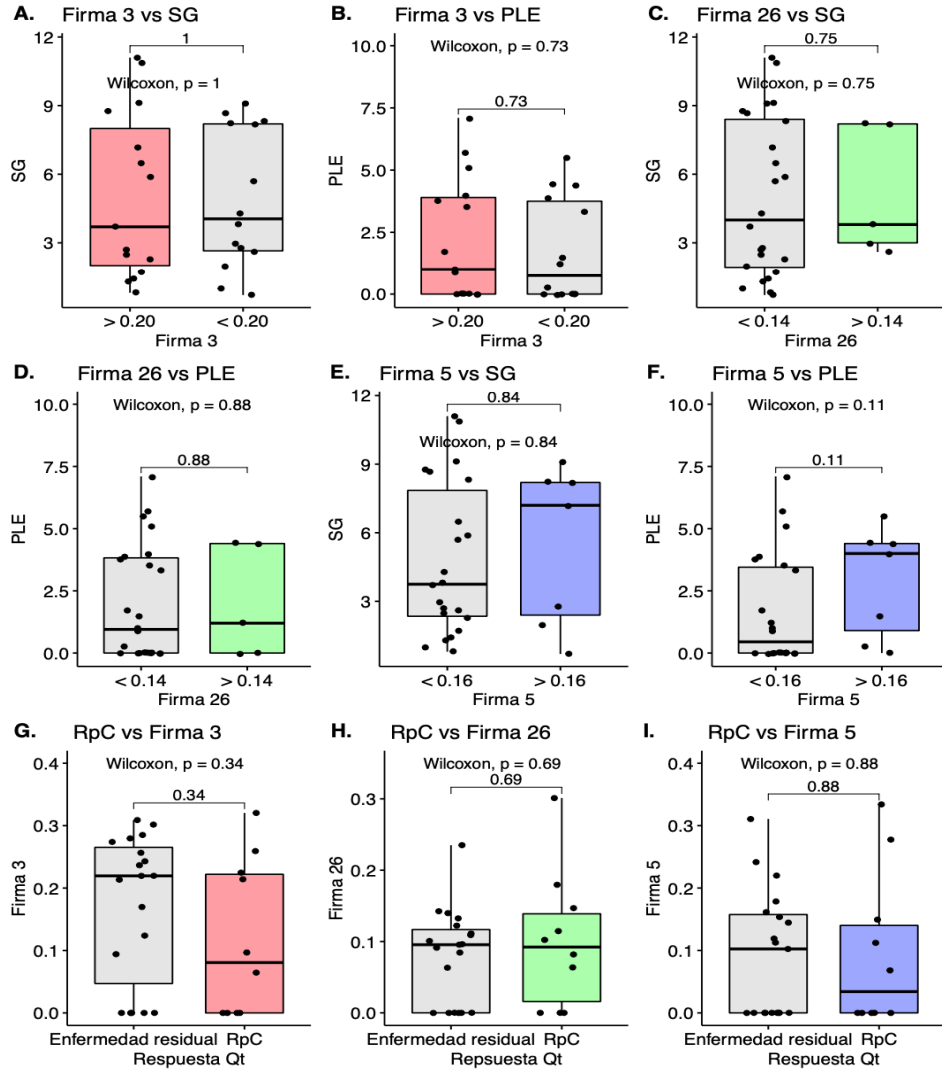


Fig 14. Asociación entre la proporción del umbral en las firmas según los grupos y el resultado clínico. A. Supervivencia global y firma 3, C. firma 5 y E. firma 6. SSE y B. firma 3, D. firma 5 y F. firma 26. El recuadro rojo indica el grupo A, el verde el grupo B y el azul el grupo C; los recuadros grises representan los otros dos grupos. Los puntos de corte de las proporciones para cada firma 1 fueron seleccionados por el umbral que divide a cada grupo.

Finalmente, una alta proporción de Firma 5 (≥ 0.14) fue característica del grupo C, y una alta proporción de la Firma 26 (≥ 0.16) fue distintiva del grupo B. Utilizamos el umbral de estas firmas para categorizar las muestras y evaluar su asociación con la sobrevida global y el periodo libre de enfermedad. No existe una diferencia significativa entre la alta proporción en la firma 3, 5 y 26 y la sobrevida global, el periodo libre de enfermedad, la RpC y el TMB (Figura 15).

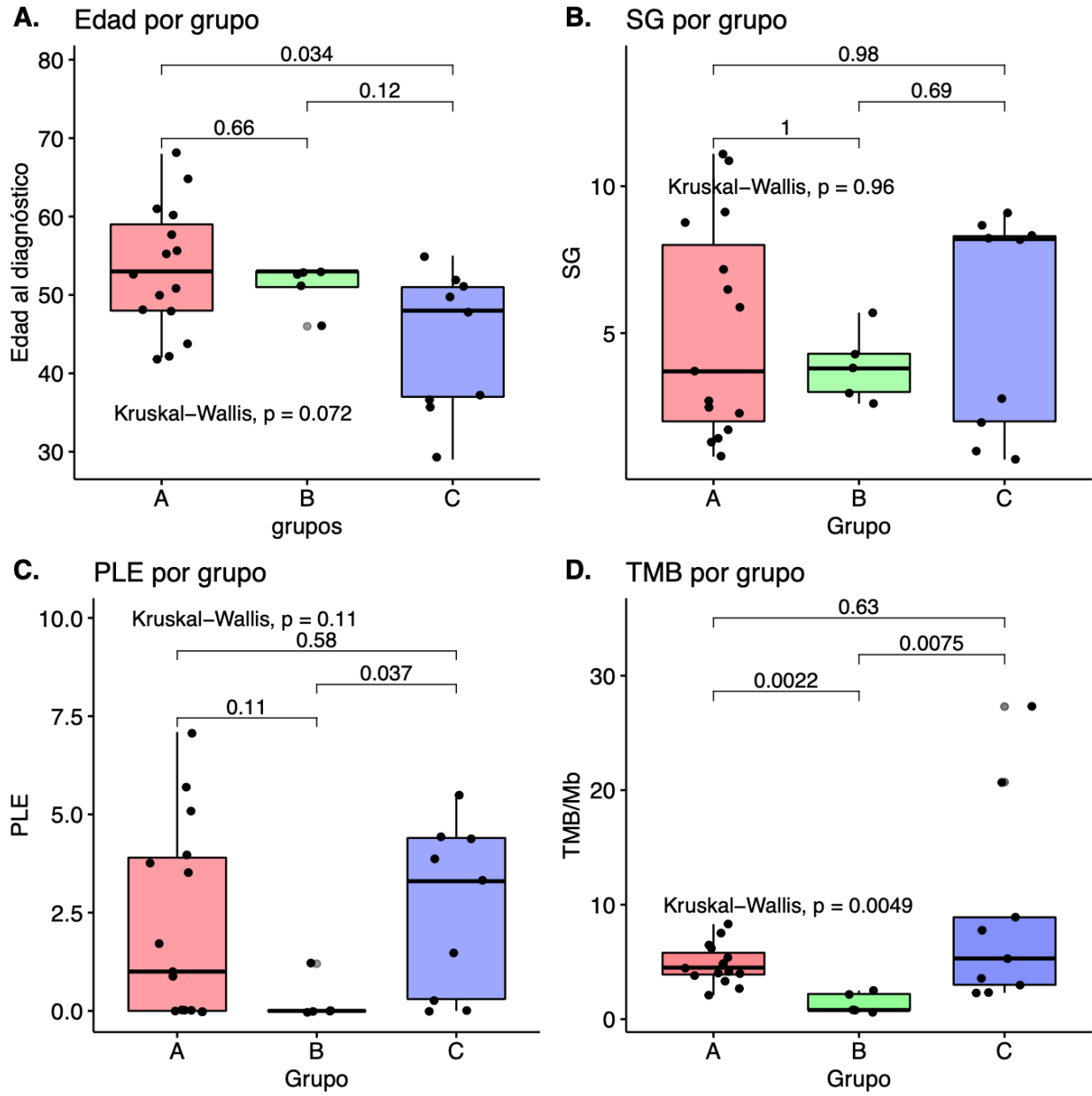


Fig 15. Diferencias entre los grupos según el resultado clínico (A, edad en el momento del diagnóstico; B OS; C, DFS) y molecular (D, TMB).

Vías de señalización

Después de realizar un análisis de enriquecimiento funcional de las vías de señalización, identificamos 158 vías distintas. Filtramos las vías no informativas (ver material y métodos), obteniendo 41. Posteriormente agrupamos y clasificamos las vías en ocho distintos procesos: proliferación, ciclo celular, migración, inmunología, angiogénesis, reparación del ADN,

metabolismo y evasión de la muerte celular (Figura 16). El proceso más prevalente fue la proliferación que encontramos en cada una de las muestras analizadas. El ciclo celular fue el segundo más frecuente, seguido por la migración y la evasión de la muerte celular.

