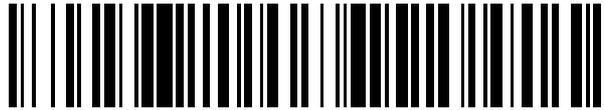


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 410**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10807280 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2486149**

54 Título: **Diagnosis de cáncer de mama, y otros tipos de cáncer, de tipo basal primario y metastásico**

30 Prioridad:

06.08.2009 US 231984 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.09.2015

73 Titular/es:

**JOHN WAYNE CANCER INSTITUTE (100.0%)
St. John Health Center, 2200 Santa Monica
Boulevard
Santa Monica, CA 90404, US**

72 Inventor/es:

**RAY, PARTHA;
BAGARIA, SANJAY;
CUI, XIAOJIANG y
WANG, JINHUA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 410 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnos de cáncer de mama, y otros tipos de cáncer, de tipo basal primario y metastásico

Reivindicación de prioridad

5 La presente solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. nº 61/231.984, presentada el 6 de agosto de 2009.

Antecedentes

10 La diversidad de alteraciones moleculares, composiciones celulares y resultados clínicos en el cáncer supone un importante reto en el tratamiento del cáncer en relación a proporcionar información diagnóstica, pronóstica y predictiva precisa. Habitualmente los tumores se describen histopatológicamente usando el sistema tumor-nodo-
metástasis (TNM). Este sistema, que usa el tamaño del tumor, la presencia o la ausencia de tumor en nodos
15 linfáticos regionales, y la presencia o la ausencia de metástasis distante, asigna un estadio al tumor según describe el "American Joint Committee on Cancer" (AJCC). El estadio asignado se usa como base para el pronóstico y para la selección de la terapia apropiada. Sin embargo, dicha estrategia presenta muchas limitaciones. Tumores que tienen un estadio TNM similar y una apariencia histopatológica similar pueden exhibir una variabilidad significativa en
términos de evolución clínica y respuesta a la terapia. Por ejemplo, algunos tumores son muy agresivos mientras que otros no lo son. Algunos tumores responden fácilmente a la terapia hormonal o a la quimioterapia mientras que otros se muestran resistentes.

20 El uso de biomarcadores ha proporcionado una estrategia adicional para dividir determinados tipos de tumor en subclases. Por ejemplo, un factor considerado en el pronóstico y en las decisiones de tratamiento para el cáncer de mama es la presencia o la ausencia del receptor de estrógenos (ER, del inglés "estrogen receptor") en muestras tumorales. Los cánceres de mama positivos en ER típicamente responden mucho más fácilmente a terapias hormonales, tales como tamoxifeno, que los tumores negativos en ER. Aunque útil, este biomarcador proporciona información solo para un subconjunto específico de cánceres de mama, no abordando el resto de subconjuntos.

25 La determinación del perfil de expresión de genes ha tenido éxito en delinear subtipos moleculares intrínsecos de cáncer de mama específicos (Perou et al. 2000). Esto representa un avance significativo en la comprensión del cáncer de mama, el cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres en todo el mundo (Landis et al., 1999) y una enfermedad que ha demostrado ser bastante heterogénea en términos de presentación clínica y características. Ahora se ha descubierto que grupos de pacientes de cáncer de mama con diferencias distintivas en sus perfiles
30 pronósticos tienen perfiles biológicos y/o moleculares igualmente distintos para ayudar a explicar sus resultados clínicos asociados. Esto ofrece una oportunidad tremenda de desarrollo de terapias personalizadas dirigidas a una biología tumoral específica asociada a un subtipo molecular específico de cáncer de mama. Un subtipo molecular particular que ha cosechado un interés considerable es el cáncer de mama de tipo basal (BLBC, del inglés "basal-like breast cancer").

35 Aunque publicado por primera vez hace más de 20 años en base a la detección inmunohistoquímica (IHC) de citoqueratinas (CK) basales, este subtipo volvió a cobrar relevancia después de que un análisis transcriptómico de cáncer de mama confirmara su existencia como entidad molecular diferenciada dentro del cáncer de mama. Aunque difiere sustancialmente de otros subtipos moleculares delineados en términos de su constitución molecular, la razón por la cual ha atraído la atención de biólogos y médicos que trabajan con cáncer por igual subyace en el uniformemente mal pronóstico y en la carencia de opciones terapéuticas dirigidas. El BLBC presenta un solapamiento significativo con el cáncer de mama "triple-negativo" – una entidad patológica definida en base a la ausencia de biomarcadores de cáncer de mama bien conocidos, receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor-2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Se estima que entre el 60% y el 90% de los cánceres de mama triple-negativo son BLBC. Sin embargo, BLBC no es sinónimo de cáncer de mama triple-negativo. Las pacientes con BLBC a menudo son más jóvenes, y tienen mayor probabilidad de ser descendientes afroamericanas (Carey et al. 2006; Ithemelandu et al. 2007; Ithemelandu et al. 2008), tienen mayor probabilidad de tener una mutación BRCA1 positiva (Rakha et al. 2009), frecuentemente desarrollan una enfermedad metastásica distante en el cerebro y/o el pulmón a los 3-5 años de la presentación inicial (Wang et al. 2005) y tienen una baja supervivencia global (Carey et al. 2005). De hecho, el desarrollo de enfermedad metastásica distante y la posterior muerte parecen ser independientes del estatus nodal de presentación inicial, ya que la mayoría de las pacientes dan negativo en nodos linfáticos en el momento de su diagnóstico inicial (Dent et al. 2007).

55 En la actualidad los biomarcadores más efectivos en la práctica clínica rutinaria son los biomarcadores teranósticos. Los biomarcadores teranósticos proporcionan información relativa a la diagnosis (determinación del subtipo biológico de cáncer), la prognosis (determinación del resultado clínico) y la predicción terapéutica (determinación de la eficacia terapéutica). Los biomarcadores teranósticos son principalmente funcionalmente centrales y pivotaes en el entramado de biomoléculas que controlan la biología de su subtipo biológico específico. Por tanto, la terapia dirigida hacia un biomarcador teranóstico tiene un efecto profundo sobre los resultados clínicos.

En el cáncer de mama, un ejemplo de biomarcador teranóstico es el ER. Éste diagnostica con precisión pacientes de cáncer de mama “luminales” (positivos en ER), pronostica con precisión su evolución y predice su respuesta favorable al tamoxifeno, un fármaco dirigido específicamente a ER. Antes de la introducción de la terapia de tamoxifeno, los pacientes de cáncer de mama positivos en ER presentaban una prognosis mala. Su prognosis mejoró drásticamente cuando la terapia con tamoxifeno se hizo estándar para dichos pacientes. Por tanto, el componente más importante de un biomarcador teranóstico es la diagnosis que ofrece. Puesto que con la diagnosis viene la predicción de la eficacia terapéutica, que finalmente determina el pronóstico del paciente. Aunque el pronóstico puede cambiar dependiendo de avances en la terapia, la diagnosis de un subtipo biológico, y por tanto de su(s) diana(s) terapéutica(s), seguirá inmutable. Además, el pronóstico ofrecido por un biomarcador teranóstico es más preciso que el ofrecido por un biomarcador no teranóstico. Esto es debido a que los biomarcadores teranósticos predicen resultados clínicos que son muy específicos de la biología del subtipo de cáncer. Por ejemplo, el estatus de positivo en ER refleja muy específicamente el pronóstico favorable actual asociado *solo* al subtipo luminal, ya que tiene en cuenta el tratamiento específico de subtipo con terapia anti-ER (p.ej., tamoxifeno). Por lo tanto, los biomarcadores teranósticos ofrecen una prognosis superior.

Las tecnologías de obtención del perfil genómico completo, tales como la determinación del perfil de expresión génica (transcriptómica), han expandido enormemente nuestro conocimiento de los genes y las rutas genéticas asociadas con el desarrollo y la progresión del cáncer. En base a este conocimiento, varios ensayos prognósticos multigén comercializados han entrado en el complejo panorama en expansión del mercado de diagnosis in vitro de cáncer (IVD, del inglés “in vitro diagnostics”). Estos ensayos contienen muchos genes, de los cuales solo algunos tienen realmente una importancia funcional crítica para la supervivencia y el mantenimiento del fenotipo maligno. Dichos ensayos son incapaces de ofrecer una comprensión refinada de la biología subyacente de un subtipo específico. En otras palabras, la principal desventaja de dichos ensayos prognósticos multigén es que no son teranósticos. No proporcionan una diagnosis de un subtipo biológico específico, y por tanto no ofrecen información con respecto al tratamiento específico de subtipo. Como resultado, el valor prognóstico que ofrecen es tan solo una aproximación entre los múltiples subtipos. Esto es lo contrario con un biomarcador teranóstico, cuyo valor prognóstico deriva de un único subtipo, y por tanto es más certero y preciso.

Por lo tanto, el descubrimiento y la elucidación de biomarcadores teranósticos para BLBC y otros cánceres son importantes para mejorar la clasificación de tumores y el tratamiento de pacientes de cáncer.

Ray P.S. et al. (Ray P.S. et al., 2009, Journal of Clinical Oncology, vol. 27, nº 15S, página ABS11016) muestran que el FOXC1 es regulado al alza de forma consistente y exclusiva en el cáncer de mama triple negativo de tipo basal, y está asociado con una mala tasa de supervivencia global.

Sumario

En una realización, se proporciona un método de clasificación teranóstica de un tumor de cáncer de mama según la reivindicación 1, comprendiendo el método la determinación de un estatus de expresión de ER, PR y HER2 en una muestra de tumor de cáncer de mama, la detección de un nivel de expresión de FOXC1, la comparación del nivel de expresión de FOXC1 con un valor de corte predeterminado, y la clasificación de la muestra de tumor de cáncer de mama como perteneciente a un subtipo de tumor de cáncer de mama triple negativo/de tipo basal o un subtipo de tumor de cáncer de mama de tipo basal híbrido teranóstico cuando el estatus de expresión de ER, PR y HER2 es positivo y el nivel de expresión de FOXC1 es superior que el nivel de corte predeterminado, donde el nivel de corte predeterminado se determina mediante un nivel percentil 90 de los niveles de expresión de FOXC1 para un conjunto de datos de tumores de cáncer de mama, comprendiendo el conjunto de datos todos los subtipos de cáncer de mama.

En una realización, se proporciona un método para predecir una prognosis de un cáncer de mama de tipo basal, comprendiendo el método la obtención de una muestra de tumor de cáncer de mama de un sujeto, la detección del nivel de expresión de FOXC1, la comparación del nivel de FOXC1 con un nivel de corte predeterminado, y la predicción de una mala prognosis del cáncer de mama de tipo basal cuando el nivel de expresión de FOXC1 es superior al nivel de corte predeterminado, donde el nivel de corte predeterminado se determina como el nivel de percentil 90 de los niveles de expresión de FOXC1 correspondientes a un conjunto de datos de tumores de cáncer de mama, comprendiendo el conjunto de datos todos los subtipos de cáncer de mama.

En otras realizaciones, el cáncer de mama de tipo basal es un cáncer de mama triple-negativo/de tipo basal y el nivel de corte predeterminado se determina como el nivel de percentil 90 de los niveles de expresión de FOXC1 para un conjunto de datos de tumores de cáncer de mama, comprendiendo el conjunto de datos todos los subtipos de cáncer de mama.

En algunas realizaciones, la prognosis es supervivencia global, supervivencia libre de recurrencia, propensión a desarrollar una metástasis distante, un tiempo para metástasis distante tal como metástasis cerebral, una propensión a resistencia a una terapia dirigida contra el cáncer (p.ej., trastuzumab (Herceptin®, tamoxifeno o un inhibidor de aromataasa), donde una propensión a resistencia a una terapia dirigida contra el cáncer puede ser una predicción de resistencia o eficacia reducida.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra la expresión diferencial de FOXC1 en subtipos de cáncer de mama. A, valores de intensidad de señal normalizada (línea base-transformada-a-cero) correspondientes a genes asociados a subtipo de tipo basal procedentes del conjunto de datos de Richardson et al. (Richardson et al. 2006). Los números representan diferentes subgrupos: (1), normal; (2), luminal A/B; (3), HER2; (4), tipo basal. B, gráfico de cuadros de valores de FOXC1 (intensidad de señal normalizada) en tejido de mama normal y luminal, HER2, y tumores de tipo basal del mismo conjunto de datos. Se determinó la significación estadística usando ANOVA. C, gráfico de cuadros de valores de FOXC1 procedentes del conjunto de datos de Hess et al con estatus de ER, PR y HER2 conocido (Hess et al. 2006). Véanse las leyendas de la Figura 3 para la descripción de los gráficos de cuadros. La significación estadística se determinó usando ANOVA. D, mapas de calor de expresión génica del conjunto de datos de Ivshina et al (Ivshina et al. 2006) agrupados jerárquicamente mediante IGS presentan el perfil de expresión de la firma de FOXC1.

Figura 2: muestra la expresión diferencial de FOXC1 en subtipos de cáncer de mama humano. Se presentan los valores de intensidad de señal normalizada correspondientes a 12 marcadores de tipo basal publicados procedentes de un conjunto de datos representativo (Richardson et al. 2006). Los números representan diferentes subgrupos: (1), normal; (2), luminal A/B; (3), HER2; (4), tipo Basal. Debajo se muestra el correspondiente mapa de calor.