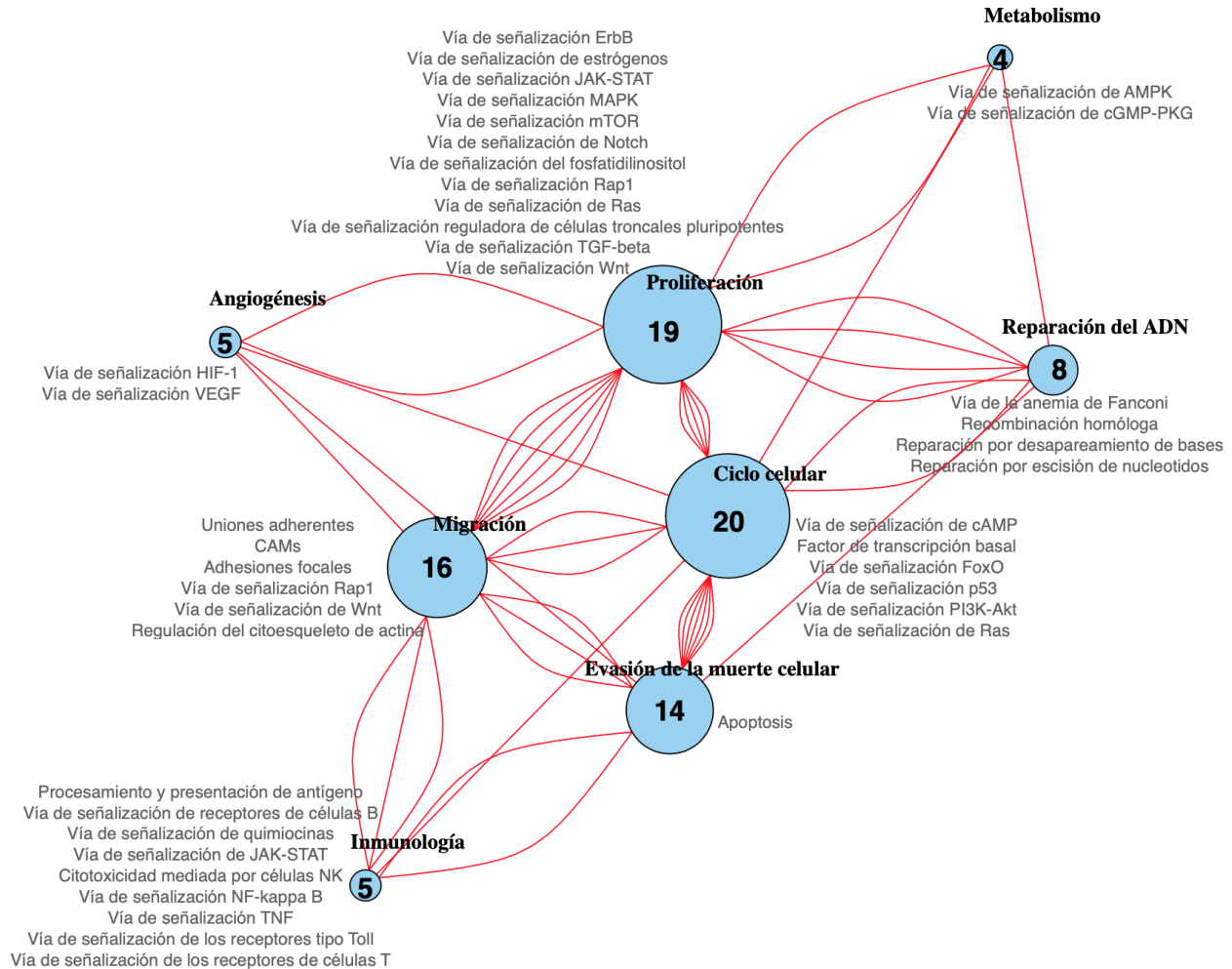


Fig 16. Procesos biológicos globales enriquecidos en los tumores. Se detectaron ocho grandes procesos de vías enriquecidas. El tamaño del círculo es igual al número de genes asociados a cada proceso en todas las muestras. Las líneas indican que un mismo gen participa en los procesos vinculados. Se enumeran las vías agrupadas en cada proceso. Se indica el número de genes y vías que participan en cada proceso.

Panorama molecular en comparación con otras cohortes

Con el objetivo de realizar un contraste apropiado con nuestra cohorte, comparamos los datos obtenidos con las cohortes de otros tres estudios genómicos de cáncer de mama. Obtuvimos de las bases de datos los casos que correspondiera a tumores triple negativos localmente avanzados. Obtuvimos la información de un total de 591 casos, 320 (13.5%) y 123

(15.05%) corresponden a los consorcios de la TCGA (The Cancer Genome Atlas) y METABRIC Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium) respectivamente; y 148 (26.43%) del estudio realizado por Nik-Zainal en 2016 (Figura 17 A). La supervivencia global, tanto en los otros estudios como en el nuestro, mostró (Figura 17 B) una probabilidad mayor al 50% a los 5 años posteriores al diagnóstico, sin ninguna diferencia significativa al ser comparadas. Hicimos una comparación entre los 20 genes conductores mutados con mayor frecuencia en cada caso. Cabe resaltar la frecuencia de *TP53* mayor al 50% en el estudio de Nik-Zainal (51%) y en el consorcio del METABRIC (50%), seguida por la TCGA (44%) y finalmente nuestro estudio (28%). Aunque existe una diferencia del 23% entre nuestro estudio y el estudio de Nik Zainal *TP53* ocupó el primer lugar independientemente de la frecuencia registrada. Las frecuencias de otros genes conductores para los tumores triple negativos son *PIK3CA/PTEN* que se encuentran entre los primeros cinco lugares en todos los estudios analizados y *BRCA1/BRCA2*, que a pesar de tratarse de genes de gran importancia fueron encontrados en menos del 10% o incluso no son reportados como es el caso de *BRCA2* en METABRIC o ambos en la TCGA (Figura 17 C).

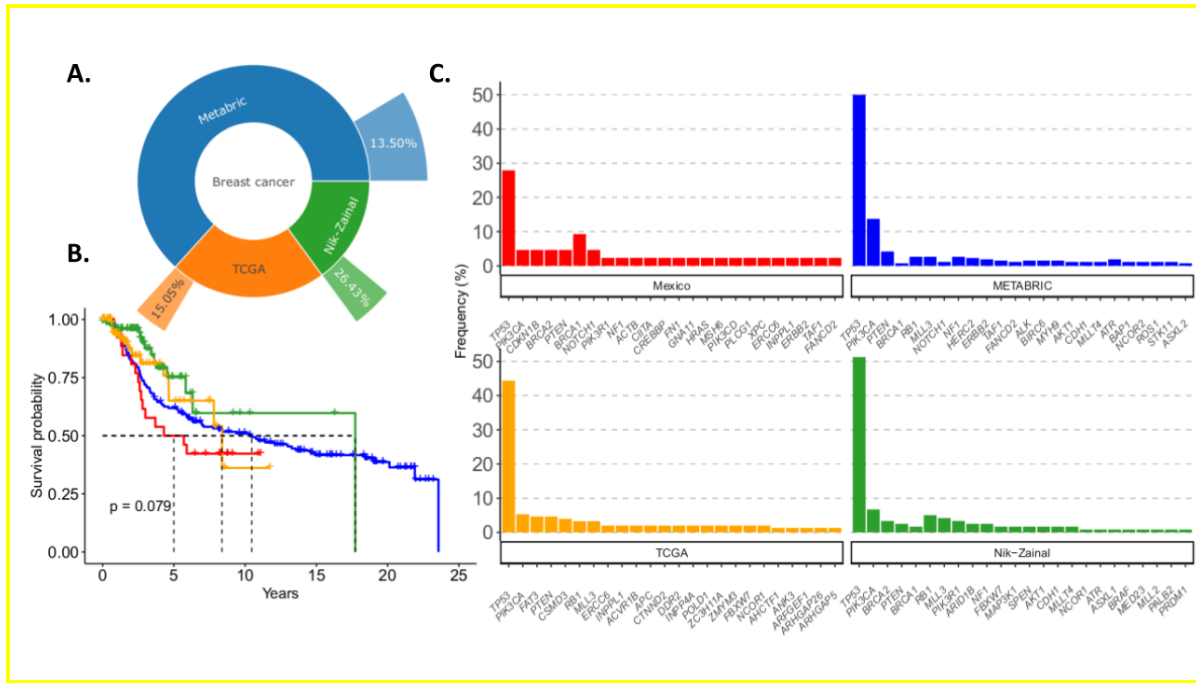


Fig 17. Comparación con otras cohortes de tumores TN. A. Distribución de las muestras triple negativas de los estudios B. Comparación de la supervivencia global entre las cuatro cohortes en tumores localmente avanzados. C. Frecuencia de los 24 principales genes mutados para cada cohorte. Inserto: Frecuencia de los casos de TNBC en las cohortes METABRIC, TCGA y Nik-Zainal.

Análisis de mutaciones accionables

De todas las mutaciones conductoras halladas en los tres estudios y en el nuestro realizamos un análisis de mutaciones accionables para distinguir tratamiento dirigidos ya aprobados por la FDA. De todos los casos 21% tenían por lo menos un tratamiento dirigido disponible y hasta 15% más de uno. La distribución de estos tratamientos consta de 31 tratamientos únicos o en combinación, estos se encuentran en 15 mutaciones accionables, donde cuatro de ellas han sido aprobadas por la FDA para el cáncer de mama, dos de ellas en cáncer de ovario, cinco en melanoma cutáneo, una en cáncer colorrectal, seis en cáncer de pulmón de células no pequeñas, una en cáncer de próstata y 10 más en otros 15 tipos de tumores (Figura 18).

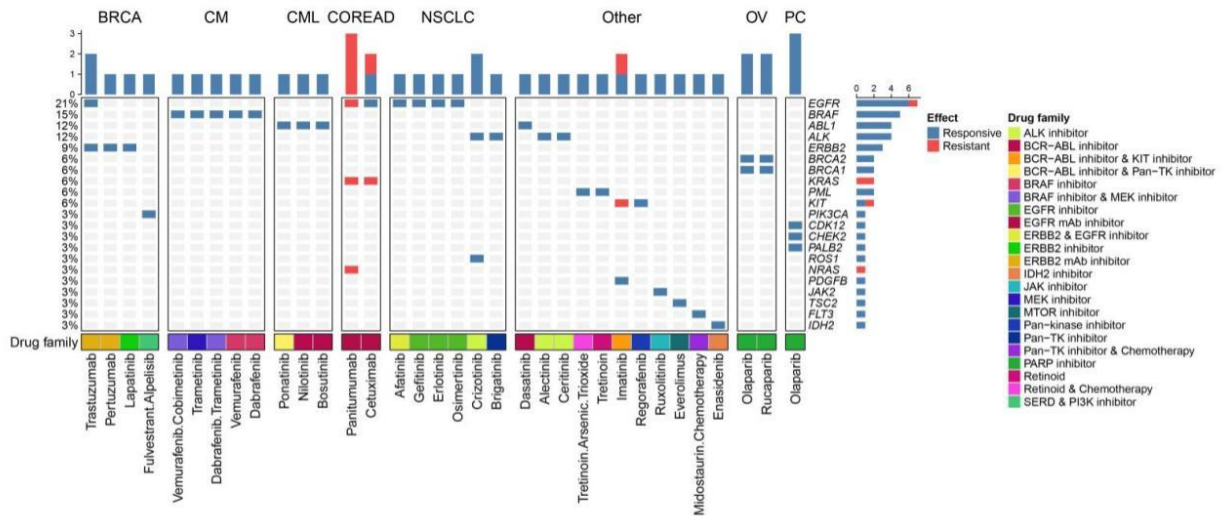


Fig 18. Los tumores TN presentaron mutaciones accionables específicas. Composición de los marcadores de respuesta o resistencia para todos los fármacos aprobados por la FDA en las cuatro cohortes y el tipo de tumores para los que han sido aprobados. BRCA: Cáncer de mama, CM: Melanoma cutáneo, LMC: Leucemia mieloide crónica, COREAD: Adenocarcinoma colorrectal, NSCLC: Pulmón de células no pequeñas, OV: Ovario, PC: Cáncer de próstata, otros tumores (LMA: Leucemia mieloide aguda, LPA: Leucemia promielocítica aguda, GIST: Estroma gastrointestinal, LUAD: adenocarcinoma de pulmón, MY: mielofibrosis, ST: estómago, GEJA: adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, HES: síndrome de avance hipereosinofílico, LLA: Leucemia linfoblástica aguda, SM: Síndrome mielodisplásico, SM: Mastocitosis sistémica, MDPS: Síndrome proliferativo mielodisplásico, AR: Angiomiolipoma renal, DFS: Dermatofibrosarcoma, ECL: Leucemia crónica eosinofílica, LUAD: Adenocarcinoma de pulmón, GCA: Astrocitoma de células gigantes). Se representa la vía objetivo.

4. Discusión

La diversidad molecular del cáncer de mama triple negativo se traduce en la misma gama de resultados clínicos. Esta heterogeneidad es el principal desafío para poder encontrar tratamiento exitoso y lograr la extensión de la sobrevida global y calidad de vida. En este trabajo, caracterizamos las alteraciones genómicas de una cohorte de casos de pacientes Mexicanas con este subtipo triple negativo y las comparamos con variables clínicas de relevancia. Después de evaluar la calidad de las muestras de toda la cohorte, analizamos un total de 29 muestras de tumores de mama, obtenidas al momento del diagnóstico, y por lo tanto libres de tratamiento. Encontramos un comportamiento similar entre las características clínicas de nuestra cohorte y otros estudios del subtipo triple negativo, entre los que destacan: el diagnóstico a temprana edad (en promedio a los 50.1 años) con un intervalo entre los 29 a los 68 años de edad; historial familiar de cáncer de mama en un 10% (Foulkes et al., 2010; Lara-Medina et al., 2011). A diferencia de otros estudios, observamos un peor pronóstico, con una sobrevida global a cinco años del 50%, muy por debajo a lo reportado por Reynoso en 2019 (Reynoso-Noverón et al., 2017). En el estudio de Reynoso, realizado en el INCAN con 4315 pacientes con CM, calculó 75% para el subtipo triple negativo, acorde con otros estudios, donde observaron sobrevida global por arriba del 75% (Spitale et al., 2009; Parise & Caggiano, 2014; Flores-Díaz et al., 2019). Es posible explicar la discrepancia con nuestros resultados debido a la selección sólo de tumores localmente avanzados. Más del 82% de nuestros casos se encontraban en estadios IIIa y IIIb, contrario al estudio de Reynoso, que tenía una distribución del 36.6% en estadios II y 36.2% en estadio III. La sobrevida disminuye conforme el estadio avanza, como se observó en un estudio que comparó el pronóstico entre pacientes con el subtipo triple negativo y no triple negativo, a partir de la base de datos del Programa de Vigilancia, Epidemiología, y Resultados Finales (SEER) de los Estados Unidos, donde la sobrevida global en estadios III para el subtipo triple negativo era <60% a los dos años (X. Li et al., 2017).

La terapia neoadyuvante impacta directamente en la sobrevida global. Para el cáncer de mama triple negativo no existe, por lo menos no sugerido por las guías de práctica clínica, terapia dirigida como alternativa durante la neoadyuvancia (Gradishar et al., 2019); aunque diferentes

tratamientos experimentales o fármacos ya aprobados en otros tipos de cáncer están siendo probados en este momento. De las 286 pruebas clínicas en cáncer de mama triple negativo que se están ejecutando en este momento (accesado en noviembre de 2021), solamente 76 han sido completadas con resultados disponibles (Home - ClinicalTrials.Gov, n.d.). De estas pruebas, los tratamientos basados en sales de platino, han sido los utilizados con mayor frecuencia para probarlos como intervención para la fase neoadyuvante (Omarini et al., 2018). Aunque algunos estudios han observado resultados alentadores, la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) no ha considerado seguro su uso en la etapa de neoadyuvancia, por la falta de evidencia clínica significativa (Gradishar et al., 2019). Para nuestro estudio clasificamos las pacientes en dos grupos, que dependía si habían recibido o no sales de platino en suma a su quimioterapia neoadyuvante convencional. Tomamos la RpC y la sobrevida global como marcadores subrogados para el pronóstico. En los casos donde se agregan las sales de platino, observamos mayor RpC, pero sin diferencias significativas entre los dos grupos. Otros estudios han observado el mismo comportamiento; algunos con una cohorte de tan sólo once pacientes con tumores triple negativos a los que se les agregó terapia neoadyuvante basada en sales de platino a su esquema de quimioterapia (H.R. Chang et al., 2010) y otros estudios con una muestra más representativa como el derivado del estudio clínico GeparSixto con 158 pacientes (Von Minckwitz et al., 2014) o la prueba aleatorizada en fase II con 94 pacientes, sin identificar diferencias significativas entre el control y el grupo al que se le agregó las sales de platino (H.R. Chang et al., 2010; Alba et al., 2012). No obstante otros estudios sí las encontraron: cohortes con 28 pacientes como el estudio desarrollado por Silver en 2010 (Silver et al., 2010) o 43 como el realizado por Roy en 2013 (Roy et al., 2013), también estudios con una n de 443 y 91 pacientes como el realizado por Sikov en 2015 y Zhang en 2016 respectivamente (Sikov et al., 2015; P. Zhang et al., 2016). De este último estudio cabe destacar que aunque encontraron una diferencia significativa en la RpC no la encontraron en la sobrevida global (P. Zhang et al., 2016).

La arquitectura mutacional de los tumores analizados mostraron diferencias importantes. La carga mutacional del tumor tuvo un intervalo de 30 mutaciones por megabase hasta una, con un promedio de 5 mut/Mb con un predominio de variaciones de nucleótido único (SNV). Este valor es mayor al reportado por Alexandrov y Vaca-Paniagua cuyos estudios se realizaron en 20

distintos tumores y tumores de mama triple negativos, respectivamente (1.2 mut/Mb y 1.7mut/Mb respectivamente); lo cual refleja la alta variabilidad a nivel mutacional en este tipo de tumores y puede ser influenciado por el número de muestras analizadas, más de cuatro mil para el estudio de Alexandrov y 12 en el estudio de Vaca-Paniagua (Alexandrov et al., 2013; Vaca-Paniagua et al., 2015). Además, identificamos mutaciones conductoras en 31 genes, de los cuales 13 son supresores tumorales, 8 son oncogenes y 8 genes tienen un papel ambiguo en la tumorigénesis. Los genes conductores más frecuentes fueron: *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA* y *PTEN*. Este resultado se comporta de manera consistente con grandes estudios genómicos en el cáncer de mama, incluyendo el de TCGA (Koboldt et al., 2012), METABRIC (Curtis et al., 2012; Pereira et al., 2016; Rueda et al., 2019), MSK-IMPACT (Zehir et al., 2017) y otros estudios de cáncer de mama triple negativo (Shah et al., 2012; Martelotto et al., 2015; Vaca-Paniagua et al., 2015; Ciriello et al., 2015; Jeong et al., 2017). Las mutaciones encontradas en *ERCC6*, *GNAI1* y *XPC* no han sido reportadas con anterioridad en este subtipo de cáncer de mama, lo cual es muestra de su gran heterogeneidad a nivel genético.. Cada una de estas mutaciones se encontró en distintos pacientes. Respecto a la función de estos genes mencionamos que *ERCC6* codifica para una proteína que participa en los mecanismos de reparación del DNA por escisión de nucleótidos, transcripción y remodelación de la cromatina (Ma et al., 2009). Aunque este gen no ha sido reportado con anterioridad en el cáncer de mama triple negativo, ha sido encontrado de manera importante en el cáncer de pulmón de células pequeñas (Gardner et al., 2017), y en distintos tipos de melanoma (Snyder et al., 2014; Akbani et al., 2015; Shain et al., 2015). *GNAI1* codifica para la subunidad alfa de un complejo de proteínas involucrado en la transducción de señales, transporte de proteínas, regulación del crecimiento celular y elongación de cadenas polipeptídicas (Eglen et al., 2007); las alteraciones de este gen están asociadas con la regulación de la vía de las MAPK en tumores donde se encuentra altamente mutado como el melanoma uveal (Van Raamsdonk et al., 2010). Las mutaciones en el gen de reparación por escisión de bases *XPC* son causa de la enfermedad autosómica recesiva xeroderma pigmentosum (Legerski & Peterson, 1992). La presencia de dicha alteración fue en la muestra con mayor hipermutabilidad. La falta de expresión de *XPC* ha sido encontrada de manera importante en melanomas (Feraudy et al., 2010).

Con un enfoque traslacional, evaluamos si los casos con mutaciones en *BRCA1/2* tenían una mayor sensibilidad a los platinos. Detectamos seis pacientes con mutaciones en estos dos genes; el 20% del total de nuestra cohorte. No podemos determinar si las alteraciones en estos dos genes fueron las causantes del cáncer de mama por la falta de estudios en la línea germinal, pero la fracción alélica en tres de las muestras, dos *BRCA2* y una en *BRCA1*, superan el 50% que podría indicar un origen germinal. A pesar de esto las mutaciones en estos dos importantes genes en los mecanismos de reparación han mostrado una alta sensibilidad a los agentes platinados (Omarini et al., 2018). No se encontró asociación con la RpC, periodo libre de enfermedad ni la sobrevida global, aunque en general las pacientes tratadas con sales de platino tenían mayor sobrevida global. Otros estudios genómicos en el cáncer de mama triple negativo, han reportado un mayor beneficio de los tratamientos complementados con sales de platino en los casos con deficiencia en *BRCA1/2* (Vollebergh et al., 2011, Jiang et al., 2016). También, la fenocopia de las alteraciones de *BRCA1/2*, nombrado BRCAness (Lord & Ashworth, 2016), ha mostrado estar asociada con una mayor sensibilidad a los tratamientos con platino al provocar deficiencias en la reparación por recombinación homóloga (Staaf et al., 2019). En este estudio no encontramos asociaciones significativas entre la RpC, sobrevida global y el periodo libre de enfermedad y la firma 3, que utilizamos como marcador subrogado para el fenotipo BRCAness. A pesar de que no existieron asociaciones entre las mutaciones, la firma 3 y la respuesta clínica y el pronóstico, la alta frecuencia de pacientes que mostraron esta alteración (31%, 9/29), sugiere que la combinación de las sales de platino y los inhibidores de PARP pueden ser potenciales tratamientos en la neoadyuvancia para el cáncer de mama triple negativo, esta combinación provoca un efecto de letalidad sintética al inhibir el mecanismo de reparación que podría el daño secundario a los agentes platinados (Ashworth & Lord, 2018). De manera importante existe un estudio clínico en curso para probar la seguridad y eficacia de esta combinación NCT03150576, que podría probar la eficacia de estos tratamientos en pacientes con el tipo de enfermedad que estamos estudiando (Home - ClinicalTrials.Gov, n.d.).

Adicionalmente, realizamos una caracterización general del perfil inmunológico en las pacientes de nuestro estudio, utilizando el infiltrado inflamatorio, evaluado por los patólogos, y la

presencia de mutaciones en genes asociados a la respuesta inmune. Las células tumorales son reconocidas por el sistema inmunológico por la expresión de neoantígenos (Novikov et al., 2020). El infiltrado está compuesto de distintas células como linfocitos T (CD8 y CD4) y macrófagos (D. S. Chen & Mellman, 2017). Se ha reportado que el subtipo triple negativo ha mostrado el infiltrado linfocitario más alto, debido al microambiente heterogéneo, y una respuesta inmune activa que involucra altos niveles de TILs ha sido asociada con un mejor pronóstico y una mejor respuesta al tratamiento (Adams et al., 2014). Aquí identificamos muestras con TILs altos y bajos a partir del reporte de patología. También identificamos seis genes asociados con la respuesta inmunológica de acuerdo con Hutchinson (Hutchinson et al., 2019) *STAT4* y *TLR6* con la respuesta Th1; *CIITA*, *TAGAP*, *PDCDI* y *TLR6* con la respuesta al IFN- γ ; por último *CD247* con la respuesta inflamatoria de las células T. A pesar de las tendencias que observamos, ni los TILs ni las alteraciones en los genes inmunológicos estuvieron asociadas de manera significativa con el desenlace clínico. Estos resultados difieren con los reportados con anterioridad, donde se ha encontrado una fuerte asociación entre el infiltrado inflamatorio y el pronóstico de las pacientes (Sherene et al., 2019).