Figura 3: muestra la expresión diferencial de FOXC1 según los subtipos moleculares o el estatus triple negativo. A. Gráfico de cuadro de valores FOXC1 (intensidad de señal normalizada) en tumores luminal A/B, HER2 y tipo basal del grupo de datos de Ivshina et al (Ivshina et al. 2006). La línea del centro de cada recuadro representa el valor medio de la distribución, y los extremos superior e inferior del recuadro son los cuartiles superior (75%) e inferior (25%), respectivamente. Las líneas se extienden al punto de datos más extremo que es 1,5 veces el rango intercuartil desde el recuadro. La significación estadística se determinó usando ANOVA. Tabla de estatus de FOXC1 alto (>percentil 90) y FOXC1 bajo (<percentil 90) frente a subtipos moleculares. Chi cuadrado $P < 0,0001$. B. Gráfico de cuadro de valores FOXC1 (intensidad de señal normalizada) en tumores luminal A/B, HER2 y tipo basal del grupo de datos de Miller et al (Miller et al. 2005). La significación estadística se determinó usando ANOVA. Tabla de estatus de FOXC1 alto (>percentil 90) y FOXC1 bajo (<percentil 90) frente a subtipos moleculares. Chi cuadrado $P < 0,0001$. C. Gráfico de cuadro de valores FOXC1 (intensidad de señal normalizada) en tumores luminal A/B, HER2 y tipo basal del grupo de datos de van de Vijver et al (van de Vijver et al. 2002). La significación estadística se determinó usando ANOVA. Tabla de estatus de FOXC1 alto (>percentil 90) y FOXC1 bajo (<percentil 90) frente a subtipos moleculares. Chi cuadrado $P < 0,0001$. D. Gráfico de cuadro de valores FOXC1 (intensidad de señal normalizada) en tumores triple negativos y tumores o triple negativos del grupo de datos de Hess et al (Hess et al. 2006). La significación estadística se determinó usando ANOVA. Tabla de estatus de FOXC1 alto (>percentil 90) y FOXC1 bajo (<percentil 90) frente estatus de triple negativo. Chi cuadrado $P < 0,0001$.

Figura 4: muestra una asociación de la firma genética de FOXC1 con el cáncer de mama de tipo basal. Mapas de calor de expresión génica de un conjunto de datos de microsistema de ADNc de cáncer de mama humano de 251 muestras (Miller et al. 2005) agrupados jerárquicamente mediante IGS demuestran el perfil de expresión global de los 30 genes asociados a FOXC1.

Figura 5: muestra que la agrupación no supervisada de la firma de gen FOXC1 identifica el subgrupo de tipo basal. Un conjunto de datos de microsistema de ADNc de cáncer de mama humano de 249 muestras (Ivshina et al. 2006) fue agrupado mediante IGS y la firma génica de FOXC1 respectivamente. Las agrupaciones de subtipo de tipo basal están indicadas con barras rojas.

Figura 6: ilustra la expresión de proteína de FOXC1 en BLBC. A, imágenes inmunohistoquímicas representativas de una muestra de tipo basal procedente de microsistemas de tejido de cáncer de mama teñidos para ER, HER2, CK5/6, CK14 y FOXC1. La proteína FOXC1 no fue detectada en los especímenes no triple negativos. B, diagrama de Venn que muestra la asociación entre los estatus de inmunohistoquímica de FOXC1 y citoqueratina (CK5/6 y/o CK14) en tumores triple negativos. C, inmunotinción de FOXC1 en HMECs normales y luminales (MCF-7, T47D y ZR75), que sobreexpresan HER2 (SKBR3 y HCC202), o líneas celulares de BLBC.

Figura 7: ilustra que la FOXC1 se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de mama de tipo basal. Mapa de calor de expresión génica de análisis de microsistema de ADNc de 51 líneas celulares de cáncer de mama humano. Se muestran en el mismo panel de 12 genes que en la Figura 2. MSN – Moesina, KRT5 – Citoqueratina 5 /CK5/6, CDH3 – P-caderina, CRYAB – α B-cristalina, KRT14 – citoqueratina 14 / CK14, KRT17 – citoqueratina 17 / CK17.

Figura 8: ilustra la significación pronóstica de FOXC1 en el cáncer de mama humano. A, curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global usando datos procedentes de conjunto de datos de van de Vijver et al (van de Vijver et al. 2002). La supervivencia global se estratificó por subtipos moleculares (izquierda), la firma génica de FOXC1 (centro), y los niveles de ARNm de FOXC1 (derecha). B, curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en pacientes negativos para nodos linfáticos procedentes del mismo conjunto de datos. C, curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis cerebral (izquierda) y ósea (derecha) usando datos del conjunto de datos de Wang et al (Wang et al. 2005) estratificados por subtipos moleculares. D, curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis cerebral y ósea estratificadas por niveles de ARNm de FOXC1 procedentes del mismo conjunto de datos.

Figura 9: ilustra la potencia pronóstica de la expresión de FOXC1 en cánceres de mama humanos. A, curvas Kaplan-Meier de supervivencia global usando datos de un conjunto de datos de microsistema de 232 muestras (Herschkowitz et al. 2007) con información clínica ligada. B, curvas Kaplan-Meier de supervivencia global usando datos de un conjunto de datos de microsistema de 122 muestras (Sorlie et al. 2003) con información clínica ligada. C, curvas Kaplan-Meier de supervivencia global usando datos de un conjunto de datos de microsistema de 159 muestras (Pawitan et al. 2005) con información clínica ligada. La supervivencia global se muestra de acuerdo a subtipos moleculares (izquierda) y niveles de ARNm de FOXC1 (derecha).

Figura 10: es una curva de operador receptor (ROC)-área bajo la curva (AUC) para la expresión de FOXC1 para predecir el cáncer de mama de tipo basal. (Parker et al. 2009).

Figura 11: muestra los efectos de la sobreexpresión y bloqueo de FOXC1 en células de cáncer de mama. A, proliferación celular (izquierda), migración (centro) e invasión (derecha) de células MDA-MB-231 que sobreexpresan FOXC1 o vector. B, proliferación celular, migración e invasión de células de 4T1 que expresan ARNsh de FOXC1 o de control. *, $P < 0,05$, frente al control. C, morfologías de control y células 4T1 ARNsh FOXC1 en cultivo monocapa. D, imágenes representativas de células de control y 4T1 ARNsh FOXC1 cultivadas en tridimensional (3-D), Matrigel (izquierda) y agar suave (derecha). Barra, 135 μm .

Figura 12: muestra los efectos de la sobreexpresión de FOXC1 en células de cáncer de mama humano y en células MCF-10A. A, se transfeció FOXC1 de manera estable en células de cáncer de mama MCF-7. La proliferación celular (izquierda), el crecimiento independiente de anclaje (centro-izquierda), la migración (centro-derecha) y la invasión (derecha) de células que expresan FOXC1 o vector se midieron usando ensayos de MTT, agar blando y cámara de Boyden. *, $P < 0,05$ frente al control de vector. B, la expresión de ciclina D1 y marcadores fibroblásticos en células MDA-MB-231 que sobreexpresan FOXC1 o el vector de control fue examinada mediante inmunotinción. C, los niveles de integrinas $\beta 4$ y $\beta 1$ en células MDA-MB-231 que sobreexpresan FOXC1 o el vector de control se midieron mediante citometría de flujo. *, $P < 0,05$ frente al control de vector. Cabe destacar que se obtuvieron los mismos resultados con células MCF-7. D, la expresión de MMP2 y MMP9 se midió mediante ELISA. Las barras representan la media \pm SD ($n = 3$). *, $P < 0,05$ frente al control de vector. E, morfologías de células epiteliales mamarias humanas MCF-10A que sobreexpresan el vector o FOXC1 (izquierda) e inmunotinción de marcadores luminales (E-caderina) y basales (P-caderina) en las mismas células.

Figura 13: muestra los efectos del bloqueo de FOXC1 en células de cáncer de mama humano. A, se compararon los niveles de proteína FOXC1 en células de cáncer de mama MCF-7, BT549 y 4T1 (referido a la Figura 2C). B, inmunotinción de FOXC1 en células 4T1 que expresan ARNsh de control o de FOXC1. C, la proliferación celular (izquierda), la migración (centro) y la invasión (derecha) de células BT549 que expresan ARNsh 19 de control o de FOXC1 se midió usando ensayos MTT y de cámara de Boyden. *, $P < 0,05$ frente al control. D, inmunotinción de FOXC1 en células BT549 que expresan ARNsh de control o de FOXC1.

Figura 14: es una curva Kaplan-Meier de supervivencia global usando datos de microsistema procedentes de 58 tumores amplificados de HER2. Se observó que la expresión de ARNm de FOXC1 semicuantitativa por encima del percentil 50 es un predictor significativo de una mala supervivencia ($p=0,0313$ en análisis univariable). En análisis multivariable, cuando se controla la edad, el tamaño del tumor y el estatus nodal, una expresión de ARNm de FOXC1 superior al valor de corte del percentil 50 es un pronosticador independiente de una mala supervivencia (HR 2,54, 95% IC 1,21-5,33, $p=0,0138$). El estatus nodal y la edad no fueron pronosticadores significativos en el análisis multivariable (Staaf et al. 2010).

Figura 15: es un diagrama de flujo de la identificación del paciente, la recolección de muestras y el procesamiento de tejido para la determinación inmunohistoquímica de ER, PR, HER2, CK5/6, CK14 y FOXC1.

Figura 16: muestra curvas Kaplan Meier de supervivencia global a 5 años de pacientes de cáncer de mama agrupados según (A) el estatus de expresión de proteína FOXC1 según se determina en inmunohistoquímica estándar, donde se demuestra que la expresión positiva de FOXC1 es un predictor significativo de supervivencia global, independiente del valor de corte empleado; y (B) modelos de biomarcador inmunohistoquímico surrogados de subtipo molecular que utilizan 3 valores de corte diferentes para definir la expresión positiva de FOXC1. Al nivel de expresión de proteína determinado mediante IHC se le asignó una puntuación de entre 0 (despreciable o sin expresión) y 3 (expresión elevada). Los tres valores de corte fueron: 0 frente a 1, 2, 3; 0, 1 frente a 2, 3; ó 1, 2, 3 frente a 3.

Figura 17: muestra curvas Kaplan Meier de supervivencia global a 5 años de pacientes de cáncer de mama agrupados según (A) el estatus de fenotipo triple negativo (TNP), el estatus de expresión de citoqueratina (CK) basal y el estatus de expresión de proteína FOXC1 determinados con inmunohistoquímica estándar; y (B) 3 modelos de panel de biomarcador inmunohistoquímico surrogado de subtipo molecular de cáncer de mama – 1) el panel de 3 biomarcadores clásicos que comprende ER, PR y HER2, 2) un panel de 5 biomarcadores que comprende los anteriores receptores en combinación con biomarcadores de tipo basal tradicionales, CK5/6 basal y CK14 basal, y 3) un panel de 4 biomarcadores que comprende ER, PR y HER2, en combinación con FOXC1.

Figura 18: ilustra que la expresión de FOXC1 está asociada de forma negativa a la expresión de ER α en el cáncer de mama humano. (A) Análisis de datos de microsistema de la asociación entre la expresión de FOXC1 y la de ER α en cánceres de mama humanos. Los niveles de ARNm de FOXC1 en cáncer de mama se muestran en gráficos de recuadros. Se llevó a cabo un estudio de t de student usando el software OncoPrint. Se presentan los resultados de seis conjuntos de datos representativos [(Ginestier et al., 2006; Lu et al., 2008; Richardson et al., 2006; Sorlie et al., 2001; Zhao et al., 2004) y la base de datos Oncology-Breast Samples Project (Bittner et al.) del "International Genomics Consortium" (IGC) en <https://expo.intgen.org/expo/public>]. (B) Se muestra la expresión de FOXC1 en líneas celulares de cáncer de mama humano positivas o negativas en ER α por inmunotinción.

Figura 19: muestra los niveles de ARNm de FOXC1 en tejidos de cáncer de mama humano mostrados en gráficos de recuadro. Los análisis de datos de microsistemas de la asociación entre la expresión de FOXC1 y ER α en cánceres de mama humanos se muestran para (A) el conjunto de datos de Pollock et al; (B) el conjunto de datos de Perou et al; (C) el conjunto de datos de Sorlie et al; y (D) el conjunto de datos de Schuet et al. Se muestra que la expresión de FOXC1 está asociada de forma negativa con la expresión de ER α en cáncer de mama. Se llevó a cabo un estudio de t de student usando el software OncoPrint.

Figura 20: ilustra que la FOXC1 regula a la baja la expresión de ER α . (A) Los niveles de ARNm de FOXC1 y ER α en células MCF-7 que sobreexpresan vector o FOXC1 se midieron mediante RT-PCR (izquierda) y RT-PCR en tiempo real (centro y derecha). (B) Niveles de proteína de FOXC1, ER α y genes PR y IRS-1 regulados por ER α en células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 o vector se midieron mediante inmunotinción. (C) Se transfirió de forma temporal FOXC1 en células MCF-7. Se llevó a cabo una tinción de inmunofluorescencia de FOXC1 (verde) y ER α (rojo). El ADN nuclear (azul) se tiñó con DAPI. Aumentos: x400. (D) Las células MCF-7 fueron transfectadas de forma temporal con la construcción indicadora ERE-luc y la construcción FOXC1 o el vector de control. Las células fueron tratadas con 17 β -estradiol (E2) 10⁻⁸ M durante 24 h, y a continuación fueron lisadas. Se midió la actividad de luciferasa y se normalizó respecto a la actividad de β -galactosidasa. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Figura 21: es una inmunotinción que ilustra que la FOXC1 regula a la baja la expresión de ER α . Se transfirió FOXC1 de forma estable en células de cáncer de mama T47D. Los niveles de proteína de FOXC1, ER α , y genes PR e IRS-1 regulados por ER α en células T47D que sobreexpresan vector o FOXC1 fueron medidos mediante inmunotinción.