Adicionalmente, encontramos 16 firmas mutacionales operacionales en los tumores analizados, ocho de ellas han sido reportadas previamente en cáncer de mama (firmas 1, 3, 5, 6, 8, 13, 18, 26) (Alexandrov et al., 2013; Nik-Zainal et al., 2016). La etiología de las firmas mutacionales halladas está relacionada con los procesos mutacionales por desaminación espontánea de la 5-metil citocina (firma 1), actividad de APOBEC (firma 13), daño en los mecanismos de reparación del DNA (firmas 3, 6, 15, 21 y 26), fallas en la polimerasa η (firma 9), exposición a mutágenos exógenos como el tabaco y las aflatoxinas (firma 4 y 24 respectivamente). Seis de las firmas (firmas 5, 8, 12, 16, 18 y 25) no tienen una etiología conocida hasta el momento. Cabe destacar que la firma 26 es atribuida a la deficiencia en el mecanismo de reparación del DNA por MMR que resulta en un estado de hipermutación (Nik-Zainal et al., 2016); las muestras con la carga tumoral más alta, tienen alteraciones en *MSH6* y *XPC*, pero no tienen firmas que evidencien la falla de MMR, similar a lo encontrado en otros estudios donde la firma de MMR fue encontrada en pacientes con un alto TMB (Barroso-Sousa et al., 2020).

Para entender mejor las vías de señalización alteradas en nuestro estudio agrupamos las vías obtenidas del enriquecimiento de los genes conductores filtrados, de acuerdo a ocho rasgos biológicos del cáncer. La vía donde participan mayor número de los genes conductores es la de proliferación, seguida por el ciclo celular. Muchos de los genes que presentaron variantes patogénicas intervienen en más de una vía. En nuestros datos resalta que el enriquecimiento, tanto de las vías del ciclo celular como de proliferación, corresponde a la biología de los tumores mamarios, y en particular de los triple negativos, consistentemente con el reporte de Shah (Shah et al., 2012). Otra de las vías asociadas con este subtipo y que detectamos alteradas en este trabajo son los mecanismos de reparación del DNA, y en específico el de reparación por recombinación homóloga han sido estudiados de manera acuciosa, se han realizado distintos estudios donde se busca encontrar un clasificador para este tipo de alteraciones. En 2011 Lehman clasificó estos tumores según su perfil de expresión, encontrando los fenotipos basales con una alta expresión de alteraciones secundarias a mutaciones por *BRCA1* y *BRCA2* (Lehmann et al., 2011). Posteriormente en 2016, utilizando las firmas mutacionales descritas por Alexandrov, Nik-Zainal observó una gran cantidad de tumores triple negativo con la expresión de la firma 3 que denotan daños secundarios a la falla en los mecanismos de reparación por recombinación homóloga (Nik-Zainal et al., 2016). Derivado de estos estudios se han intentado desarrollar marcadores moleculares para clasificar los tumores con afectaciones en este mecanismo de reparación que permitan predecir su sensibilidad a un tratamiento específico como las sales de platino o que se beneficien de estrategias como las de la lateralidad sintética (M. A. Vollebergh et al., 2011; Marieke A. Vollebergh et al., 2014; Telli et al., 2016; Staaf et al., 2019).

Una limitación importante de este estudio fue el número de pacientes incluidos, que impactó las asociaciones estadísticas entre las variables clínicas y moleculares. Aunque inicialmente contábamos con una cohorte de 97 muestras tumorales con información clínica asociada, aquellas que reunieron los criterios de calidad para la secuenciación solamente fueron 29. Otra de las limitaciones fue la falta de tejido normal para aparear las muestras, que no se encontraba disponible por la baja calidad de DNA en la mayoría de los casos. Estas restricciones impidieron la identificación de variantes patogénicas en línea germinal y diferencias entre polimorfismo y

mutación somática, lo que ocasiona la potencial imputación equivocada de variantes comunes como mutaciones somáticas, también puede resultar en la atribución incorrecta de mutaciones patogénicas producidas por la hematopoyesis clonal como mutaciones tumorales (Haybar et al., 2019). Sin embargo, para eliminar la imputación equivocada de variantes comunes como mutaciones somáticas eliminamos todas las variantes con una frecuencia lo suficientemente alta para ser considerada un polimorfismo (SNPs). Adicionalmente, este diseño no nos permitió realizar el análisis del estado de metilación, lo cual habría proporcionado evidencia sobre mecanismos moleculares complementarios a los genéticos. En este sentido, se conoce que la hipermetilación del promotor es un mecanismo conocido para la represión de genes supresores tumorales en el cáncer de mama, incluyendo *BRCA1*, *APC*, *CDHI*, *FANCF*, entre otros y puede dar un complemento de vías moleculares en la carcinogénesis independiente de las mutaciones (Jin et al., 2001; Birgisdottir et al., 2006; Caldeira et al., 2006; Wei et al., 2008). Además, la hipermetilación del promotor de *BRCA1* ha mostrado ser un evento temprano común en el desarrollo del cáncer de mama triple negativo, así como el silenciamiento de *RAD51C*, que se encuentra asociado con la firma 3 en el subtipo basal del cáncer de mama (Kawazu et al., 2017; Polak et al., 2017). Atenderemos las restricciones en el análisis de metilación en estudios futuros. Para el resto de las limitaciones utilizamos las siguientes estrategias. Filtramos variaciones naturales no patogénicas, utilizamos los repositorios de gnomAD y ESP6500 (Exome Variant Server, n.d.; Karczewski et al., 2019) en nuestro algoritmo de filtrado; estas bases de datos contienen de manera colectiva la información genética de 78, 205 individuos, incluyendo más de 17, 720 Latinos, la mayoría de ellos de origen Mexicano. Además, el repositorio de gnomAD no se encuentra sobrerrepresentado por variantes patogénicas, lo que le da soporte a su uso para estimar las variaciones normales (Song et al., 2016). Esta estrategia es ampliamente utilizada en estudios similares donde solamente se analizan los tumores para reducir el efecto de la falta del control normal (Frampton et al., 2013; Yamamoto et al., 2019). Por último comparamos nuestra cohorte con la del TCGA, METABRIC y el estudio de Nik-Zainal de 2016 (Curtis et al., 2012; Ciriello et al., 2015; Nik-Zainal et al., 2016; Pereira et al., 2016; Rueda et al., 2019), con el objetivo de validar nuestros resultados. Para que los datos pudieran ser equiparables, obtuvimos sólo los datos de las pacientes con tumores triple negativos, localmente avanzados. Aunque

nuestro tamaño muestral fue modesto, obtuvimos resultados semejantes a los de las otras cohortes analizadas, con una probabilidad de la supervivencia global menor al 50% a los cinco años del diagnóstico y un alto porcentaje de mutaciones en genes como *TP53*, *PIK3CA*, *BRCA1* y *BRCA2*, sin embargo, de manera importante no encontramos mutaciones en *BRCA2* en el estudio de METABRIC ni de *BRCA1* y *BRCA2* en la TCGA; cabe destacar que sólo ocupamos la información de las mutaciones genéticas, sin considerar variaciones en el número de copias o cambios epigenéticos. Por último, del total de mutaciones conductoras que encontramos tanto de nuestra cohorte, como de las otras tres que analizamos, encontramos 31 tratamientos o combinación de ellos en 17 familias de drogas. Estos manejos se encontraron en 15 mutaciones accionables, donde cuatro de ellas habían sido aprobadas por la FDA para cáncer de mama y dos de ellas para ovario, si se desconoce la complejidad genética de la enfermedad, estas serían las elecciones más cercanas que la medicina traslacional podría ofrecer a una paciente, con cáncer de mama triple negativo. Ampliar el espectro de los genes analizados en este y otros estudios nos permite conocer otras 23 alternativas que ya están aprobadas por la FDA en otros tipos de cáncer.

Diferentes estudios del CMTN han intentado identificar alteraciones moleculares y genómicas, pero hasta este momento no existe ningún marcador molecular único de utilidad clínica (Lehmann et al., 2011; M. A. Vollebergh et al., 2011; Curtis et al., 2012; Lips et al., 2013; Nik-Zainal et al., 2016; Jézéquel et al., 2019). Este es el resultado directo de la complejidad molecular de esta enfermedad. Nuestros hallazgos proveen evidencia de la notable heterogeneidad molecular y genómica del cáncer de mama triple negativo en una población pobremente representada en los estudios genómicos. Nuestros resultados sugieren que los atributos moleculares, más allá que el estado mutacional, necesitan ser considerados para una mejor identificación que permita explotar las vulnerabilidades subyacentes en el cáncer de mama triple negativo. Este compendio de vulnerabilidades moleculares puede ser dinámico a través de la evolución tumoral. Estudios clínicos más grandes son necesarios para definir la composición de marcadores moleculares con valor clínico.

5. Conclusiones

Los tumores triple negativo no tienen una característica particular que los defina, en realidad son tumores agrupados por su ausencia en la expresión de receptores, pero la etiología y su desarrollo pueden demostrar una gran variedad de fenotipos, por eso los estudios moleculares son de vital importancia para entenderlos.

En este estudio realizamos un perfil genómico exhaustivo del CMTN a través de la integración de datos del análisis moleculares, incluyendo mutaciones y la composición y proporción de las firmas mutacionales, con variables clínicas relevantes, que permitió una mejor caracterización de la complejidad molecular de la enfermedad. Estos tumores mostraron una heterogeneidad molecular sustancial. Aunque no encontramos significancia estadística en la asociación entre las variables moleculares y el desenlace clínico, nuestros hallazgos proveen información detallada sobre las alteraciones globales y particulares en el CMTN en una población poco representada. Este estudio contribuye a dilucidar de manera más amplia las alteraciones moleculares generales del CMTN, proporcionando información genómica precisa que puede ayudar a estudios futuros para mejorar el tratamiento, supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

Los hallazgos derivados del diagnóstico patológico ha permitido un acercamiento distinto a la enfermedad, con terapéuticas que aprovechan la expresión de receptores hormonales inhibiendo dichas vías para así detener la progresión tumoral. Los estudios genómicos, se suman a los descubrimientos histológicos, encontrando mecanismos en los cuales una intervención podría ser beneficioso para los pacientes, y permite explorar alternativas en los tumores triple negativos, que antes sólo se caracterizaban por la ausencia de la expresión de los receptores hormonales, pero que en la actualidad conocemos más de sus procesos biológicos.

6. Referencias

1. Adams, S., Gray, R. J., Demaria, S., Goldstein, L., Perez, E. A., Shulman, L. N., Martino, S., Wang, M., Jones, V. E., Saphner, T. J., Wolff, A. C., Wood, W. C., Davidson, N. E., Sledge, G. W., Sparano, J. A., & Badve, S. S. (2014). 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. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), 2959–2966. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.55.0491>
2. Aguilar-Cazares, D., Chavez-Dominguez, R., Carlos-Reyes, A., Lopez-Camarillo, C., Cruz, O. N. H. de la, & Lopez-Gonzalez, J. S. (2019). Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 1399. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01399>
3. Akbani, R., Akdemir, K. C., Aksoy, B. A., Albert, M., Ally, A., Amin, S. B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J. T., Ayala, B., Baboud, J., Balasundaram, M., Balu, S., Barnabas, N., Bartlett, J., Bartlett, P., Bastian, B. C., Baylin, S. B., Behera, M., ... Zou, L. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, 161(7), 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
4. Alba, E., Chacon, J. I., Lluch, A., Anton, A., Estevez, L., Cirauqui, B., Carrasco, E., Calvo, L., Segui, M. A., Ribelles, N., Alvarez, R., Sanchez-Munoz, A., Sanchez, R., Garcia-Asenjo, J. A. L., Rodriguez-Martin, C., Escudero, M. J., & Albanell, J. (2012). A randomized phase II trial of platinum salts in basal-like breast cancer patients in the neoadjuvant setting. Results from the GEICAM/2006-03, multicenter study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(2), 487–493. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2100-y>
5. Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Campbell, P. J., & Stratton, M. R. (2013). Deciphering Signatures of Mutational Processes Operative in Human Cancer. *Cell Reports*, 3(1), 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.008>
6. Alexandrov, Kim, JHaradhvala, Mi Ni Huang, Alvin Wei Tian Ng, Yang Wu, Arnoud Boot, Kyle R. Covington, Dmitry A. Gordenin, Erik N. Bergstrom, S. M. Ashiqul Islam, Nuria Lopez-Bigas, Leszek J. Klimczak, John R. McPherson, Sandro Morganello,

- Radhakrishnan Sabarinathan, David A. Wheeler, Ville Mustonen, PCAWG Mutational Signatures Working Group, Gad Getz, Steven G. Rozen, Michael R. Stratton, PCAWG Consortium (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*. 578, 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3>.
7. Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, J. T., Kucuk, O., Khan, G. N., Huang, G. S., Mi, S., Lee, H. Y., Reichrath, J., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., ... Shin, D. M. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S55–S77. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2015.02.005>
 8. Anderson, D. E. (1992). Familial versus sporadic breast cancer. *Cancer*, 70(4 S), 1740–1746. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920915\)70:4+<1740::AID-CNCR2820701615>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920915)70:4+<1740::AID-CNCR2820701615>3.0.CO;2-1)
 9. Ángeles-Llerenas, A., Torres-Mejía, G., Lazcano-Ponce, E., Uscanga-Sánchez, S., Mainero-Ratchelous, F., Hernández-Ávila, J. E., Morales-Carmona, E., & Hernández-Ávila, M. (2016). Effect of care-delivery delay on the survival of Mexican women with breast cancer. *Salud Publica de Mexico*, 58(2), 237–250. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7793>
 10. Arafeh, R., & Samuels, Y. (2019). PIK3CA in cancer: The past 30 years. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 59, pp. 36–49). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.002>
 11. Asatryan, A. D., & Komarova, N. L. (2016). Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. *Journal of Theoretical Biology*, 396, 1. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2015.11.028>
 12. Ashworth, A., & Lord, C. J. (2018). Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018 15:9, 15(9), 564–576. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0055-6>

13. Atanaskova, N., Keshamouni, V. G., Krueger, J. S., Schwartz, J. A., Miller, F., & Reddy, K. B. (2002). MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene*, 21(25), 4000–4008. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205506>
14. Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016). Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 6, Issue 5). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>
15. Barroso-Sousa, R., Jain, E., Cohen, O., Kim, D., Buendia-Buendia, J., Winer, E., Lin, N., Tolaney, S. M., & Wagle, N. (2020). Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. *Annals of Oncology*, 31(3), 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.010>
16. Basanta, D., & Anderson, A. R. A. (2017). Homeostasis back and forth: An ecoevolutionary perspective of cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028332>
17. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & 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. *Cancer*, 109(9), 1721–1728. <https://doi.org/10.1002/cncr.22618>
18. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 13, Issue 11, pp. 674–690). *Nat Rev Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
19. Birgisdottir, V., Stefansson, O. A., Bodvarsdottir, S. K., Hilmarsdottir, H., Jonasson, J. G., & Eyfjord, J. E. (2006). Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 8(4). <https://doi.org/10.1186/bcr1522>
20. Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes

and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>

21. Caldeira, J. R. F., Prando, É. C., Quevedo, F. C., Moraes Neto, F. A., Rainho, C. A., & Rogatto, S. R. (2006). CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-48>
22. Campbell, P. J., Getz, G., Korbel, J. O., Stuart, J. M., Jennings, J. L., Stein, L. D., Perry, M. D., Nahal-Bose, H. K., Ouellette, B. F. F., Li, C. H., Rheinbay, E., Nielsen, G. P., Sgroi, D. C., Wu, C. L., Faquin, W. C., Deshpande, V., Boutros, P. C., Lazar, A. J., Hoadley, K. A., ... Zhang, J. (2020). Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*, 578(7793), 82–93. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1969-6>
23. Cancer Genome Atlas Research Network, Timothy, L., Chirstopher, M., Li, D., Benjamin, R., AJ, M., A, R., K, H., TJ, T., PW, L., JD, B., LL, F., R, F., SE, H., J, K.-V., C, K., JM, K., DC, K., KL, K., ... G, E. (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 368(22), 2059–2074. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1301689>
24. Carl Cori, B. F., & Cori, G. T. (1925). THE CARBOHYDRATE METABOLISM OF TUMORS. II. CHANGES IN THE SUGAR, LACTIC ACID, AND CO-COMBINING POWER OF BLOOD PASSING THROUGH A TUMOR. *Journal of Biological Chemistry*, 65, 397–405.
25. cBioPortal for Cancer Genomics. (n.d.). Retrieved January 30, 2019, from http://www.cbioportal.org/study?id=brca_tcga_pub2015&tab=summary
26. Chakravarty, D., Gao, J., Phillips, S., Kundra, R., Zhang, H., Wang, J., Rudolph, J. E., Yaeger, R., Soumerai, T., Nissan, M. H., Chang, M. T., Chandarlapaty, S., Traina, T. A., Paik, P. K., Ho, A. L., Hantash, F. M., Grupe, A., Baxi, S. S., Callahan, M. K., ... Schultz, N. (2017). OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precision Oncology*, 1, 1–16. <https://doi.org/10.1200/po.17.00011>
27. Chang, H. R., Glaspy, J., Allison, M. A., Kass, F. C., Elashoff, R., Chung, D. U., & Gornbein, J. (2010). Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel

- and carboplatin-based neoadjuvant treatment. *Cancer*, 116(18), 4227–4237. <https://doi.org/10.1002/cncr.25309>
28. Chang, M. T., Asthana, S., Gao, S. P., Lee, B. H., Chapman, J. S., Kandoth, C., Gao, J. J., Socci, N. D., Solit, D. B., Olshen, A. B., Schultz, N., & Taylor, B. S. (2016). Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nature Biotechnology*, 34(2), 155–163. <https://doi.org/10.1038/nbt.3391>
29. Chang, M. T., Bhattarai, T. S., Schram, A. M., Bielski, C. M., Donoghue, M. T. A., Jonsson, P., Chakravarty, D., Phillips, S., Kandoth, C., Penson, A., Gorelick, A., Shamu, T., Patel, S., Harris, C., Gao, J. J., Sumer, S. O., Kundra, R., Razavi, P., Li, B. T., ... Taylor, B. S. (2018). Accelerating discovery of functional mutant alleles in cancer. *Cancer Discovery*, 8(2), 174–183. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0321>
30. Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. In *Nature* (Vol. 541, Issue 7637, pp. 321–330). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature21349>
31. Chen, H., Chong, W., Wu, Q., Yao, Y., Mao, M., & Wang, X. (2019). Association of LRP1B mutation with tumor mutation burden and outcomes in melanoma and non-small cell lung cancer patients treated with immune check-point blockades. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1113. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01113>
32. Ciriello, G., Gatza, M. L. L., Beck, A. H. H., Wilkerson, M. D. D., Rhie, S. K. K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau, C., Kandoth, C., Bowlby, R., Shen, H., Hayat, S., Fieldhouse, R., Lester, S. C. C., Tse, G. M. K. M. K., Factor, R. E. E., Collins, L. C. C., Allison, K. H. H., ... Perou, C. M. M. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*, 163(2), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>
33. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. In *Carcinogenesis* (Vol. 30, Issue 7, pp. 1073–1081). *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>

34. Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., Aparicio, S., Brenton, J. D., Ellis, I., ... Caldas, C. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>
35. Dawson, S. J., Rueda, O. M., Aparicio, S., & Caldas, C. (2013). A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. In *EMBO Journal* (Vol. 32, Issue 5, pp. 617–628). <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.19>
36. de Civetta, M. T. M., & Civetta, J. D. (2011). Carcinogenesis. In *Salud Publica de Mexico* (Vol. 53, Issue 5, pp. 405–414). Instituto Nacional de Salud Publica. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342011000500008>
37. Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What do you mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199(4), 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
38. Definition of pathologic complete response - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. (n.d.). Retrieved August 3, 2021, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/pathologic-complete-response>
39. Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer* 2018 17:1, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0782-4>
40. Eglen, R. M., Bosse, R., & Reisine, T. (2007). Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. In *Assay and Drug Development Technologies* (Vol. 5, Issue 3, pp. 425–451). *Assay Drug Dev Technol.* <https://doi.org/10.1089/adt.2007.062>
41. Exome Variant Server. (n.d.). Retrieved January 28, 2020, from <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>
42. Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii,

- H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35(Suppl), S25. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2015.02.006>
43. Feraudy, S. de, Ridd, K., Richards, L. M., Kwok, P.-Y., Revet, I., Oh, D., Feeney, L., & Cleaver, J. E. (2010). The DNA Damage-Binding Protein XPC Is a Frequent Target for Inactivation in Squamous Cell Carcinomas. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 555. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.090925>
44. Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. In *Science* (Vol. 357, Issue 6348). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
45. Flores-Díaz, D., Arce, C., Flores-Luna, L., Reynoso-Noveron, N., Lara-Medina, F., Matus, J. A., Bargallo-Rocha, E., Pérez, V., Villarreal-Garza, C., Cabrera-Galeana, P., & Mohar, A. (2019). Impact of invasive lobular carcinoma on long-term outcomes in Mexican breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 176(1), 243–249. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05234-8>
46. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
47. Frampton, G. M., Fichtenholtz, A., Otto, G. A., Wang, K., Downing, S. R., He, J., Schnall-Levin, M., White, J., Sanford, E. M., An, P., Sun, J., Juhn, F., Brennan, K., Iwanik, K., Maillet, A., Buell, J., White, E., Zhao, M., Balasubramanian, S., ... Yelensky, R. (2013). Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 31(11), 1023–1031. <https://doi.org/10.1038/nbt.2696>
48. Gardner, E. E., Lok, B. H., Schneeberger, V. E., Desmeules, P., Miles, L. A., Arnold, P. K., Ni, A., Khodos, I., de Stanchina, E., Nguyen, T., Sage, J., Campbell, J. E., Ribich, S., Rekhman, N., Dowlati, A., Massion, P. P., Rudin, C. M., & Poirier, J. T. (2017). Chemosensitive Relapse in Small Cell Lung Cancer Proceeds through an EZH2-SLFN11 Axis. *Cancer Cell*, 31(2), 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.006>