Figura 22: muestra gráficos de líneas (A) y de barras (B-C) que ilustran que la FOXC1 reduce la sensibilidad a estrógeno y antiestrógeno en células de cáncer de mama. (A) La proliferación de células MCF-7 de control y que sobreexpresan FOXC1 en medio libre de suero se midió mediante ensayos MTT. (B) Células MCF-7 de control y que sobreexpresan FOXC1 fueron sometidas a ayuno de suero durante 24 h, y a continuación fueron tratadas con E2 10⁻⁸ M durante los periodos de tiempo indicados. La proliferación celular se midió mediante ensayos MTT y se presenta como tasas de crecimiento relativas comparadas con el control de vehículo. (C) células MCF-7 de control y que sobreexpresan FOXC1 en medio regular fueron tratadas con tamoxifeno 10⁻⁶ M durante los periodos de tiempo indicados. Se midió la proliferación celular se midió mediante ensayos MTT y se presenta como tasas de crecimiento relativas frente al vehículo de control.

Figura 23: muestra que la FOXC1 induce actividad NF- κ B en células de cáncer de mama. (A) Se muestran los mecanismos de señalización canónica más significativos identificados en los tres subgrupos de cáncer de mama del conjunto de datos de Richardson et al usando el software "Ingenuity Pathway Analysis" (tipo basal - (a), HER2 - (b), Luminal - (c)). Los genes del conjunto de datos que se asociaron a un mecanismo canónico en la base de conocimiento del "Ingenuity Pathways" fueron los considerados para análisis. Se usó el test exacto de Fischer para calcular un valor-p que determine la probabilidad de que la asociación entre los genes de un subgrupo particular y el mecanismo canónico se explique solo por probabilidad. Los mecanismos canónicos mostrados aparecen en orden de rango de su Factor de Impacto, el log negativo del valor-p del test exacto de Fischer. (B) Se examinó la expresión de componentes NF- κ B en células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 o el vector mediante inmunotinción. (C) La expresión de p65 en células de cáncer 4T1 transducidas de forma estable con ARNsh de control o de FOXC1 se examinó mediante inmunotinción. (D) Se aislaron proteínas nucleares de células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 o el vector de control, seguido de inmunotinción de p65 y la proteína nuclear Lamin A/C. (E) Se aislaron proteínas nucleares de células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 o el vector de control. La unión de p65, p50 y c-Rel a oligonucleótidos de ADN de consenso se determinó mediante ELISA. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. (F) Se transfirieron de forma temporal células MCF-7 con NF- κ B-luc, FOXC1 y un supresor I κ B α . Se determinó la actividad NF- κ B mediante ensayos de luciferasa. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. (G) Se trataron células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 o el vector con el inhibidor de IKK BMS-345541 (5 μ M). Se midió la proliferación celular en los tiempos indicados mediante ensayos MTT y se presenta como tasas de crecimiento relativo en comparación con el vehículo de control.

Figura 24: muestra que la NF- κ B regula a la baja el ER α en células de cáncer de mama. (A) Se examinó mediante inmunotinción la expresión de p65 y ER α en células MCF-7 transfectadas con p65 o el vector durante 48 h. (B) Se examinó por inmunotinción la expresión de ER α , PR e IRS-1 en células MCF-7 tratadas con el inhibidor de IKK BMS-345541 (5 μ M) durante 24 h. (C) Se transfirieron de forma temporal células MCF-7 con ERE-luc y ER α o p65, y a continuación se trataron con E2 10⁻⁸ M durante 24 h. Se determinó la actividad de ER mediante ensayos de

luciferasa. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. (D) Se llevaron a cabo ensayos ChIP tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizaron anticuerpos contra proteína p65 para inmunoprecipitar complejos p65-ADN. El control de entrada fue el 1% del sobrenadante de proteína-cromatina sometido a ensayos ChIP. La región de promotor ER α amplificada es -420/-280 (derecha).

- 5 Figura 25: muestra que la NF- κ B regula a la baja ER α en células de cáncer de mama. Se examinó la expresión de ER α en células MCF-7 transfectadas con p65 o el vector durante 48 h mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. *, P < 0,05 frente al control de vector.

Figura 26: muestra perfiles de inmunotinción representativos de CK5/6, CK14 y FOXC1 en especímenes de cáncer de mama FFPE según el subtipo molecular.

10 **Descripción detallada**

En la presente memoria se proporciona un método para clasificar un tumor que usa un biomarcador teranóstico con significación pronóstica independiente. Un biomarcador teranóstico proporciona información relevante para la diagnosis, la prognosis y el tratamiento de cáncer en un sujeto.

- 15 El término "biomarcador teranóstico" o una "clasificación teranóstica" tal como se usan en la presente memoria significan un biomarcador o clasificación particular que, además de proporcionar información diagnóstica y pronóstica significativa, también proporciona información útil para optimizar el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad tal como cáncer. Las realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan una estrategia teranóstica para clasificar, diagnosticar, pronosticar y tratar el cáncer. En términos prácticos, esto significa que un biomarcador teranóstico o una clasificación teranóstica puede identificar qué sujetos y qué tumores se ajustan más a
20 una terapia particular, y también proporciona una retroalimentación sobre la eficacia de un fármaco a fin de demostrar o determinar cómo de bien debería funcionar o funciona un fármaco para optimizar la terapia o los regímenes de terapia. También puede identificar qué sujetos son resistentes a una terapia particular o regímenes de terapia particulares.

- 25 En una realización, el biomarcador teranóstico puede ser específico para una enfermedad, tal como cáncer de mama, o puede ser un biomarcador de enfermedad general. El biomarcador teranósticos es FOXC1. La FOXC1 se usa en conjunción con otros biomarcadores moleculares que son relevantes para un tipo particular de tumor o cáncer. La FOXC1 se puede usar en conjunción con el estatus de receptor de estrógeno (ER), de receptor de progesterona (PR) y de receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2; también conocido como ErBb2mer-2/Neu), para uso en un método de clasificación teranóstica, diagnosis, prognosis y tratamiento de cáncer de mama y sus subtipos. En algunas realizaciones, dichos métodos son útiles para distinguir entre los subtipos de
30 cáncer de mama de tipo basal, que incluyen los subtipos de cáncer de mama de tipo basal híbridos que exhiben tanto características de cáncer de mama de tipo basal como una o más características de otro subtipo, tal como el luminal o el enriquecido en HER2.

- 35 En una realización, los métodos descritos en la presente memoria incluyen proporcionar una muestra de tejido de tumor. La muestra de tejido de tumor puede ser una muestra de tumor congelada fresca, una muestra fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE), un cultivo celular primario o cualquier otro tejido adecuado para determinar un nivel de expresión de un biomarcador. La muestra de tejido tumoral es una muestra de tejido de tumor de cáncer de mama.

- 40 En algunas realizaciones, se puede determinar un nivel de expresión de un biomarcador teranóstico tal como FOXC1 en una muestra de tejido tumoral mediante métodos cualitativos o cuantitativos tales como inmunohistoquímica (IHC) o inmunocitoquímica (ICC), reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa no cuantitativa o cuantitativa (RT-PCR o qRT-PCR), microsistema de proteínas o de ADNc o mediante un ensayo QuantiGene® (Panomics). El nivel de expresión puede ser una medida de la expresión de ARNm o de la expresión de proteína. Los datos así obtenidos se pueden usar para desarrollar un nivel de expresión de corte o un índice
45 pronóstico numérico, FOXC1 ScoreTM, para ayudar en la estratificación pronóstica clínica de subconjuntos específicos de pacientes con cáncer de mama (y/u otros cánceres que incluyen, aunque sin limitación, melanoma, tumores neuroendocrinos, tumores cerebrales tales como glioblastoma multiforme, astrocitoma y otros cánceres cerebrales, cáncer de célula renal, sarcomas (tales como sarcoma sinovial) y leucemia. El índice pronóstico numérico FOXC1 ScoreTM puede calcularse a partir de una curva de calibrado generada representando valores qRT-PCR de expresión de ARNm de FOXC1 frente a la medida de un resultado clínico específico tal como supervivencia
50 global (OS, del inglés "overall survival"), supervivencia específica de cáncer de mama, supervivencia libre de recurrencia, supervivencia libre de metástasis, otras medidas de resultado o pronósticas adecuadas. El índice pronóstico numérico FOXC1 ScoreTM puede usarse para determinar la prognosis de un sujeto y también puede usarse con fines de gestión clínica para seguir la evolución de la eficacia o para optimizar la eficacia de uno o más regímenes de terapia.
55

Clasificación molecular de subtipo de cáncer de mama

La clasificación molecular de cáncer de mama ha identificado subtipos específicos, a menudo denominados subtipos “intrínsecos”, con implicaciones clínicas y biológicas, que incluyen un subtipo luminal intrínseco, un subtipo enriquecido en HER2 intrínseco (también denominado subtipo HER2⁺ o ER7HER2⁺) y un subtipo de cáncer de mama de tipo basal (BLBC) intrínseco. (Perou et al. 2000). La identificación de los subtipos intrínsecos habitualmente se ha llevado a cabo mediante una combinación de métodos, que incluyen (1) la detección histopatológica, (2) el estatus de expresión de ER, PR y HER2 y (3) la detección de marcadores celulares característicos.

El cáncer de mama de tipo basal, que expresa genes característicos de células epiteliales basales en la glándula mamaria normal, comprende hasta un 15%-25% de todos los cánceres de mama (Kreike et al. 2007) y está asociado al peor pronóstico entre todos los tipos de cáncer de mama. Los BLBCs subexpresan el receptor de estrógeno (ER⁻), el receptor de progesterona (PR⁻) y el receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2⁻) y abarcan entre el 60% y el 90% de los denominados cánceres de mama “triple negativos” (ER⁻/PR⁻/HER2⁻). Aunque la mayoría de los cánceres de mama de tipo basal a menudo son denominados triple negativos en base al estatus de expresión de ER, PR y HER2, no todos los cánceres de mama de tipo basal son triple negativos. Así, el subtipo de cáncer de mama de tipo basal intrínseco puede dividirse adicionalmente en al menos tres subtipos distintos descritos en la presente memoria como subtipos de cáncer de mama de tipo basal “híbridos”. Además de un subtipo triple negativo híbrido, los subtipos de cáncer de mama de tipo basal híbridos presentan perfiles que se asemejan tanto al cáncer de mama de tipo basal como a al menos otro subtipo molecular de cáncer de mama. Por ejemplo, los subtipos de tipo basal híbridos puede incluir un subtipo híbrido de tipo basal/HER2⁺ que tiene un perfil de receptores de ER⁻/PR⁻/HER2⁺, un subtipo híbrido de tipo basal/luminal que tiene un perfil de receptores de ER⁺/PR⁺/HER2⁺, y un subtipo híbrido de tipo basal/triple negativo que tiene un perfil de receptores de ER⁻/PR⁻/HER2⁻. La existencia y la significación de estos subtipos de tipo basal híbridos no han sido reconocidas previamente, pero puesto que representan algunos de los subtipos de cáncer de mama más agresivos y resistentes al tratamiento, los métodos descritos en la presente memoria son importantes para mejorar la diagnosis, la prognosis y el tratamiento de esta enfermedad. Las expresiones “cánceres de mama de tipo basal”, “subtipos de tipo basal”, “tumores de tipo basal”, “BLBCs” y otros similares tal como se usan en la presente memoria pretenden abarcar todos los cánceres y tumores que presentan características del subtipo BLBC, que incluyen el subtipo BLBC intrínseco, el subtipo BLBC híbrido triple negativo, y cualquier otro subtipo de tipo basal híbrido descrito en la presente memoria que pueda presentar marcadores asociados a luminal, HER+ u otro subtipo clasificado previamente.

El subtipo enriquecido en HER2 intrínseco (también descrito como subtipo HER2⁺ o ER⁻/HER2⁺) se caracteriza por la subexpresión de los receptores hormonales ER y PR y la sobreexpresión de HER2 (ER⁻/PR⁻/HER2⁺). El subtipo enriquecido en HER2 está asociado a un mal pronóstico.

El subtipo de cáncer de mama luminal intrínseco se caracteriza por la expresión o la sobreexpresión de ER y/o PR (ER⁺ y/o PR⁺). El subtipo luminal puede dividirse adicionalmente en base al estatus de HER2 en el subtipo luminal A, que se caracteriza adicionalmente por la subexpresión de HER2 (ER⁺/PR⁺/HER⁻), y el subtipo luminal B, que se caracteriza adicionalmente por la sobreexpresión de HER2 (ER⁺/PR⁺/HER⁺). Los subtipos luminales intrínsecos a menudo se consideran el subtipo de cáncer de mama más tratable y están asociados al mejor pronóstico.

Aunque el ER y el HER2 guían el tratamiento de cánceres de mama luminales y HER2, respectivamente, la quimioterapia sigue siendo la única modalidad de terapia sistémica para el BLBC. Afectando preferencialmente a mujeres más jóvenes, en particular a mujeres afroamericanas, los BLBCs están asociados a un alto grado histológico, un comportamiento clínico agresivo y una tasa elevada de metástasis al cerebro y el pulmón (Carey et al. 2006). Al contrario que otros subtipos de cáncer de mama, parece no haber correlación entre el tamaño tumoral y la metástasis a nodos linfáticos en los BLBCs (Dent et al. 2007). Un mejor entendimiento de los mecanismos de señalización, de la base biológica y de los mecanismos moleculares del cáncer de mama de tipo basal triple negativo, y de los otros subtipos de tipo basal híbridos descritos antes, permite la identificación de biomarcadores precisos para una diagnosis, prognosis y terapia dirigida temprana.

Los BLBCs están asociados a la expresión de citoqueratinas basales (CK5/6, CK14 y CK17), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), c-kit y p-53, y asociados a la ausencia de expresión de ER, PR y HER2. Con una amplia variedad de genes asociados, los BLBCs han sido definidos de forma diferente en diferentes estudios usando un conjunto de marcadores diagnósticos. Por ejemplo, Nielsen et al. definieron el BLBC en base a la expresión negativa de ER y la expresión negativa de HER2, además de la expresión positiva de citoqueratina basal, EGFR y/o c-kit (Nielsen et al. 2004). Por otro lado, otros grupos han definido el BLBC en base a una combinación de expresión negativa de ER y HER2, y expresión positiva de CK5, P-caderina y p63 (Elsheikh et al. 2008) o expresión positiva de vimentina, EGFR y CK5/6 (Livasy et al. 2006). Estas estrategias técnicas diferentes en combinación con cohortes de pacientes ampliamente variables pueden explicar los resultados experimentales inconsistentes obtenidos para estos marcadores.

La identificación del subtipo de tipo basal usando inmunohistoquímica (IHC) para detectar receptores hormonales solos es menos deseable que detectar un biomarcador teranóstico, porque la identificación se basa en la ausencia de tinción de IHC para el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor 2 de factor de

crecimiento epidérmico humano (HER2) más que la presencia de un marcador o marcadores tumorales específicos. Su diagnóstico es más una de exclusión que de inclusión. A menudo el cáncer de mama de tipo basal se denomina de forma sinónima como “triple negativo” (es decir, ER⁻/PR⁻/HER2⁻), sin embargo, no todos los cánceres de mama triple negativos son de tipo basal, y no todos los cánceres de mama de tipo basal son triple negativos. Aunque otros marcadores moleculares han sido asociados al cáncer de mama de tipo basal, tal como se ha descrito anteriormente, dichos marcadores no son exclusivos de dicho cáncer de mama de tipo basal y por tanto no son adecuados para uso como marcadores únicos. La mejor alternativa de método conveniente, potencialmente objetivo y realista para identificar cánceres de tipo basal en la práctica clínica sería a través de la detección positiva de un marcador o marcadores moleculares definitivos. La identificación de FOXC1 como regulador predominante del fenotipo de tipo basal puede proporcionar una estrategia pragmática para distinguir este subgrupo de cáncer de mama en la diagnosis clínica, resultando en última estancia en una supervivencia mejorada.

FOXC1 como biomarcador para cáncer de mama de tipo basal

Tal como se describe en los ejemplos incluidos más adelante, se identificaron biomarcadores específicos para BLBC y se analizaron sistemáticamente usando un conjunto de genes intrínsecos (IGS, del inglés “intrinsic gene set”) de 306 miembros (Hu et al. 2006) además de otros marcadores individuales publicados para BLBC usando múltiples conjuntos de datos de microsistema. Se usó el grado de correlación de cada gen individual con el subtipo de tipo basal en base a la expresión de ARNm para identificar genes altamente específicos de BLBC. El factor de transcripción FOXC1 emergió como el primer gen de la lista. Por lo tanto, se estableció la significación diagnóstica y pronóstica de FOXC1 y se caracterizó adicionalmente su función en la regulación de las funciones celulares del cáncer de mama.

Los factores de transcripción de caja Forkhead, que incluyen la caja de Forkhead C1 (FOXC1, también conocido como forkhead de tipo 7 (FKHL7)), son factores de transcripción que se caracterizan por un dominio común de unión a ADN de hélice alada de 100 aminoácidos denominado dominio de caja de forkhead, y desempeñan funciones importantes en la regulación de la expresión de genes implicados en el crecimiento celular, la supervivencia, el desarrollo de mesoderma embrionario de diferenciación, la migración y la longevidad (Nishimura et al., 1998). El gen FOXC1/FKHL7 y sus secuencias de proteína son conocidos y se pueden obtener en el GenBank (secuencia codificadora; SEQ ID NO: 13) y AAE63616 (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 14), cuyas secuencias se incorporan como referencia en su totalidad tal como se establece completamente en la presente memoria). Como resultado de los estudios descritos en la presente memoria, se ha determinado que la expresión de FOXC1 en el cáncer de mama humano, tanto en el ARNm como a nivel proteico, se produce de forma consistente y exclusivamente en los cánceres de mama de tipo basal. Adicionalmente, en una comparación directa con otros biomarcadores sugeridos de cáncer de mama de tipo basal, y tal como se demuestra de forma estadísticamente significativa en los análisis tanto univariable como multivariable descritos en los ejemplos de más adelante, el FOXC1 ha emergido como el biomarcador más indicativo y más característico para BLBCs, por su capacidad para diagnosticar, pronosticar y tratar el BLBC.

Una característica importante de los resultados anteriores es la naturaleza exclusiva de la asociación entre el FOXC1 y los cánceres de mama de tipo basal: su expresión es elevada solo en los subtipos moleculares de tipo basal de cánceres de mama.

Tal como se ha mencionado anteriormente, aunque se describen muchos genes como biomarcadores característicos de determinados tipos de cáncer, y se han descrito muchos otros como de importancia funcional en la supervivencia y el mantenimiento del fenotipo maligno, muy pocos han demostrado presentar una significación pronóstica robusta. Esto se debe a que muy pocos son críticos en sí mismos y en su lugar son parte de entramados extremadamente grandes y complejos de biomoléculas cuya función global no puede ser determinada a menos que se identifiquen las moléculas que son más centrales y pivotaes dentro del entramado. El FOXC1 ha demostrado ser de una significación pronóstica extremadamente elevada, siendo predictivo de la elevada tasa de mortalidad y metástasis asociada a los cánceres de mama de tipo basal.

Tanto los cánceres de mama triple negativos de tipo basal como los cánceres de mama de tipo basal híbrido (HER2 y luminal) presentan una tasa elevada de metástasis al cerebro, una complicación devastadora de esta temida enfermedad. Los estudios descritos en la presente memoria demuestran que una firma génica de 30 miembros asociada al FOXC1 es predictiva de la metástasis específica de cerebro observada en los anteriores dos subtipos de cáncer de mama.

La significación clínica de la expresión de FOXC1 no se restringe al cáncer de mama, si no que puede extenderse a otros cánceres, que incluyen, aunque sin limitación, melanoma, tumores neuroendocrinos, tumores cerebrales (tales como glioblastoma multiforme, o astrocitoma), cáncer de célula renal, sarcomas (tales como sarcoma sinovial) y leucemia. Se ha demostrado que la expresión de FOXC1 define de forma característica y exclusiva los subconjuntos biológica y clínicamente agresivos de dichos cánceres y puede usarse como biomarcador diagnóstico y como biomarcador pronóstico para estos tipos de cáncer específicos. Adicionalmente, de forma similar al cáncer de mama de tipo basal, el FOXC1 es una diana terapéutica adecuada para estos tipos de cáncer específicos.

Los descubrimientos anteriormente descritos tienen claras e importantes implicaciones en el campo de la medicina personalizada y de los cuidados de cáncer personalizados, puesto que la detección del estatus de FOXC1 de los conjuntos específicos descritos de pacientes con cáncer de mama (y/u otros cánceres como el cáncer gástrico y el cáncer de colon) permite intervenciones terapéuticas más específicas y a medida con una mayor probabilidad de detener la progresión de la enfermedad, extender de la esperanza de vida o incluso alcanzar una cura.

En algunas realizaciones, un método de uso para un biomarcador teranóstico tal como FOXC1 comprende un algoritmo para su uso clínico potencial como herramienta diagnóstica. El FOXC1 se usa junto con otros biomarcadores como HER2, ER y PR. Por ejemplo, en el cáncer de mama triple negativo, el algoritmo puede incluir las siguientes etapas. En primer lugar, un paciente con una anomalía detectada mediante una IRM de mama o una mamografía, o que ha tenido observaciones en un examen clínico, se designa como sospechoso de padecer cáncer de mama. A continuación, el paciente sería sometido a una biopsia FNNCore/biopsia escisional para obtener un tejido del tumor. A continuación, un examen patológico rutinario del anterior tejido tumoral establece la diagnosis del cáncer de mama. El tejido tumoral sería sometido entonces a tinción inmunohistoquímica (IHC) para ER, PR y HER2. A los pacientes que resultan triple negativos (es decir ER⁻/PR⁻/HER2⁻) se les evaluarían sus tejidos adicionalmente mediante IHC para determinar FOXC1. A continuación, a los pacientes que resulten positivos de FOXC1 se les puede diagnosticar de forma definitiva cáncer de mama triple negativo de tipo basal.

En otra realización, el biomarcador teranóstico FOXC1 se usa como herramienta pronóstica. El FOXC1 se usa para predecir la prognosis de factores que incluyen, aunque sin limitación, la supervivencia global, la supervivencia libre de recurrencia, la propensión a desarrollar una metástasis distante o el tiempo para desarrollar una metástasis distante (tal como metástasis cerebral), o la propensión a resistencia a un régimen de terapia dirigida contra el cáncer. La expresión "propensión a resistencia" a un régimen de terapia dirigida contra el cáncer tal como se usa en la presente memoria puede ser un predictor de resistencia o un predictor de eficacia reducida (es decir, la terapia es menos efectiva desde el inicio del tratamiento) de un régimen de terapia dirigida contra el cáncer en un paciente de cáncer. Un nivel elevado de FOXC1 (tanto de proteína como de ARN) predice una mala prognosis de dichos factores (es decir, una supervivencia global reducida, una supervivencia específica de enfermedad reducida, una supervivencia libre de recurrencia reducida, un aumento de la tasa de metástasis loco-regional y distante) en comparación con los niveles bajos de FOXC1 en subconjuntos específicos de pacientes de cáncer de mama (y/u otros cánceres que incluyen aunque sin limitación melanoma, tumores neuroendocrinos, tumores cerebrales –tales como glioblastoma multiforme, astrocitoma, cáncer de célula renal, sarcomas –tal como sarcoma sinovial, y leucemia).

En una realización, el uso de FOXC1 como herramienta pronóstica incluye un algoritmo. Por ejemplo, el algoritmo puede incluir las siguientes etapas, usando como ejemplo el cáncer de mama triple negativo. En primer lugar, para un sujeto cuyas muestras son cualitativamente positivas para FOXC1 en base a IHC, se envían sus muestras para continuar con un análisis cuantitativo del nivel de FOXC1 usando una RT-PCR u otra técnica cuantitativa tal como un ensayo QuantiGene® (Panomics). En base al valor cuantitativo de la expresión de FOXC1 obtenido de este modo, se calcula un Índice Pronóstico numérico FOXC1 ScoreTM para el paciente individual, que ayudará a determinar una estimación específica para el paciente de supervivencia global, supervivencia libre de recurrencia, tiempo a metástasis distante y tipo de metástasis asociada al cáncer de mama triple negativo de tipo basal. Este método posibilita una atención médica personalizada para los pacientes de BLBC.

FOXC1 reprime la expresión de receptor de estrógeno α en células de cáncer de mama humano a través del incremento de la señalización de Factor Nuclear κB (NF- κB)

La hormona esteroidea sexual estrógeno desempeña funciones importantes en el desarrollo de las glándulas mamarias normales y del cáncer de mama (Dhasarathy et al., 2007). Los efectos más establecidos del estrógeno están mediados por su unión directa a dos receptores nucleares, el receptor de estrógeno (ER) α y β (Couse y Korach, 1999; Kuiper et al., 1997). Ambos receptores son factores de transcripción que inducen la expresión de muchos genes relacionados con el cáncer de mama. Aunque el ER β se expresa en el cáncer de mama, su papel en la progresión del cáncer no está claro (Fuqua et al., 2003). Por otro lado, el papel del ER α en el cáncer de mama humano está bien establecido. Más del 60% de los cánceres de mama humanos son positivos para ER α (Keen y Davidson, 2003). Es un factor pronóstico para el cáncer de mama y se correlaciona con un mayor grado de diferenciación tumoral y un aumento de la supervivencia libre de enfermedad (Osborne, 1998). Por tanto, la expresión de ER α define un subgrupo de pacientes de cáncer de mama que, en general, presentan una prognosis más favorable que los pacientes con tumores negativos para ER α (Zhao et al., 2008). El ER α también es una diana para la terapia antiestrógenos y un marcador predictivo para la respuesta a terapia (Park y Jordan, 2002).

Existe un interés tremendo por entender los mecanismos mediante los cuales se modula la expresión y la señalización del ER α en el cáncer de mama, y por explotar dicho conocimiento para desarrollar y mejorar intervenciones terapéuticas dirigidas al ER α . Aunque se han identificado varios factores de transcripción o proteínas de señalización como reguladores de ER α , los eventos celulares y moleculares que regulan la expresión de ER α en los tumores todavía no se entienden bien. Adicionalmente, la relevancia clínica y la significación biológica de dichas regulaciones siguen aún bajo investigación. Se observó que el p53 se une al promotor de ER α y regula de forma positiva la transcripción de ER α en células de cáncer de mama (Shirley et al., 2009). Por el contrario, otro estudio mostró que la activación de p53 disminuye la actividad transcripcional del ER α elevando el factor de transcripción

factor 4 de tipo Kruppel, que puede interferir con la función de unión a ADN del ER α (Akaogi et al., 2009). De forma similar, se ha observado que el gen supresor del tumor BRCA1 activa o inhibe la expresión de ER α en diferentes estudios (Hosey et al., 2007; Rosen et al., 2005). El factor de transcripción Oct-1 también puede ser reclutado por el promotor ER α para provocar la transcripción de ER α (Hosey et al., 2007).