49. Gonzalez-Perez, A., Perez-Llamas, C., Deu-Pons, J., Tamborero, D., Schroeder, M. P., Jene-Sanz, A., Santos, A., & Lopez-Bigas, N. (2013). IntOGen-mutations identifies cancer drivers across tumor types. *Nature Methods*, 10(11), 1081–1084. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2642>
50. Gonzalez, H., Hagerling, C., & Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development*, 32(19–20), 1267. <https://doi.org/10.1101/GAD.314617.118>
51. Gradishar, W. J., Abraham, J., Aft, R., Agnese, D., Allison, K. H., Blair, S. L., Burstein, H. J., Dang, C., Elias, A. D., Giordano, S. H., Goetz, M. P., Goldstein, L. J., Isakoff, S. J., Krishnamurthy, J., Lyons, J., Kelly Marcom, P., Matro, J., Mayer, I. A., Moran, M. S., ... Burns, J. (2019). NCCN Guidelines Version 3.2019 Breast Cancer NCCN Guidelines Panel Disclosures Continue † Medical oncology ¶ Surgery/Surgical oncology § Radiation oncology/ Radiotherapy ≠ Pathology ‡ Hematology/Hematology oncology φ Diagnostic/Interventional radiology ¥ Patient advocate P Internal medicine Y Reconstructive surgery * Discussion Section Writing Committee.
52. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025>
53. GSEA. (n.d.). Retrieved April 18, 2018, from <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>
54. Guo, G., Gong, K., Wohlfeld, B., Hatanpaa, K. J., Zhao, D., & Habib, A. A. (2015). Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Research*, 75(17), 3436–3441. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0989>
55. Haigis, K. M. (2017). KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. In *Trends in Cancer* (Vol. 3, Issue 10, pp. 686–697). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.006>
56. Hajdu, S. I., & Vadmal, M. (2013). A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 6. *Cancer*, 119(23), 4058–4082. <https://doi.org/10.1002/CNCR.28319>
57. Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J.,

- ... Wolff, A. C. (2010). Frequently Asked Questions Recommendations for HER2 Testing in Breast Cancer: ASCO-CAP Clinical Practice Guideline Update Background Questions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 134(6), 907–922. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-134.6.907>
58. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
59. Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. In *Clinical Anatomy* (Vol. 26, Issue 1, pp. 29–48). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
60. Haybar, H., Shahrabi, S., Ghanavat, M., & Khodadi, E. (2019). Clonal hematopoiesis: Genes and underlying mechanisms in cardiovascular disease development. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 6, pp. 8396–8401). *J Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1002/jcp.27752>
61. Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 2013 12:1, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
62. Home - ClinicalTrials.gov. (n.d.). Retrieved August 4, 2021, from <https://clinicaltrials.gov/>
63. Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
64. Hurst, J. H. (2014). Pioneering geneticist Mary-Claire King receives the 2014 Lasker~Koshland Special Achievement Award in Medical Science. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4148–4151. <https://doi.org/10.1172/JCI78507>
65. Hutchinson, K. E., Yost, S. E., Chang, C.-W., Johnson, R. M., Carr, A. R., McAdam, P. R., Halligan, D. L., Chang, C.-C., Schmolze, D., Liang, J., & Yuan, Y. (2019). Comprehensive Profiling of Poor-Risk Paired Primary and Recurrent Triple-Negative Breast Cancers Reveals Immune Phenotype Shifts. *Clinical Cancer Research*, *clincanres.1773.2019*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-19-1773>

66. Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., & Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S13073-016-0324-X>
67. Jensen, E. V., & De Sombre, E. R. (1969). Oestrogen-receptor interaction in target tissues. *The Biochemical Journal*, 115(5). <https://doi.org/10.1042/bj1150028P>
68. Jeong, H. M., Kim, R. N., Kwon, M. J., Oh, E., Han, J., Lee, S. K., Choi, J. S., Park, S., Nam, S. J., Gong, G. Y., Nam, J. W., Choi, D. H., Lee, H., Nam, B. H., Choi, Y. La, & Shin, Y. K. (2017). Targeted exome sequencing of Korean triple-negative breast cancer reveals homozygous deletions associated with poor prognosis of adjuvant chemotherapy-treated patients. *Oncotarget*, 8(37), 61538–61550. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18618>
69. Jézéquel, P., Kerdraon, O., Hondermarck, H., Guérin-Charbonnel, C., Lasla, H., Gouraud, W., Canon, J.-L., Gombos, A., Dalenc, F., Delalogue, S., Lemonnier, J., Loussouarn, D., Verrièle, V., & Campone, M. (2019). Identification of three subtypes of triple-negative breast cancer with potential therapeutic implications. *Breast Cancer Research*, 21(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1148-6>
70. Jiang, T., Shi, W., Wali, V. B., Pongor, L. S., Li, C., Lau, R., Györfy, B., Lifton, R. P., Symmans, W. F., Pusztai, L., & Hatzis, C. (2016). Predictors of Chemosensitivity in Triple Negative Breast Cancer: An Integrated Genomic Analysis. *PLOS Medicine*, 13(12), e1002193. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002193>
71. Jin, Z., Tamura, G., Tsuchiya, T., Sakata, K., Kashiwaba, M., Osakabe, M., & Motoyama, T. (2001). Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *British Journal of Cancer*, 85(1), 69–73. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1853>
72. Joshi, H., & Press, M. F. (2018). Molecular Oncology of Breast Cancer. *The Breast*, 282-307.e5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2>
73. Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 239. <https://doi.org/10.1038/NRC2618>

74. Karakosta Agathi, Golias Christos, Charalabopoulos Alexandros, & Peschos D. (2005). Genetic models of human cancer as a multistep process. Paradigm models of colorectal cancer, breast cancer, and chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukaemia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 24(4), 505–514. https://www.researchgate.net/publication/51374044_Genetic_models_of_human_cancer_as_a_multistep_process_Paradigm_models_of_colorectal_cancer_breast_cancer_and_chronic_myelogenous_and_acute_lymphoblastic_leukaemia
75. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... MacArthur, D. G. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *BioRxiv*, 531210. <https://doi.org/10.1101/531210>
76. Kawanishi, S., Ohnishi, S., Ma, N., Hiraku, Y., & Murata, M. (2017). Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS18081808>
77. Kawazu, M., Kojima, S., Ueno, T., Totoki, Y., Nakamura, H., Kunita, A., Qu, W., Yoshimura, J., Soda, M., Yasuda, T., Hama, N., Saito-Adachi, M., Sato, K., Kohsaka, S., Sai, E., Ikemura, M., Yamamoto, S., Ogawa, T., Fukayama, M., ... Mano, H. (2017). Integrative analysis of genomic alterations in triple-negative breast cancer in association with homologous recombination deficiency. *PLoS Genetics*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006853>
78. Kidane, D., Chae, W. J., Czocho, J., Eckert, K. A., Glazer, P. M., Bothwell, A. L. M., & Sweasy, J. B. (2014). Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(2), 116. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.875514>
79. Knudson, A. G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/PNAS.68.4.820>

80. Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H.-J. E., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
81. Kwan, M. L., Kushi, L. H., Weltzien, E., Maring, B., Kutner, S. E., Fulton, R. S., Lee, M. M., Ambrosone, C. B., & Cnaan, B. J. (2009). Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Research*, 11(3), R31. <https://doi.org/10.1186/bcr2261>
82. Langie, S. A. S., Koppen, G., Desaulniers, D., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Azqueta, A., Bisson, W. H., Brown, D., Brunborg, G., Charles, A. K., Chen, T., Colacci, A., Darroudi, F., Forte, S., Gonzalez, L., Hamid, R. A., Knudsen, L. E., Leyns, L., ... Collins, A. R. (2015). Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 36(Suppl 1), S61. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGV031>
83. Lara-Medina, F., Pérez-Sánchez, V., Saavedra-Pérez, D., Blake-Cerda, M., Arce, C., Motola-Kuba, D., Villarreal-Garza, C., González-Angulo, A. M., Bargalló, E., Aguilar, J. L., Mohar, A., & Arrieta, Ó. (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. *Cancer*, 117(16), 3658–3669. <https://doi.org/10.1002/cncr.25961>
84. Legerski, R., & Peterson, C. (1992). Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature*, 359(6390), 70–73. <https://doi.org/10.1038/359070a0>
85. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
86. Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>

87. Li, X., Yang, J., Peng, L., Sahin, A. A., Huo, L., Ward, K. C., O'Regan, R., Torres, M. A., & Meisel, J. L. (2017). Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 161(2), 279–287. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4059-6>
88. Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.12.001>
89. Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessey, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Puztai, L. (2008). Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8), 1275–1281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
90. Lin, R., Zhang, C., Zheng, J., Tian, D., Lei, Z., Chen, D., Xu, Z., & Su, M. (2016). Chronic inflammation-associated genomic instability paves the way for human esophageal carcinogenesis. *Oncotarget*, 7(17), 24564. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.8356>
91. Lips, E. H., Mulder, L., Oonk, A., Van Der Kolk, L. E., Hogervorst, F. B. L., Imholz, A. L. T., Wesseling, J., Rodenhuis, S., & Nederlof, P. M. (2013). Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *British Journal of Cancer*, 108(10), 2172–2177. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.144>
92. Lobry, C., Oh, P., & Aifantis, I. (2011). Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1931. <https://doi.org/10.1084/JEM.20111855>
93. López-Carrillo Lizbeth, Torres-Sánchez Luisa, López-Cervantes Malaquíás, R.-N. C. (2001). Identificación de lesiones mamarias malignas en México. In *Salud Pública de México* (Vol. 43, Issue 3). [Secretaría de Salubridad y Asistencia]. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342001000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

94. Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110–120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
95. Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 9, pp. 1745–1770). *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
96. Lyons, L. S., Rao, S., Balkan, W., Faysal, J., Maiorino, C. A., & Burnstein, K. L. (2008). Ligand-Independent Activation of Androgen Receptors by Rho GTPase Signaling in Prostate Cancer. *Molecular Endocrinology*, 22(3), 597. <https://doi.org/10.1210/ME.2007-0158>
97. Ma, H., Hu, Z., Wang, H., Jin, G., Wang, Y., Sun, W., Chen, D., Tian, T., Jin, L., Wei, Q., Lu, D., Huang, W., & Shen, H. (2009). ERCC6/CSB gene polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Letters*, 273(1), 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.002>
98. Macé, A., Kutalik, Z., & Valsesia, A. (2018). Copy number variation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1793, pp. 231–258). *Humana Press Inc*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7868-7_14
99. Maciejowski, J., & Lange, T. de. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 18:3, 18(3), 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171>
100. Malorni, L., Shetty, P. B., De Angelis, C., Hilsenbeck, S., Rimawi, M. F., Elledge, R., Osborne, C. K., De Placido, S., & Arpino, G. (2012). Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(3), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2315-y>
101. Martelotto, L. G., De Filippo, M. R., Ng, C. K., Natrajan, R., Fuhrmann, L., Cyrta, J., Piscuoglio, S., Wen, H. C., Lim, R. S., Shen, R., Schultheis, A. M., Wen, Y. H., Edelweiss, M., Mariani, O., Stenman, G., Chan, T. A., Colombo, P. E., Norton, L., Vincent-Salomon, A., ... Weigelt, B. (2015). Genomic landscape of adenoid cystic