5 En líneas celulares de cáncer de mama, la expresión de ER α se asocia a los niveles de la proteína 3a O de caja
forkhead (FOXO3a) (Guo y Sonenshein, 2004). Un aumento de la expresión de FOXO3a induce la transcripción de
ER α y niveles de proteína. La FOXO3a se puede unir a dos sitios de unión conservados de forkhead dentro del
promotor de ER α . Por tanto, la FOXO3a puede representar un mediador intracelular importante de la expresión de
ER α (Guo y Sonenshein, 2004). Para apoyar este estudio, Belguise et al. Demostraron que el PKC ζ es elevado en
10 cánceres de mama negativos para ER α , activa Akt y con ello desactiva FOXO3a, conduciendo a una reducción de la
síntesis de ER α (Belguise y Sonenshein, 2007). También está bien documentado que la hiperactivación de MAPK
induce la pérdida de expresión de ER α en células de cáncer de mama (Oh et al., 2001). Tanto el Akt como el MAPK
pueden estar implicados en la regulación a la baja de ER α por EGFR/HER-2, lo puede dar lugar a una correlación
inversa entre EGFR/HER-2 y el estatus de ER α en los cánceres de mama (Oh et al., 2001; Saceda et al., 1996). Más
15 recientemente, se ha publicado que un receptor A1 de adenosina acoplado a proteína G regula al alza la expresión
de ER α (Lin et al.). Adicionalmente, la expresión de ER α también puede regularse a través de modificación
epigenética, p.ej., hipermetilación de su promotor, la cual se ha publicado que es la responsable de la pérdida de
ER α en algunas células de cáncer de mama (Yoshida et al., 2000).

20 Tal como se describe en los estudios de la presente memoria, el factor de transcripción de caja forkhead FOXC1 ha
sido identificado como un marcador importante para el cáncer de mama de tipo basal humano, que carece o sub-
expresa el receptor de estrógeno α (ER α). Además, tal como se discute más detalladamente a continuación, se
demuestra que la expresión de FOXC1 se correlaciona de forma consistente e inversa con la expresión de ER α a
través del análisis de múltiples conjuntos de datos de microsistemas de ADNc de cáncer de mama humano. La
sobreexpresión de FOXC1 en células de cáncer de mama positivas para ER α regula a la baja el ARNm y los niveles
25 de proteína de ER α , y reduce las respuestas celulares al tratamiento con estradiol y tamoxifeno. La sobreexpresión
de FOXC1 causa un aumento de los niveles de proteína p65, provocando de este modo la supresión de ER α
mediada por NF- κ B. La inhibición farmacológica de NF- κ B en células de cáncer de mama MCF-7 que sobreexpresan
FOXC1 disminuye estos efectos del FOXC1. Considerados en conjunto, estos resultados revelan un mecanismo
orquestado por FOXC1 que explica la pérdida o la baja expresión de ER α en el cáncer de mama de tipo basal y que
30 proporcionan un paradigma para estudiar la regulación de ER α durante la progresión del cáncer de mama.

FOXC1 como diana terapéutica para el cáncer de mama de tipo basal

Los estudios descritos en la presente memoria demuestran que el FOXC1 desempeña un papel importante en el
inicio y el mantenimiento de la capacidad agresiva de proliferación celular, invasión y migración que es típica en los
cánceres de mama de tipo basal. Éstos son atributos de precursor bien aceptados que son necesarios para, y que
35 se asocian a, la metástasis en órganos distantes, una característica clínica que se predice mediante el estatus de
FOXC1 de un paciente.

Los estudios en los que se ataca y bloquea la expresión de FOXC1 reducen drásticamente las anteriores
características agresivas de las células cancerígenas. Esto demuestra la utilidad del FOXC1 como fármaco
terapéutico dirigido específicamente a cánceres de mama de tipo basal.

40 Aunque la significación clínica de los subtipos de tipo basal híbrido descritos anteriormente no ha sido reconocida
previamente, dichos subtipos son típicamente resistentes a terapia dirigida a receptor, incluso aunque expresen el
receptor diana. Por ejemplo, el subtipo híbrido de tipo basal/HER2⁺ es típicamente resistente intrínsecamente a
terapias dirigidas a HER2⁺ que incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos anti-HER2 (p.ej., trastuzumab
(Herceptin®), pertuzumab y ertumaxomab) e inhibidores de tirosina quinasa (p.ej., lapatinib), a pesar de ser positivo
45 en HER2. De forma similar, el subtipo híbrido de tipo basal/luminal típicamente es resistente intrínsecamente a
terapias dirigidas a receptor hormonal que incluyen, aunque sin limitación, los moduladores de receptor de estrógeno
selectivos (SERMs) (p.ej., tamoxifeno), y otras terapias tales como los inhibidores de aromatasa (p.ej., anastazol
(Arimidex®), exemestano (Aromastin®) y letrozol (Femara®) y anti-estrógenos (p.ej., citrato de toremifeno
(Fareston®). Esta resistencia o reducción en la eficacia de una terapia de receptor dirigida es indicada por FOXC1.
50 Así, el estatus positivo de FOXC1 se puede usar como biomarcador predictivo de la resistencia o de la reducción de
eficacia de una terapia biológica intentada con trastuzumab (Herceptin®) o tamoxifeno en pacientes con cánceres de
mama híbridos de tipo basal. La administración de una terapia dirigida contra FOXC1 en tumores de subtipo híbrido
de tipo basal/HER2⁺ y de tumores de subtipo híbridos de tipo basal/luminal debería restaurar la sensibilidad
terapéutica a trastuzumab (Herceptin®) y tamoxifeno, respectivamente.

55 Los tumores de subtipo híbrido de tipo basal son incluso más agresivos en sus características biológicas y clínicas
que el subtipo molecular (HER2⁺ o luminal) o el subtipo de tipo basal por sí solos. Por lo tanto, todos los esfuerzos
en este grupo deberían incluir terapia dirigida de FOXC1, así como terapia dirigida a partir del momento más
temprano posible desde el diagnóstico.

Validado como biomarcador pronóstico, el estatus de FOXC1 se puede utilizar en la toma de decisiones clínicas en relación a las recomendaciones para ofrecer una quimioterapia adyuvante estándar, para participar en ensayos clínicos de quimioterapia de adyuvantes, para ofrecer quimioterapia neoadyuvante y para participar en ensayos clínicos de quimioterapia de neoadyuvantes, para pacientes con cáncer de mama de tipo basal. El estatus de FOXC1 también puede utilizarse en la toma de decisiones clínicas en relación a recomendaciones de tratamiento para un paciente diagnosticado como triple negativo en base a la determinación de que el paciente presente un subtipo de BLBC que es resistente a regímenes de tratamiento o tratamientos dirigidos o de otro tipo. Por ejemplo, un paciente diagnosticado como triple negativo y FOXCT es probable que sea resistente a la mayoría de las terapias dirigidas y/o a quimioterapia, y por tanto puede decidir someterse a tratamientos o regímenes de tratamiento en favor de vivir el resto de su vida sin los efectos negativos asociados a menudo a dichos tratamientos. Alternativamente, un inhibidor de FOXC1 u otra terapia dirigida de FOXC1 puede usarse en conjunción con regímenes de quimioterapia adyuvante y neoadyuvante.

Habiendo descrito la invención en referencia a las realizaciones y ejemplos ilustrativos, los especialistas en la técnica pueden apreciar modificaciones de la invención, tal como se describe y es ilustrada, que no se alejen del alcance de la invención tal como se describe en la especificación. Los ejemplos se presentan para ayudar a entender la invención, pero no pretenden limitar su alcance en modo alguno, y no deberían utilizarse para ello. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales. Dichos métodos son bien conocidos por los especialistas en la técnica y están descritos en numerosas publicaciones.

Ejemplo 1: FOXC1 es un biomarcador pronóstico con significación funcional en el cáncer de mama de tipo basal

Las firmas de expresión génica de un subtipo de cáncer de mama de tipo basal (BLBC) han sido asociadas a malos resultados clínicos. Tal como se describe a continuación, la sobreexpresión del factor de transcripción FOXC1 se muestra como una característica consistente de los BLBC en comparación con otros subtipos moleculares de cáncer de mama. Una expresión elevada de FOXC1 predijo una mala supervivencia global en BLBC (P = 0,0001), independientemente de otros factores pronósticos clinicopatológicos que incluyen el estatus de nodos linfáticos, junto con una mayor incidencia de metástasis cerebral (P = 0,02) y una menor supervivencia libre de metástasis cerebral en pacientes negativos en nodos linfáticos (P < 0,0001). La sobreexpresión ectópica de FOXC1 en células de cáncer de mama aumentó la proliferación celular, la migración y la invasión, mientras que el bloqueo de FOXC1 mediado por ARNsh dio lugar a los efectos opuestos. Estos descubrimientos identifican el FOXC1 como un biomarcador teranóstico que es específico de BLBC, ofreciendo no solo un candidato pronóstico potencial sino también una diana terapéutica molecular potencial en dicho subtipo de cáncer de mama.

Materiales y métodos

Análisis de microsistemas. Conjuntos de datos disponibles públicamente de microsistemas de expresión génica de cáncer de mama humano (Richardson et al. 2006; Farmer et al. 2005; Hess et al. 2006; Ivshina et al. 2006; Miller et al. 2005; van de Vijver et al. 2002; Herschkowitz et al. 2007; Sorlie et al. 2003; Wang et al. 2005; Pawitan et al. 2005) que consisten en archivos de datos de nivel de expresión en bruto y la base de datos ExpO Project del "International Genomics Consortium" (IGC) en <https://expo.intgen.org> fueron descargados y analizados usando el software Genespring GX 10.0 (Agilent Technologies) (ver la Tabla 1 a continuación). Se analizó un total de 2.073 muestras de pacientes de cáncer de mama. Para los sistemas de ADNc (3 de 11 conjuntos de datos), se importaron directamente los valores de intensidad de señal normalizada log₂ en la plataforma del software Genespring, obtenidos del respectivo repositorio web público. Para los datos brutos de microsistemas procedentes de los sistemas Affymetrix (8 de 11 conjuntos de datos), se obtuvieron las intensidades de señal usando el algoritmo "Robust Multi-chip Averaging" (RMA) para llevar a cabo una corrección de fondo, una normalización y una sumariación de datos brutos a nivel de sonda. Todos los valores fueron sometidos a una transformación de línea base respecto a la mediana de todas las muestras de un conjunto de datos particular en una base de conjunto (por gen)/(por sonda).

Tabla 1. Sumario de conjuntos de datos de microsistemas analizados.

| Nº Referencia | Nombre sistema | Tecnología de plataforma | Tamaño de muestra | Datos IHC completos | Análisis de supervivencia |
|---------------|-------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|
| | ExpO | Affymetrix U133 plus 2.0 | 250 | - | - |
| 9 | Richardson et al. | Affymetrix U133 plus 2.0 | 47 | - | - |
| 10 | Farmer et al. | Affymetrix U133A | 49 | - | - |
| 11 | Hess et al. | Affymetrix U133A | 133 | + | - |
| 12 | Ivshina et al. | Affymetrix U133A | 249 | - | - |
| 13 | Miller et al. | Affymetrix U133A | 251 | - | - |

| Nº Referencia | Nombre sistema | Tecnología de plataforma | Tamaño de muestra | Datos IHC completos | Análisis de supervivencia |
|---------------|----------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|
| 14 | van de Vijver et al. | ADNc | 295 | - | + |
| 15 | Herschowitz et al. | ADNc | 232 | - | + |
| 16 | Sorlie et al. | ADNc | 122 | - | + |
| 17 | Wang et al. | Affymetrix U133A | 286 | - | + |
| 18 | Pawitan et al. | Affymetrix U133A | 159 | - | + |

Todos los conjuntos de datos de microsistemas usados en este estudio proceden de bases de datos disponibles públicamente, y dichas bases de datos requieren que los datos brutos de expresión génica, depositados por los investigadores originales, cumplan unos criterios de control de calidad exigentes antes de ser aceptados. Adicionalmente, todos los conjuntos de datos han sido publicados previamente en bibliografía y en las referencias originales se muestran medidas de control de calidad individuales. Como tal, en el presente estudio, se adoptaron medidas de control de calidad para confirmar la calidad de los datos establecida previamente, más que como paso inicial para documentar la calidad de los datos. El control de calidad de los sistemas se llevó a cabo usando gráficos 3D de Análisis de Componente Principal (PCA), Controles Internos que comprenden relaciones 3'/5' para un conjunto de grupos de sondas génicas domésticas específicas, y Controles de Hibridación. Una relación de 3'/5' superior a 3 se consideró inaceptable (representativa de ARN que comienza a degradarse o de un problema en la reacción de síntesis de ADNc). Las intensidades de señal de los transcritos de control de hibridación pre-mezclados sumadas a la mezcla de hibridación en concentración estratificadas conocidas deberían aumentar según es de esperar por las concentraciones estratificadas conocidas. Una desviación respecto al perfil de intensidad esperado en estos controles, determinado mediante inspección visual de los gráficos de Control de Hibridación, se consideró inaceptable (representativa de un problema en la hibridación o en el proceso de lavado). En base a estos criterios, solo se eliminó un sistema (del conjunto de datos de Richardson et al.) de los 2.073 sistemas examinados. Las puntuaciones PCA de cada sistema se representaron en 3D a fin de examinar el patrón de agrupamiento de las muestras. Se observaron tres grupos principales en cada conjunto de datos, consistente con la variación biológica esperada en dicha población, que da lugar a la segregación en los tres subtipos moleculares –luminal, HER2 y de tipo basal. Las sondas de los sistemas analizados fueron filtradas en base a valores bandera. En caso contrario fueron filtradas en base a los valores de intensidad de señal, de tal modo que se retuvieron los valores entre los percentiles 20,0 y 100,0 de un conjunto de datos dado.

Para la identificación de los subtipos moleculares, empleamos el Set Génico Intrínseco (IGS) de 306 miembros habitualmente utilizado (Hu et al. 2006). Solo 293 genes del panel original de 306 genes fueron representados sobre la plataforma de microsistema de nuestro conjunto de datos de ensayo que fue seleccionado en base a su inclusión en muestras de tejido de mama normales (Richardson et al. 2006). Sometimos a todos los conjuntos de datos a un algoritmo de agrupamiento jerárquico empleando una métrica de similitud no centrada de Pearson y la regla de enlace promedio basada en el IGS de 293 genes. A continuación los conjuntos de datos fueron agrupados en los subtipos luminal A/B, HER2 y tipo basal en base al IGS. En el conjunto de datos de Richardson et al se excluyeron 12 muestras, ya que fueron derivadas de preparaciones organoides normales y no de tejido de mama normal, 4 muestras positivas de BRCA fueron excluidas para reducir la tendencia, 1 muestra se excluyó por no cumplir los estándares de control de calidad y 1 muestra clasificada por los autores como de tipo basal fue agrupada con el subtipo luminal y por tanto se excluyó del análisis.

Para determinar la correlación entre el estatus de FOXC1 y el de triple-negativo, realizamos una búsqueda de conjuntos de datos disponibles públicamente que contuvieran los perfiles de expresión de ER, PR y HER2 de cada espécimen de cáncer de mama en base a análisis inmunohistológicos. Solo se identificó un conjunto de datos así, el de Hess et al (Hess et al. 2006).

Los niveles de ARNm relativos medios (intensidad de señal \log_2 media) de cada gen IGS y de marcadores de BLBC publicados en bibliografía (cristalina- α B (Moyano et al. 2006), moesina (Charafe-Jauffret et al. 2007), CD109 (Hasegawa et al. 2008), p-Caderina, EGFR (Nielsen et al., 2004), CK5 (Nielsen et al. 2004; Korsching et al. 2008), CK14 (Korsching et al. 2008), CK17 (Korsching et al. 2008), c-Kit (Nielsen et al. 2004), ITGB4 (Lu et al. 2008), y FOXC2 (Mani et al. 2007)) fueron determinados según el subtipo molecular. Los valores de expresión para algunos genes no estaban distribuidos normalmente, razón por la cual empleamos análisis no paramétrico (Test de Mann-Whitney) para comparar el grupo de tipo basal con los valores de expresión de grupo de tipo no basal agrupados (intensidad de señal \log_2 normalizada) para cada gen. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el software SAS (versión 9.1.3, Instituto SAS, Cary, NC). Se llevó a cabo un análisis de regresión logístico por pasos para identificar el gen más característico del grupo de tipo basal. En vista del pequeño tamaño del conjunto de datos de Richardson et al (con covariantes altamente predictivos que dan como resultado la no convergencia), se usó el análisis de regresión logística modificado de Firth para reducir la tendencia de la estimación de probabilidad máxima

de este sistema. La significación estadística de cada uno de estos análisis se definió como $P < 0,05$. Para mantener la potencia estadística, se analizó de forma independiente cada conjunto de datos, tal como se muestra a continuación en las Tablas 2-5.

5 **Tabla 2.** Análisis estadístico de biomarcador en subgrupos moleculares clasificados mediante IGS en el conjunto de datos de microsistema de cáncer de mama de Richardson et al. (2).

| Gen | Media Normal \pm SD (Mediana) | Media Luminal \pm SD (Mediana) | Media HER2 \pm SD (Mediana) | Media tipo basal \pm SD (Mediana) | Test de Suma de Rango de Wilcoxon Univariable (tipo basal vs. otro) Valor P | Valor P de regresión logística multivariable† |
|-------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| | -0,11 \pm 0,73 (-0,23) | -1,63 \pm 0,38 (-1,60) | -0,99 \pm 0,71 (-1,03) | 3,61 \pm 0,75 (3,63) | | |
| | -1,87 \pm 0,39 (1,87) | -1,61 \pm 1,11 (-1,66) | -1,82 \pm 0,78 (-1,93) | 1,34 \pm 1,30 (1,27) | | |
| FOXC1 | 2,98 \pm 0,38 (2,72) | -1,17 \pm 0,98 (-1,32) | -1,35 \pm 1,02 (-1,31) | 0,81 \pm 1,48 (1,14) | < 0,0001 | 0,0006 |
| CRYAB | 3,08 \pm 0,47 (3,07) | -0,93 \pm 0,88 (-1,03) | -1,21 \pm 0,76 (-1,16) | 0,60 \pm 1,22 (0,32) | 0,001 | NS |
| KRT5 | 1,21 \pm 0,43 (1,35) | -1,13 \pm 0,66 (-1,40) | -0,11 \pm 0,92 (-0,20) | 0,64 \pm 1,24 (0,97) | NS | NS |
| CDH3 | 0,18 \pm 0,33 (0,15) | -0,32 \pm 0,61 (-0,41) | -0,57 \pm 0,44 (-0,51) | 0,60 \pm 0,88 (0,70) | 0,036 | NS |
| MSN | 2,84 \pm 0,25 (2,81) | -1,03 \pm 0,80 (-1,05) | -0,79 \pm 1,13 (-0,95) | 0,92 \pm 1,78 (1,05) | 0,002 | NS |
| KRT17 | 0,32 \pm 0,40 (0,39) | -0,50 \pm 0,30 (-0,51) | 0,02 \pm 0,67 (0,19) | 0,25 \pm 0,55 (0,27) | NS | NS |
| EGFR | 3,44 \pm 0,51 (3,60) | -1,30 \pm 1,84 (-0,82) | -2,15 \pm 1,82 (-1,49) | 0,69 \pm 2,53 (0,59) | 0,044 | NS |
| KRT14 | 0,32 \pm 0,40 (0,39) | -0,50 \pm 0,30 (-0,51) | 0,02 \pm 0,67 (0,19) | 0,25 \pm 0,55 (0,27) | NS | NS |
| CD109 | 3,44 \pm 0,51 (3,60) | -1,30 \pm 1,84 (-0,82) | -2,15 \pm 1,82 (-1,49) | 0,69 \pm 2,53 (0,59) | 0,004 | NS |
| ITGB4 | -0,46 \pm 0,62 (-0,25) | -0,45 \pm 0,91 (-0,19) | -0,77 \pm 1,02 (-1,08) | 0,46 \pm 0,98 (0,63) | NS | NS |
| FOXC2 | 0,40 \pm 0,39 (0,34) | -0,32 \pm 0,35 (-0,37) | 0,24 \pm 0,74 (0,01) | 0,19 \pm 0,87 (0,13) | NS | NS |
| | 0,09 \pm 0,13 (0,07) | -0,01 \pm 0,20 (-0,03) | -0,01 \pm 0,16 (0,03) | 0,04 \pm 0,26 (0,01) | | |

Los valores de cada columna de subtipo molecular son la media \pm SD de la intensidad de señal normalizada log2 para la sonda de ADNc más representativa para dicho gen. NS, $P > 0,05$.

† Análisis de regresión logística modificado de Firth usado para reducir la tendencia de la estimación de probabilidad máxima en este sistema (caracterizado por un tamaño de muestra pequeño con covariables altamente predictivas que dan como resultado la no convergencia). El tipo basal (sí=1, no=0) fue usado como una variable dependiente.

Tabla 3. Análisis estadístico de biomarcador en subgrupos moleculares clasificados mediante IGS en el conjunto de datos de microsistema de cáncer de mama de Ivshina et al. (14).

| Gen | Media Luminal ± SD (Mediana) | Media HER2 ± SD (Mediana) | Media tipo basal ± SD (Mediana) | Test de Suma de Rango de Wilcoxon Univariable (tipo basal vs. otro) Valor P | Valor P de regresión logística multivariable _† |
|-------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| | 0,02 ± 0,27 (-0,01) | | 1,88 ± 0,71 (1,92) | | |
| | -0,06 ± 0,76 (-0,18) | 0,00 ± 0,28 (-0,05) | 1,94 ± 0,92 (2,07) | | |
| FOXC1 | | 0,90 ± 0,84 (0,73) | 1,94 ± 1,23 (2,20) | < 0,0001 | 0,0033 |
| CDH3 | -0,03 ± 0,79 (-0,06) | -0,30 ± 0,44 (-0,40) | | < 0,0001 | 0,0199 |
| CRYAB | -0,05 ± 0,94 (-0,17) | 0,41 ± 0,86 (0,28) | 1,20 ± 0,57 (1,15) | < 0,0001 | NS |
| EGFR | | | 2,06 ± 1,54 (1,99) | < 0,0001 | NS |
| KRT17 | 0,13 ± 0,99 (-0,11) | 0,51 ± 1,10 (0,09) | | < 0,0001 | NS |
| KRT5 | | 0,12 ± 0,85 (0,00) | 2,20 ± 1,34 (2,20) | < 0,0001 | NS |
| MSN | 0,09 ± 1,08 (-0,21) | 0,06 ± 0,35 (-0,12) | | < 0,0001 | NS |
| ITGB4 | -0,10 ± 0,48 (-0,04) | 0,28 ± 0,46 (0,35) | 0,74 ± 0,42 (0,82) | 0,0016 | NS |
| KIT | | -0,27 ± 0,87 (-0,46) | 0,45 ± 0,65 (0,26) | 0,0011 | NS |
| KRT14 | -0,03 ± 0,44 (-0,07) | | | 0,0001 | NS |
| FOXC2 | 0,11 ± 1,00 (0,00) | -0,30 ± 1,47 (-0,57) | 1,07 ± 1,45 (1,25) | NS | NS |
| | -0,24 ± 1,96 (-0,15) | 0,05 ± 0,16 (0,05) | 1,99 ± 2,08 (1,55) | | |
| | 0,00 ± 0,17 (0,00) | | 0,07 ± 0,26 (0,02) | | |

Los valores de cada columna de subtipo molecular son la media ± SD de la intensidad de señal normalizada log2 para la sonda de ADNc más representativa para dicho gen. NS, P > 0,05.

* CD109 no tiene ninguna sonda representativa en esta plataforma de microsistemas. En el análisis de regresión logística multivariable, la variable dependiente es el tipo basal.

Tabla 4. Análisis estadístico de biomarcador en subgrupos moleculares clasificados mediante IGS en el conjunto de datos de microsistema de cáncer de mama de Miller et al. (15).

| Gen | Media Luminal ± SD (Mediana) | Media HER2 ± SD (Mediana) | Media tipo basal ± SD (Mediana) | Test de Suma de Rango de Wilcoxon Univariable (tipo basal vs. otro) Valor P | Valor P de regresión logística multivariable _† |
|-------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| FOXC1 | 0,02 ± 0,28 (-0,01) | -0,04 ± 0,29 (-0,12) | 1,86 ± 0,71 (1,90) | < 0,0001 | 0,0003 |
| CDH3 | -0,05 ± 0,76 (-0,16) | 0,87 ± 0,94 (0,75) | 1,95 ± 0,91 (2,09) | < 0,0001 | 0,0153 |
| KRT17 | | 0,48 ± 1,11 (0,08) | | < 0,0001 | NS |
| EGFR | 0,13 ± 1,01 (-0,09) | 0,39 ± 0,88 (0,08) | 2,05 ± 1,54 (1,99) | < 0,0001 | NS |

| Gen | Media Luminal ± SD (Mediana) | Media HER2 ± SD (Mediana) | Media tipo basal ± SD (Mediana) | Test de Suma de Rango de Wilcoxon Univariable (tipo basal vs. otro) Valor P | Valor P de regresión logística multivariable† |
|-------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| MSN | -0,04 ± 0,94 (-0,17) | -0,13 ± 0,42 (-0,19) | 1,21 ± 0,57 (1,16) | < 0,0001 | NS |
| CRYAB | -0,09 ± 0,47 (-0,03) | -0,38 ± 0,48 (-0,41) | 0,74 ± 0,42 (0,82) | < 0,0001 | NS |
| KRT5 | -0,01 ± 0,78 (-0,05) | 0,07 ± 0,88 (0,00) | 1,94 ± 1,24 (2,20) | < 0,0001 | NS |
| KRT14 | 0,10 ± 1,08 (-0,16) | -0,40 ± 1,50 (-0,61) | 2,19 ± 1,33 (2,18) | 0,002 | NS |
| ITGB4 | -0,26 ± 1,96 (-0,14) | -0,27 ± 0,86 (-0,43) | 1,94 ± 2,07 (1,50) | NS | NS |
| KIT | -0,02 ± 0,45 (-0,07) | 0,03 ± 0,18 (0,05) | 0,45 ± 0,65 (0,26) | | NS |
| FOXC2 | 0,12 ± 1,01 (0,01) | | 1,07 ± 1,45 (1,25) | | |
| | 0,00 ± 0,17 (0,00) | | 0,06 ± 0,26 (0,02) | | |

Los valores de cada columna de subtipo molecular son la media ± SD de la intensidad de señal normalizada log2 para la sonda de ADNc más representativa para dicho gen. NS, P > 0,05.

* CD109 no tiene ninguna sonda representativa en esta plataforma de microsistemas. En el análisis de regresión logística multivariable, la variable dependiente es el tipo basal.