- carcinoma of the breast. *Journal of Pathology*, 237(2), 179–189.
<https://doi.org/10.1002/path.4573>
102. Martínez-Jiménez, F., Muiños, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., Mularoni, L., Pich, O., Bonet, J., Kranas, H., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2020). A compendium of mutational cancer driver genes. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 20, Issue 10, pp. 555–572). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41568-020-0290-x>
103. McCready, J., Arendt, L. M., Rudnick, J. A., & Kuperwasser, C. (2010). The contribution of dynamic stromal remodeling during mammary development to breast carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 2010 12:3, 12(3), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/BCR2578>
104. McDaniel, S. M., Rumer, K. K., Biroc, S. L., Metz, R. P., Singh, M., Porter, W., & Schedin, P. (2006). Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *American Journal of Pathology*, 168(2), 608–620.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050677>
105. Mercer, A. J. (2018). Updating the epidemiological transition model. *Epidemiology and Infection*, 146(6), 680–687. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000572>
106. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5149>
107. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*, 3, 83.
<https://doi.org/10.2147/hp.s93413>
108. Newman, B., Austin, M. A., Lee, M., & King, M. C. (1988). Inheritance of human breast cancer: Evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(9), 3044–3048. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.3044>
109. Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S.,

- Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringnér, M., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47–54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>
110. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213. <https://doi.org/10.2147/VHRM.2006.2.3.213>
111. Novikov, N. M., Zolotaryova, S. Y., Gautreau, A. M., & Denisov, E. V. (2020). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. In *British Journal of Cancer*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01149-0>
112. O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2018). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018 16:3, 16(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
113. Omarini, C., Guaitoli, G., Pipitone, S., Moscetti, L., Cortesi, L., Cascinu, S., & Piacentini, F. (2018). Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going. *Cancer Management and Research*, 10, 91–103. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S146658>
114. Pandey, K., An, H., Kim, S. K., Lee, S. A., Kim, S., Lim, S. M., Kim, G. M., Sohn, J., & Moon, Y. W. (2019). Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. *International Journal of Cancer*, 145(5), 1179. <https://doi.org/10.1002/IJC.32020>
115. Parise, C. A., & Caggiano, V. (2014). Breast cancer survival defined by the er/pr/her2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/469251>
116. Parmigiani, E., Taylor, V., & Giachino, C. (2020). Oncogenic and Tumor-Suppressive Functions of NOTCH Signaling in Glioma. *Cells*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/CELLS9102304>

117. Pathologic Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer: Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval | FDA. (n.d.). Retrieved January 19, 2020, from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pathologic-complete-response-neoadjuvant-treatment-high-risk-early-stage-breast-cancer-use-endpoint#search='FDA+draft+guidance+neoadjuvant'>
118. penetrance | Learn Science at Scitable. (n.d.). Retrieved February 15, 2021, from <https://www.nature.com/scitable/definition/penetrance-69/>
119. Pereira, B., Chin, S. F., Rueda, O. M., Vollan, H. K. M., Provenzano, E., Bardwell, H. A., Pugh, M., Jones, L., Russell, R., Sammut, S. J., Tsui, D. W. Y., Liu, B., Dawson, S. J., Abraham, J., Northen, H., Peden, J. F., Mukherjee, A., Turashvili, G., Green, A. R., ... Caldas, C. (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11479>
120. Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
121. Población. Número de habitantes. (n.d.). Retrieved February 1, 2021, from <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/defunciones.aspx?tema=P>
122. Polak, P., Kim, J., Braunstein, L. Z., Karlic, R., Haradhavala, N. J., Tiao, G., Rosebrock, D., Livitz, D., Kübler, K., Mouw, K. W., Kamburov, A., Maruvka, Y. E., Leshchiner, I., Lander, E. S., Golub, T. R., Zick, A., Orthwein, A., Lawrence, M. S., Batra, R. N., ... Getz, G. (2017). A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nature Genetics*, 49(10), 1476–1486. <https://doi.org/10.1038/ng.3934>

123. Potter, M., Newport, E., & Morten, K. J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1499–1505. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>
124. Pucci, B., Kasten, M., & Giordano, A. (2000). Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2(4), 291. <https://doi.org/10.1038/SJ.NEO.7900101>
125. Ren, D., Tu, H. C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. D., & Cheng, E. H. Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science*, 330(6009), 1390–1393. <https://doi.org/10.1126/science.1190217>
126. Residual Cancer Burden Calculator. (n.d.). Retrieved April 7, 2021, from <http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3>
127. Reynoso-Noverón, N., Villarreal-Garza, C., Soto-Perez-de-Celis, E., Arce-Salinas, C., Matus-Santos, J., Ramírez-Ugalde, M. T., Alvarado-Miranda, A., Cabrera-Galeana, P., Meneses-García, A., Lara-Medina, F., Bargalló-Rocha, E., & Mohar, A. (2017). Clinical and Epidemiological Profile of Breast Cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 757–764. <https://doi.org/10.1200/jgo.2016.007377>
128. Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*, 13(6). <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2020.100773>
129. Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. In *Nature Biotechnology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 24–26). <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
130. Rosen, J. M., & Roarty, K. (2014). Paracrine signaling in mammary gland development: what can we learn about intratumoral heterogeneity? *Breast Cancer Research* 2014 16:1, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/BCR3610>
131. Rosenthal, R., McGranahan, N., Herrero, J., Taylor, B. S., & Swanton, C. (2016). DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biology*, 17, 31. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0893-4>

132. Roy, V., Pockaj, B. A., Allred, J. B., Apsey, H., Northfelt, D. W., Nikceovich, D., Mattar, B., & Perez, E. A. (2013). A phase II trial of docetaxel and carboplatin administered every 2 weeks as preoperative therapy for stage II or III breast cancer : NCCTG study N0338. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 36(6), 540–544. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e318256f619>
133. Rueda, O. M., Sammut, S. J., Seoane, J. A., Chin, S. F., Caswell-Jin, J. L., Callari, M., Batra, R., Pereira, B., Bruna, A., Ali, H. R., Provenzano, E., Liu, B., Parisien, M., Gillett, C., McKinney, S., Green, A. R., Murphy, L., Purushotham, A., Ellis, I. O., ... Curtis, C. (2019). Dynamics of breast-cancer relapse reveal late-recurring ER-positive genomic subgroups. *Nature*, 567(7748), 399–404. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1007-8>
134. Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G. M., Ashley, A. K., & Ashley, R. L. (2016). Progesterin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors. *Gene*, 592(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.044>
135. Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. In *Science* (Vol. 331, Issue 6024, pp. 1565–1570). *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
136. Serova, O. V., Chachina, N. A., Gantsova, E. A., Popova, N. V., Petrenko, A. G., & Deyev, I. E. (2019). Autophosphorylation of Orphan Receptor ERBB2 Can Be Induced by Extracellular Treatment with Mildly Alkaline Media. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS20061515>
137. Shah, S. P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., Bashashati, A., Prentice, L. M., Khattra, J., Burleigh, A., Yap, D., Bernard, V., McPherson, A., Shumansky, K., Crisan, A., ... Aparicio, S. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486(7403), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature10933>
138. Shain, A. H., Garrido, M., Botton, T., Talevich, E., Yeh, I., Sanborn, J. Z., Chung, J., Wang, N. J., Kakavand, H., Mann, G. J., Thompson, J. F., Wiesner, T., Roy, R., Olshen,

- A. B., Gagnon, A., Gray, J. W., Huh, N., Hur, J. S., Busam, K. J., ... Bastian, B. C. (2015). Exome sequencing of desmoplastic melanoma identifies recurrent NFKBIE promoter mutations and diverse activating mutations in the MAPK pathway. *Nature Genetics*, 47(10), 1194–1199. <https://doi.org/10.1038/ng.3382>
139. Sherene Sherene Loi, Damien Drubay, Sylvia Adams, Giancarlo Pruneri, Prudence A. Francis, Magali Lacroix-Triki, Heikki Joensuu, Maria Vittoria Dieci, Sunil Badve, Sandra Demaria, Robert Gray, Elisabetta Munzone, Jerome Lemonnier, Christos Sotiriou, Martine J. Piccart, Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen, Andrea Vingiani, Kathryn Gray, Fabrice Andre, Carsten Denkert, Roberto Salgado, and Stefan Michiels (2019). Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, no.7 559-569. DOI: 10.1200/JCO.18.01010
140. Sikov, W. M., Berry, D. A., Perou, C. M., Singh, B., Cirincione, C. T., Tolaney, S. M., Kuzma, C. S., Pluard, T. J., Somlo, G., Port, E. R., Golshan, M., Bellon, J. R., Collyar, D., Hahn, O. M., Carey, L. A., Hudis, C. A., & Winer, E. P. (2015). Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*, 33(1), 13–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>
141. Silver, D. P., Richardson, A. L., Eklund, A. C., Wang, Z. C., Szallasi, Z., Li, Q., Juul, N., Leong, C.-O. O., Calogrias, D., Buraimoh, A., Fatima, A., Gelman, R. S., Ryan, P. D., Tung, N. M., De Nicolo, A., Ganesan, S., Miron, A., Colin, C., Sgroi, D. C., ... Garber, J. E. (2010). Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(7), 1145–1153. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4725>
142. Siriwardana, G., Bradford, A., Coy, D., & Zeitler, P. (2006). Autocrine/Paracrine Regulation of Breast Cancer Cell Proliferation by Growth Hormone Releasing Hormone via Ras, Raf, and Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*, 20(9), 2010–2019. <https://doi.org/10.1210/ME.2005-0001>

143. Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., ... Chan, T. A. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 371(23), 2189–2199. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1406498>
144. Song, W., Gardner, S. A., Hovhannisyan, H., Natalizio, A., Weymouth, K. S., Chen, W., Thibodeau, I., Bogdanova, E., Letovsky, S., Willis, A., & Nagan, N. (2016). Exploring the landscape of pathogenic genetic variation in the ExAC population database: Insights of relevance to variant classification. *Genetics in Medicine*, 18(8), 850–854. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.180>
145. Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2008). Theories of carcinogenesis: An emerging perspective. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 372–377). *Semin Cancer Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.012>
146. Sonugür, F. G., & Akbulut, H. (2019). The Role of Tumor Microenvironment in Genomic Instability of Malignant Tumors. *Frontiers in Genetics*, 0(OCT), 1063. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.01063>
147. Soto-Perez-de-Celis, E., & Chavarri-Guerra, Y. (2016). National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001–2011: Analysis of a population-based database. *Cancer Epidemiology*, 41, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.01.007>
148. Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzucchelli, L., & Bordoni, A. (2009). Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: Clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Annals of Oncology*, 20(4), 628–635. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn675>
149. Spugnesi, L., Gabriele, M., Scarpitta, R., Tancredi, M., Maresca, L., Gambino, G., Collavoli, A., Aretini, P., Bertolini, I., Salvadori, B., Landucci, E., Fontana, A., Rossetti, E., Roncella, M., Naccarato, G. A., & Caligo, M. A. (2016). Germline mutations in DNA