Tabla 5. Análisis estadístico de biomarcador en subgrupos moleculares clasificados mediante IGS en el conjunto de datos de microsistema de cáncer de mama de van de Vijver et al. (16).

| Gen | Media Luminal ± SD (Mediana) | Media HER2 ± SD (Mediana) | Media tipo basal ± SD (Mediana) | Test de Suma de Rango de Wilcoxon Univariable (tipo basal vs. otro) Valor P | Valor P de regresión logística multivariable† |
|-------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| FOXC1 | -0,51 ± 0,21 (-0,50) | -0,41 ± 0,21 (-0,41) | 0,49 ± 0,42 (0,58) | < 0,0001 | 0,0028 |
| CRYAB | -0,36 ± 0,24 (-0,36) | -0,29 ± 0,19 (-0,29) | 0,27 ± 0,47 (0,28) | < 0,0001 | NS |
| KRT5 | -0,56 ± 0,40 (-0,50) | -0,45 ± 0,42 (-0,28) | 0,16 ± 0,56 (0,10) | < 0,0001 | 0,0084 |
| KIT | -0,17 ± 0,24 (-0,16) | -0,22 ± 0,25 (-0,19) | 0,05 ± 0,34 (0,05) | < 0,0001 | NS |
| CDH3 | -0,49 ± 0,29 (-0,49) | -0,14 ± 0,38 (-0,15) | 0,32 ± 0,31 (0,37) | < 0,0001 | NS |
| MSN | -0,14 ± 0,17 (-0,13) | -0,05 ± 0,16 (-0,06) | 0,21 ± 0,14 (0,24) | < 0,0001 | NS |
| KRT17 | -0,33 ± 0,28 (- | -0,22 ± 0,39 (- | 0,21 ± 0,46 | 0,0001 | NS |
| EGFR | | | | < 0,0001 | NS |
| KRT14 | | | | < 0,0001 | NS |
| ITGB4 | | | | < 0,0001 | NS |

| Gen | Media Luminal ± SD (Mediana) | Media HER2 ± SD (Mediana) | Media tipo basal ± SD (Mediana) | Test de Suma de Rango de Wilcoxon Univariable (tipo basal vs. otro) Valor P | Valor P de regresión logística multivariable† |
|-----|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| | 0,35) | 0,14) | (0,17) | | |
| | -0,05 ± 0,14 (-0,05) | -0,01 ± 0,15 (-0,03) | 0,07 ± 0,21 (0,06) | | |
| | -0,10 ± 0,12 (-0,11) | -0,08 ± 0,13 (-0,11) | 0,08 ± 0,30 (0,02) | | |
| | -0,03 ± 0,12 (-0,03) | 0,10 ± 0,14 (0,08) | 0,12 ± 0,19 (0,12) | | |

Los valores de cada columna de subtipo molecular son la media ± SD de la intensidad de señal normalizada log2 para la sonda de ADNc más representativa para dicho gen. NS, P > 0,05.

* FOXC2 y CD109 no tienen ninguna sonda representativa en esta plataforma de microsistemas. En el análisis de regresión logística multivariable, la variable dependiente es el tipo basal.

5 Para simplificar la interpretación de datos, en el análisis no se incluyó el grupo de tipo mama normal. El grupo de tipo mama normal se asemeja a muestras de tejido de mama normal con una expresión relativamente alta de genes característicos de células adiposas y otros tipos de células no epiteliales y una baja expresión de genes de célula epitelial luminal. Debido a que la clasificación de tipo normal se desarrolló entrenando con tejido de mama normal, se ha especulado que el subgrupo de tipo normal puede ser básicamente un artefacto al tener un alto porcentaje de "contaminación" normal en especímenes tumorales (Parker et al. 2009). Otras explicaciones incluyen un grupo de tumores de tipo basal de crecimiento lento que carecen de expresión de genes de proliferación o un potencial nuevo subtipo denominado tumores de baja Claudina (Herschkowitz et al. 2007). Adicionalmente, son algunos de los conjuntos de datos usados en nuestro análisis contienen muestras de tipo normal. No se observó que el FOXC1 se sobreexpresara en dichas muestras (datos no mostrados).

15 *Análisis de firma genética.* Buscando desarrollar una firma genética asociada a la expresión del gen FOXC1 capaz de detectar de forma precisa el subtipo de tipo basal independiente de IGS, primero se analizó el conjunto de datos de ensayo que incluía las muestras de tejido de mama normales (2). Se incluyeron los genes que compartían una regulación al alza coordinada y los genes que compartían una regulación a la baja coordinada con la regulación al alza de FOXC1. Se usaron criterios de inclusión restrictivos supervisados en base al grado de coeficientes de correlación de Pearson (1,0>r>0,5 para genes con regulación al alza coordinada y -1,0<r<-0,5 para genes con regulación a la baja coordinada, respectivamente). Solo los genes que mantenían su alto grado de correlación con el FOXC1, independientemente de sus correlaciones individuales con los subtipos de cáncer de mama, fueron incluidos en el panel final y se validaron en un total de 5 conjuntos de datos de microsistemas analizados individualmente (Richardson et al. 2006; Farmer et al. 2005; Ivshina et al. 2006; Miller et al. 2005 -2, 13-15) y la Base de datos del Proyecto ExpO del "International Genomics Consortium" (IGC) en <https://expo.intgen.org>. Los 30 genes que cumplen los criterios de inclusión permitiendo una máxima aplicabilidad en plataformas de microsistemas de generaciones más tempranas (es decir, que se encuentren entre los primeros 30 genes asociados a la expresión de FOXC1 en 3 ó más de las 5 bases de datos) son denominados de forma colectiva firma genética de FOXC1 (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson de los 30 genes asociados a la expresión génica de FOXC1 en cinco conjuntos de datos de microsistema (2, 13-15).

| Nº | Símbolo génico de Conjunto de datos | Richardson et al. | ExpO | Farmer et al. | Ivshina et al. | Miller et al. | Frecuencia* |
|----|-------------------------------------|-------------------|------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| 1 | FOXC1 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 5 |
| 2 | OGFRL1 | 0,86 | 0,50 | 0,49 | 0,65 | 0,66 | 4 |
| 3 | ROPN1B | 0,83 | 0,75 | 0,80 | 0,73 | 0,73 | 5 |

ES 2 546 410 T3

| Nº | Símbolo génico de Conjunto de datos | Richardson et al. | ExpO | Farmer et al. | Ivshina et al. | Miller et al. | Frecuencia* |
|----|-------------------------------------|-------------------|-------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| 4 | ART3 | 0,83 | 0,65 | 0,59 | 0,63 | 0,64 | 5 |
| 5 | FABP7 | 0,82 | 0,39 | 0,40 | 0,57 | 0,60 | 3 |
| 6 | C10orf38 | 0,82 | 0,65 | 0,70 | 0,72 | 0,72 | 5 |
| 7 | EN1 | 0,81 | 0,74 | 0,80 | 0,74 | 0,73 | 5 |
| 8 | KCNK5 | 0,80 | 0,63 | 0,64 | 0,65 | 0,64 | 5 |
| 9 | CHODL | 0,80 | 0,60 | 0,54 | 0,56 | 0,57 | 5 |
| 10 | PRKX | 0,80 | 0,55 | 0,73 | 0,66 | 0,66 | 5 |
| 11 | C21orf91 | 0,79 | 0,56 | 0,39 | 0,52 | 0,53 | 4 |
| 12 | GABRP | 0,78 | 0,70 | 0,77 | 0,74 | 0,74 | 5 |
| 13 | ELF5 | 0,77 | 0,65 | 0,63 | 0,61 | 0,61 | 5 |
| 14 | PAPSS1 | 0,77 | 0,48 | 0,47 | 0,54 | 0,54 | 3 |
| 15 | ACTR3B | 0,77 | 0,64 | 0,63 | 0,55 | 0,55 | 5 |
| 16 | LMO4 | 0,76 | 0,41 | 0,59 | 0,65 | 0,64 | 4 |
| 17 | ZIC1 | 0,75 | 0,53 | 0,61 | 0,39 | 0,39 | 3 |
| 18 | UGT8 | 0,75 | 0,64 | 0,46 | 0,60 | 0,60 | 4 |
| 19 | MICALL1 | 0,75 | 0,70 | 0,78 | 0,64 | 0,64 | 5 |
| 20 | FOXA1 | -0,87 | -0,75 | -0,81 | -0,82 | -0,82 | 5 |
| 21 | MLPH | -0,86 | -0,70 | -0,78 | -0,69 | -0,69 | 5 |
| 22 | SIDT1 | -0,84 | -0,58 | -0,73 | -0,56 | -0,55 | 5 |
| 23 | AGR2 | -0,83 | -0,67 | -0,71 | -0,59 | -0,59 | 5 |
| 24 | SPDEF | -0,81 | -0,64 | -0,72 | -0,79 | -0,78 | 5 |
| 25 | TFF3 | -0,80 | -0,53 | -0,67 | -0,46 | -0,45 | 3 |
| 26 | AR | -0,80 | -0,50 | -0,56 | -0,58 | -0,59 | 5 |
| 27 | TBC1D9 | -0,79 | -0,62 | -0,66 | -0,66 | -0,66 | 5 |
| 28 | CA12 | -0,78 | -0,60 | -0,66 | -0,66 | -0,66 | 5 |
| 29 | GATA3 | -0,77 | -0,56 | -0,71 | -0,70 | -0,70 | 5 |
| 30 | GALNT6 | -0,75 | -0,53 | -0,66 | -0,52 | -0,51 | 5 |

* La frecuencia denota el número de conjuntos de datos en los que está presente una correlación de genes individuales con la expresión de FOXC1 (> 0,50 para genes regulados al alza de forma coordinada, y < -0,50 para genes regulados a la baja de forma coordinada, respectivamente).

5 Para validar la capacidad de esta firma genética para identificar cáncer de mama de tipo basal, además de los 5 conjuntos de datos mencionados anteriormente usados para refinar la firma genética, se evaluó de forma individual otros 6 conjuntos de datos de microsistema de Affymetrix y ADNC de cáncer de mama humano disponibles públicamente (Hess et al. 2006; Herschkowitz et al. 2007; van de Vijver et al. 2002; Sorlie et al. 2003; Wang et al. 2005; Pawitan et al. 2005) que representan el análisis en total de 2.073 pacientes de cáncer de mama. Todos los conjuntos de datos fueron sometidos a un algoritmo de agrupamiento jerárquico que emplea una métrica de similitud no centrada de Pearson y la regla de enlace promedio basada en la firma genética de FOXC1 de 30 miembros. La

extensión de una clasificación correcta de muestras de cáncer de mama como pertenecientes al subtipo de tipo basal se comparó con las clasificadas mediante IGS.

Análisis de supervivencia. A continuación se determinó la importancia pronóstica potencial de la expresión de ARNm de FOXC1 en el cáncer de mama, haciendo hincapié en determinar su capacidad para predecir correctamente la supervivencia de pacientes con cáncer de mama de tipo basal. Este análisis se llevó a cabo con la intención de determinar si la expresión de ARNm de FOXC1 podía usarse como biomarcador pronóstico individual por sí sola para el cáncer de mama de tipo basal en lugar de clasificadores inmunohistoquímicos y/o moleculares patológicos tales como IGS. Se sometió a análisis un conjunto de datos de microsistema de oligonucleótidos de cáncer de mama de 295 muestras (van de Vijver et al. 2002) con datos de seguimiento que se extendía hasta un periodo de 20 años. La significación pronóstica del FOXC1 también fue examinada en tres conjuntos de datos de ADNc de cáncer de mama humano adicionales: un conjunto de datos de 232 muestras (Herschkowitz et al. 2007), un conjunto de datos de 122 muestras (Sorlie et al. 2003) y un conjunto de datos de 159 muestras (Pawitan et al. 2005). Se estimaron las distribuciones de supervivencia usando métodos de Kaplan-Meier y se compararon usando un test log-rank. En los análisis de supervivencia multivariable, se usó el modelo de regresión de peligro proporcional de Cox incorporando el estatus de fenotipo (tipo basal frente a tipo no basal), nivel de FOXC1, edad, tamaño de tumor, grado de tumor, y estatus de nodos linfáticos como posibles predictores de la supervivencia. La suposición de peligro proporcional fue validada usando representaciones de los residuos y ensayos de proporcionalidad. La significación pronóstica relativa de dos modelos pronósticos separados fue evaluada comparando el ajuste del modelo tras ajustar las variables clinicopatológicas. Un modelo se basó en la expresión dicotómica de los niveles de ARNm de FOXC1. El otro modelo se basó en la agrupación de tipo basal derivada de IGS tras agrupamiento jerárquico. La significación pronóstica relativa de cada modelo se midió usando el Criterio de Información de Akaike (AIC) para establecer el ajuste de los dos modelos de regresión (Akaike 1974).

Se examinó la asociación con metástasis al cerebro o los huesos en pacientes de cáncer de mama negativo para nodos linfáticos en el conjunto de datos de Wang et al. (Wang et al. 2005). Se usó el test Rank sum de Wilcoxon para determinar la significación estadística para esta comparación. También se examinó la supervivencia libre de metástasis específica de cerebro y específica de huesos en el mismo conjunto de datos. Se llevaron a cabo análisis univariable y multivariable usando el test log-rank y el modelo de regresión de Cox, respectivamente. Las variables incluidas en el análisis multivariable se seleccionaron en base a la significación estadística en el análisis univariable inicial e incluían la edad, el tamaño tumoral y el estatus de nodos linfáticos. Se generaron gráficos de supervivencia usando métodos Kaplan-Meier.

Inmunohistoquímica e inmunotinción. La inmunohistoquímica se llevó a cabo usando un sistema de detección de peroxidasa con microsistemas de tejido de cáncer de mama humano BRC961 y BR962 (US Biomax) y un anticuerpo FOXC1 policlonal que no reconoce FOXC2 (Lifespan Biosciences). La concentración de anticuerpos (1:100) se determinó mediante valoración en serie y optimización del anticuerpo en sistemas de ensayo. Resumidamente, tras recuperar el antígeno, se añadieron anticuerpos primarios, seguidos de una incubación de anticuerpos secundarios biotinilados, que a continuación se unen a estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se desarrolló la señal con diaaminobencidina como cromógeno con hematoxilina como contra-tinción. Los portaobjetos inmunoteñidos fueron evaluados al microscopio estimando la proporción y la intensidad media de células tumorales positivas con tinción nuclear y/o citoplásmica. También se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico con 42 especímenes de cáncer de mama humano triple negativo obtenidos del Departamento de Patología del "Saint John's Health Center" y del banco de tejidos del "John Wayne Cancer Institute" con la aprobación del "Institutional Review Board". Se llevó a cabo la inmunotinción usando un anticuerpo de Santa Cruz Biotechnology. Se generaron lisatos celulares completos para el análisis de transferencia Western con disolución tamponante de lisis celular (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, 1% de NP-40, 10% de glicerol) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma, St. Louis, MO). Se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE al 10% y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las etapas restantes se llevaron a cabo según un protocolo de inmunotinción estándar.