- repair genes may predict neoadjuvant therapy response in triple negative breast patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 55(12), 915–924. <https://doi.org/10.1002/gcc.22389>
150. Staaf, J., Glodzik, D., Bosch, A., Vallon-Christersson, J., Reuterswård, C., Häkkinen, J., Degasperi, A., Amarante, T. D., Saal, L. H., Hegardt, C., Stobart, H., Ehinger, A., Larsson, C., Rydén, L., Loman, N., Malmberg, M., Kvist, A., Ehrencrona, H., Davies, H. R., ... Nik-Zainal, S. (2019). Whole-genome sequencing of triple-negative breast cancers in a population-based clinical study. *Nature Medicine*, 25(10), 1526–1533. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0582-4>
151. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
152. Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: It takes a village. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 8, pp. 473–483). *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3971>
153. Takaku, M., Grimm, S. A., & Wade, P. A. (2015). GATA3 in breast cancer: Tumor suppressor or oncogene? In *Gene Expression* (Vol. 16, Issue 4, pp. 163–168). *Gene Expr*. <https://doi.org/10.3727/105221615X14399878166113>
154. Tamborero, D., Rubio-Perez, C., Deu-Pons, J., Schroeder, M. P., Vivancos, A., Rovira, A., Tusquets, I., Albanell, J., Rodon, J., Tabernero, J., de Torres, C., Dienstmann, R., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2018). Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Medicine*, 10(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0531-8>
155. Tan, H., Zhong, Y., & Pan, Z. (2009). Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 2009 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-31>
156. Telli, M. L., Timms, K. M., Reid, J., Hennessy, B., Mills, G. B., Jensen, K. C., Szallasi, Z., Barry, W. T., Winer, E. P., Tung, N. M., Isakoff, S. J., Ryan, P. D., Greene-Colozzi, A., Gutin, A., Sangale, Z., Iliev, D., Neff, C., Abkevich, V., Jones, J. T.,

- ... Richardson, A. L. (2016). Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3764–3773. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2477>
157. Tijhuis, A. E., Johnson, S. C., & McClelland, S. E. (2019). The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity. *Molecular Cytogenetics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13039-019-0429-1>
158. Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6331), 1330. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF9011>
159. Trisciuglio, D., Tupone, M. G., Desideri, M., Martile, M. Di, Gabellini, C., Buglioni, S., Pallocca, M., Alessandrini, G., D'Aguanno, S., & Bufalo, D. Del. (2017). BCL-X L overexpression promotes tumor progression-associated properties. *Cell Death & Disease* 2017 8:12, 8(12), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0055-y>
160. Unar-Munguía, M., Meza, · Rafael, Colchero, · M Arantxa, Torres-Mejía, G., & Teresita Gonzalez De Cosío, ·. (2017). Economic and disease burden of breast cancer associated with suboptimal breastfeeding practices in Mexico. *Cancer Causes & Control*, 28, 1381–1391. <https://doi.org/10.1007/s10552-017-0965-0>
161. Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K., Sanchez-Dominguez, C. N., Cardona-Huerta, S., Muñoz-Maldonado, G. E., Ruiz-Flores, P., Barcenas-Walls, J. R., Osuna-Rosales, L. E., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J. F., Valero-Gomez, J., Gomez-Macias, G. S., Barbosa-Quintana, A., Barboza-Quintana, O., Garza-Guajardo, R., & Ortiz-Lopez, R. (2019). Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from Northeastern Mexico. *Oncology Letters*, 17(3), 3581. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.9984>
162. Vaca-Paniagua, F., Alvarez-Gomez, R. M., Maldonado-Martínez, H. A., Pérez-Plasencia, C., Fragoso-Ontiveros, V., Lasa-Gonsebatt, F., Herrera, L. A., Cantú, D., Bargallo-Rocha, E., Mohar, A., Durand, G., Forey, N., Voegelé, C., Vallée, M., Le Calvez-Kelm, F., McKay, J., Ardin, M., Villar, S., Zavadil, J., & Olivier, M. (2015).

- 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*, 10(5), e0126762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126762>
163. Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., Banks, E., Garimella, K. V., Altshuler, D., Gabriel, S., & DePristo, M. A. (2013). From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In *Current Protocols in Bioinformatics* (Vol. 43, pp. 11.10.1-11.10.33). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
164. Van Der Groep, P., Van Der Wall, E., & Van Diest, P. J. (2011). Pathology of hereditary breast cancer. *Cellular Oncology*, 34(2), 71–88. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0010-3>
165. Van Raamsdonk, C. D., Griewank, K. G., Crosby, M. B., Garrido, M. C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenauf, A. C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., Sozen, M. M., Baimukanova, G., Roy, R., Heguy, A., Dolgalev, I., Khanin, R., Busam, K., Speicher, M. R., O'Brien, J., & Bastian, B. C. (2010). Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2191–2199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000584>
166. Vargas, A., López, M., Lillo, C., & Vargas, M. J. (2012). El papiro de Edwin Smith y su trascendencia médica y odontológica. *Revista Medica de Chile*, 140(10), 1357–1362. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012001000020>
167. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. In *Trends in Genetics* (Vol. 9, Issue 4, pp. 138–141). *Trends Genet.* [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90209-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90209-Z)
168. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Kinzler, K. W., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
169. Vollebergh, M. A., Lips, E. H., Nederlof, P. M., Wessels, L. F. A., Schmidt, M. K., van Beers, E. H., Cornelissen, S., Holtkamp, M., Froklage, F. E., de Vries, E. G. E.,

- Schrama, J. G., Wesseling, J., van de Vijver, M. J., van Tinteren, H., de Bruin, M., Hauptmann, M., Rodenhuis, S., & Linn, S. C. (2011). An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 22(7), 1561–1570. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq624>
170. Vollebergh, Marieke A., Lips, E. H., Nederlof, P. M., Wessels, L. F. A., Wesseling, J., vd Vijver, M. J., de Vries, E. G. E., van Tinteren, H., Jonkers, J., Hauptmann, M., Rodenhuis, S., & Linn, S. C. (2014). Genomic patterns resembling BRCA1- and BRCA2-mutated breast cancers predict benefit of intensified carboplatin-based chemotherapy. *Breast Cancer Research*, 16(3). <https://doi.org/10.1186/bcr3655>
171. Von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C., Rezai, M., Blohmer, J. U., Jackisch, C., Paepke, S., Gerber, B., Zahm, D. M., Kümmel, S., Eidtmann, H., Klare, P., Huober, J., Costa, S., Tesch, H., Hanusch, C., Hilfrich, J., ... Untch, M. (2014). Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): A randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 15(7), 747–756. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70160-3)
172. Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 38(16), e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
173. Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519. <https://doi.org/10.1085/JGP.8.6.519>
174. Wei, M., Xu, J., Dignam, J., Nanda, R., Sveen, L., Fackenthal, J., Grushko, T. A., & Olopade, O. I. (2008). Estrogen receptor α , BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111(1), 113–120. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9766-6>
175. Weinberg, R. A. (2014a). Coming full circle - From endless complexity to simplicity and back again. In *Cell* (Vol. 157, Issue 1, pp. 267–271). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.004>

176. Weinberg, R. A. (2014b). The biology of cancer by R. A. Weinberg. Biochemistry and Molecular Biology Education. <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009>
177. Weitzel, J. N., Neuhausen, S. L., Adamson, A., Tao, S., Ricker, C., Maoz, A., Rosenblatt, M., Nehoray, B., Sand, S., Steele, L., Unzeitig, G., Feldman, N., Blanco, A. M., Hu, D., Huntsman, S., Castillo, D., Haiman, C., Slavin, T., & Ziv, E. (2019). Pathogenic and likely pathogenic variants in PALB2, CHEK2, and other known breast cancer susceptibility genes among 1054 BRCA-negative Hispanics with breast cancer. *Cancer*, 125(16), 2829–2836. <https://doi.org/10.1002/cncr.32083>
178. Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, 7, 1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
179. World Cancer Report – IARC. (n.d.). Retrieved August 3, 2021, from https://www.iarc.who.int/cards_page/world-cancer-report/
180. Wu, H., You, L., Li, Y., Zhao, Z., Shi, G., Chen, Z., Wang, Z., Li, X., Du, S., Ye, W., Gao, X., Duan, J., Cheng, Y., Tao, W., Bian, J., Zhou, J.-R., Zhu, Q., & Yang, Y. (2020). Loss of a Negative Feedback Loop between IRF8 and AR Promotes Prostate Cancer Growth and Enzalutamide Resistance. *Cancer Research*, 80(13), 2927–2939. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2549>
181. Yamamoto, Y., Kanai, M., Kou, T., Sugiyama, A., Nakamura, E., Miyake, H., Yamada, T., Nishigaki, M., Kondo, T., Murakami, H., Torishima, M., Matsumoto, S., Kosugi, S., & Muto, M. (2019). Clinical significance of TP53 variants as possible secondary findings in tumor-only next-generation sequencing. *Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0681-6>
182. Yan, B., Ren, Z., Sun, J., Ding, C., & Yang, D. (2020). IGF2-AS knockdown inhibits glycolysis and accelerates apoptosis of gastric cancer cells through targeting miR-195/CREB1 axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110600. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110600>

183. Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 5(02). <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165>
184. Zaman, A., Wu, W., & Bivona, T. G. (2019). Targeting oncogenic braf: Past, present, and future. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11081197>
185. Zehir, A., Benayed, R., Shah, R. H., Syed, A., Middha, S., Kim, H. R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S. M., Hellmann, M. D., Barron, D. A., Schram, A. M., Hameed, M., Dogan, S., Ross, D. S., Hechtman, J. F., DeLair, D. F., Yao, J. J., ... Berger, M. F. (2017). Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature Medicine*, 23(6), 703–713. <https://doi.org/10.1038/nm.4333>
186. Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K. L., Pang, X., & Luo, X. (2016). Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell Death & Disease*, 7(6), e2266. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2016.167>
187. Zhang, M., Liu, J., Li, M., Zhang, S., Lu, Y., Liang, Y., Zhao, K., & Li, Y. (2018). Insulin-like growth factor 1/insulin-like growth factor 1 receptor signaling protects against cell apoptosis through the PI3K/AKT pathway in glioblastoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(2), 1477. <https://doi.org/10.3892/ETM.2018.6336>
188. Zhang, P., Yin, Y., Mo, H., Zhang, B., Wang, X., Li, Q., Yuan, P., Wang, J., Zheng, S., Cai, R., Ma, F., Fan, Y., & Xu, B. (2016). Better pathologic complete response and relapse-free survival after carboplatin plus paclitaxel compared with epirubicin plus paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced triple-negative breast cancer: A randomized phase 2 trial. *Oncotarget*, 7(37), 60647–60656. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10607>