Resultados y discusión

El análisis de expresión génica de conjuntos de datos de microsistema de cáncer de mama humano disponibles públicamente reveló que el factor de transcripción de caja Forkhead FOXC1, esencial para el desarrollo del tejido de mesoderma, presentaba una expresión significativamente más alta en el subgrupo de tipo basal que en los otros subtipos (Figuras 1A, 1B, 2 y 3A-C). Una elevada expresión de FOXC1 se correlacionó positivamente y de forma significativa con el subgrupo de tipo basal, tal como se muestra en las anteriores Tablas 2-5. También se asoció una elevada expresión de ARNm de FOXC1 al cáncer de mama triple negativo, consistente con la noción de que entre el 60% y el 90% de los cánceres de mama triple negativos son de tipo basal (Figuras 1C y 3D). Se derivó una firma de FOXC1 de 30 genes a partir de la correlación con la expresión de FOXC1 en seis conjuntos de datos (Tabla 6, arriba) y se validó en cinco conjuntos de datos separados. Estos genes presentaron un perfil de expresión global que coincidió con el subgrupo de tipo basal agrupado mediante IGS (Figuras 1D y 4). Inversamente, el agrupamiento jerárquico usando la firma genética de FOXC1 identificó el mismo subgrupo de tipo basal determinado por IGS (Figura 5). Aunque el análisis del mecanismo de esta firma genética no dio lugar a un mecanismo dominante (datos no mostrados), algunos miembros tales como FABP7, GABRP, EN1, KCNK5, ZIC1, ACTR3B y FOXC1 están

implicados de forma notable en el desarrollo cerebral y en la tumorigénesis cerebral, lo que explica por qué el BLBC se metastiza preferencialmente al cerebro.

A continuación se evaluó la expresión de proteína FOXC1 usando inmunohistoquímica sobre microsistemas de tejido (TMA, del inglés "tissue microarrays") de cáncer de mama. Se observó una fuerte tinción de FOXC1 nuclear en muestras de TMA triple negativas que expresan citoqueratinas basales (CK5/6+ y/o CK14+; Figura 6A) pero no en los tumores que no eran triple negativos (datos no mostrados). La tinción citoplásmica de FOXC1 fue escasa, siendo normalmente concomitante con la tinción nuclear de FOXC1. Este patrón de localización subcelular se confirmó en una cohorte independiente de 42 especímenes de cáncer de mama triple negativos archivados. La expresión positiva de FOXC1 (FOXC1+) se asoció significativamente a la expresión de citoqueratinas basales (Figura 6B) y presentó una sensibilidad de 0,81 y una especificidad de 0,80 en la detección del fenotipo de tipo basal identificado mediante tinción positiva de CK5/6 y/o CK14. La ausencia de tinción CK en algunas muestras FOXC1+/ER-/PR-/HER2- de esta cohorte puede reflejar una expresión inconsistente de dichas citoqueratinas en BLBCs definidos por sistemas de expresión (Nielsen et al. 2004). El descubrimiento de que el FOXC1 nuclear se detectaba de forma consistente mediante inmunohistoquímica a pesar de su corta vida media proteica (<30 minutos; Berry et al. 2006) sugiere una expresión constitutiva robusta de FOXC1 en BLBC. El análisis del conjunto de datos de microsistema correspondiente a un panel de línea celular de cáncer de mama humano reveló una mayor expresión de FOXC1 en líneas celulares de BLBC (Figura 7), lo que fue confirmado mediante inmunotinción (Figura 6C).

La significación pronóstica de FOXC1 en el cáncer de mama se examinó a continuación en el conjunto de datos de 295 muestras de van de Vijver et al (van de Vijver et al. 2002). En el análisis univariable, la supervivencia global fue significativamente peor en tumores identificados usando la firma de FOXC1 de 30 genes ($P = 0,0004$) o usando solo niveles elevados de ARNm de FOXC1 ($P = 0,0001$; Figura 8A). La supervivencia global disminuyó en un 35% por cada aumento unitario de los niveles de ARNm de FOXC1 relativos. En el análisis multivariable, el FOXC1 fue un indicador pronóstico independiente de la supervivencia global tras ajustar las variables clinicopatológicas tales como edad, tamaño de tumor y estatus de nodos linfáticos (relación de peligro, 1,25; intervalo de confianza al 95%, 1,02-1,52; $P = 0,02$). Se usaron los criterios de información Akaike (AIC; Akaike 1974) al comparar el ajuste de los dos modelos pronósticos separados tras ajustar las variables clinicopatológicas. El modelo basado en la expresión de ARNm de FOXC1 (AIC, 820,0) fue similar al modelo basado en la agrupación de tipo basal derivada por IGS (AIC, 815) en términos del ajuste del modelo para predecir la supervivencia. La asociación de FOXC1 con la supervivencia global también se demostró en el conjunto de datos de 232 muestras de Herschkowitz et al (Herschkowitz et al. 2007), el de 122 muestras de Sorlie et al (Sorlie et al. 2003) y el 159 muestras de Pawitan et al (Pawitan et al. 2005) (Figura 9). Además, la firma genética de FOXC1 y los niveles de ARNm, como el fenotipo de tipo basal, permitieron la estratificación pronóstica de cánceres de mama negativos para nodos linfáticos ($P = 0,0003$) en el conjunto de datos de van de Vijver (van de Vijver et al. 2002; Figura 8B). Adicionalmente, una expresión de FOXC1 elevada, que se asoció positivamente a metástasis cerebral ($P = 0,02$) y se asoció inversamente a metástasis ósea ($P = 0,0002$) en el conjunto de datos de Wang et al (Wang et al. 2005), se correlacionó significativamente con una supervivencia libre de metástasis cerebral más corta ($P < 0,0001$; Figura 8C y D).

Ejemplo 2: La medida cuantitativa de expresión de FOXC1 usando RT-PCR se puede usar para diagnosticar con precisión el cáncer de mama de tipo basal

El análisis de expresión génica ha clasificado el cáncer de mama en cinco subtipos moleculares. El cáncer de mama de tipo basal comprende hasta un 15%-25% de todos los cánceres de mama y está asociado a la peor supervivencia global. Tal como se ha descrito en el anterior ejemplo, el FOXC1 es un biomarcador teranóstico específico del cáncer de mama de tipo basal. La medida semicuantitativa de la expresión de FOXC1 (microsistema e inmunohistoquímica) se ha mostrado como un método fiable para diagnosticar el cáncer de mama de tipo basal. Estos descubrimientos pueden extenderse y refinarse aún más determinando la expresión de FOXC1 usando qRT-PCR para proporcionar un ensayo más preciso cuantitativamente para diagnosticar el cáncer de mama de tipo basal.

Se obtuvieron datos de expresión génica de RT-PCR cuantitativos procedentes de 279 tumores de mama embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE) en una base de datos disponible públicamente (J Clin Oncol. 2009 Mar 10; 27(8): 1160). Se determinó la curva de operación de receptor-área bajo la curva (ROC-AUC) para FOXC1. Se determinó un nivel de corte para optimizar la sensibilidad y la especificidad.

La ROC-AUC para la expresión de FOXC1 (Figura 10) para predecir el cáncer de mama de tipo basal fue de 0,807. Se observó un 74% de sensibilidad y un 78% de especificidad para identificar cáncer de mama de tipo basal cuando se usó el nivel de corte de 0,437 (percentil 49) para la expresión de FOXC1 usando qRT-PCR.

Por tanto, se demuestra que la determinación cuantitativa de RT-PCR de FOXC1 es un ensayo fiable para diagnosticar con precisión el cáncer de mama de tipo basal. Se propone la determinación cuantitativa mediante RT-PCR de FOXC1 en tumores de mama FFPE como adjunto útil para los ensayos semicuantitativos (microsistemas e inmunohistoquímica) para la diagnosis de cáncer de mama de tipo basal en la práctica clínica rutinaria.

Ejemplo 3: Significación pronóstica de FOXC1 en modelos de subtipo molecular de cáncer de mama utilizando biomarcadores inmunohistoquímicos

En los estudios descritos en la presente memoria, se ha demostrado que el factor de transcripción de caja Forkhead FOXC1, esencial para el desarrollo de tejido de mesoderma, está sobreexpresado de forma consistente tanto a nivel de ARNm como de proteína en los BLBCs. Una expresión elevada de ARNm de FOXC1 se asoció a una mala supervivencia global, independientemente de otras variables pronósticas clinicopatológicas, incluyendo el estatus de nodos linfáticos. Debido a la predilección por la metástasis cerebral presentada por pacientes con BLBC, también se observó que los niveles elevados de ARNm de FOXC1 se correlacionaban con la incidencia de metástasis cerebral y con una supervivencia libre de metástasis cerebral significativamente acortada en pacientes negativos para nodos linfáticos. Además, la sobreexpresión ectópica diseñada de FOXC1 en células de cáncer de mama indujo cambios fenotípicos agresivos tales como incrementos en la proliferación celular, la migración y la invasión. El bloqueo de FOXC1 usando ARNsh en células de cáncer de mama con niveles endógenos elevados de FOXC1 demostró una pérdida de características fenotípicas agresivas. Estos resultados sugieren que el FOXC1 es un biomarcador pronóstico específico para BLBC y que desempeña un papel importante en la regulación de los rasgos celulares agresivos asociados a este subtipo molecular. También puede servir como diana adecuada para una terapia personalizada de pacientes diagnosticados con BLBC. Estos descubrimientos que utilizan el perfil de expresión genética apoyan firmemente la significación pronóstica de la expresión de ARNm de FOXC1 en el cáncer de mama. De acuerdo al estudio descrito a continuación, este descubrimiento se traduce o se corrobora usando ensayos de expresión de proteínas, tales como la inmunohistoquímica (IHC). Dicho ensayo sería práctico y relevante para implementación en la práctica clínica rutinaria.

Actualmente, el estatus de receptor de cáncer de mama (ER, PR y HER2) se usa ampliamente para llevar a cabo una estratificación pronóstica. Publicaciones recientes han sugerido el uso de marcadores de IHC surrogados adicionales de BLBC en combinación para mejorar la estratificación pronóstica (Rakha et al. 2009; Nielsen et al. 2004; Cheang et al. 2008; Elsheikh et al. 2008). Por lo tanto, se compararon tres modelos basados en biomarcadores de estratificación pronóstica en el cáncer de mama: 1) el clásico panel de 3 biomarcadores que comprende ER, PR y HER2; 2) un panel de 5 biomarcadores que comprende los anteriores receptores en combinación con biomarcadores de tipo basal tradicionales, la CK5/6 basal y la CK14 basal; y 3) un panel de 4 biomarcadores que comprende ER, PR y HER2, en combinación con FOXC1.

El principal objetivo de este estudio fue establecer si el ensayo de IHC de FOXC1 tiene un valor pronóstico en el cáncer de mama. El objetivo secundario fue comparar el valor pronóstico de los modelos de subtipo molecular usando biomarcadores de IHC surrogados en el cáncer de mama.

Métodos

Pacientes. Una revisión de una base de datos institucional adquirida prospectivamente identificó 904 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante primario diagnosticado entre el 1 de enero de 1995 y el 31 de diciembre de 2004. Los pacientes que fueron diagnosticados con cáncer de mama en estadio IV en la presentación inicial y que no se vieron sometidos a terapia quirúrgica primaria en la "John Wayne Cancer Center Institution" fueron excluidos del análisis.

Diseño del estudio traslacional. Este estudio traslacional fue llevado a cabo con la aprobación de panel de revisión institucional y se presenta de acuerdo a las "Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies" (REMARK) (McShane et al. 2005). Todos los ensayos de IHC fueron llevados a cabo por personal de laboratorio, que permaneció a ciegas respecto a los datos de los pacientes y los resultados. Los resultados de los ensayos fueron interpretados y evaluados por un único patólogo (JMS) que permaneció a ciegas respecto a los datos clínicos y patológicos. El diseño y el plan estadístico fueron finalizados antes de reunir los resultados de ensayo generados antes con los datos clínicos, antes de realizar el análisis de datos.

Protocolos de inmunohistoquímica. Un patólogo certificado por el panel entrenado en patología de mama (JMS), que permaneció a ciegas respecto a los datos clínicos y patológicos revisó portaobjetos de IHC (ER, PR, HER2) seleccionados de forma aleatoria de cada grupo pre-designado de pacientes en base al estatus de receptor. Aproximadamente el 20% de la cohorte de estudio fue verificada en relación a su estatus de receptor. Esto se realizó como medida de control de calidad interno para asegurar que el estatus de ER, PR y HER2 de los pacientes en el momento de la realización de este estudio era conforme a la proporcionada inicialmente en el momento del diagnóstico inicial. No se encontraron diferencias significativas en el transcurso de este ejercicio de control de calidad. El estatus de expresión de biomarcador en base a los ensayos IHC se evaluó usando los criterios de guías publicadas. Los estatus de ER y PR fueron considerados positivos si se observaba inmunotinción en >10% de los núcleos del tumor. El estatus de HER2 fue considerado positivo si la inmunotinción era puntuada con 3+ según los criterios del test Hercep. Para un resultado equívoco (2+), el estatus de HER2 se consideró positivo si el ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) revelaba una relación de amplificación de cromosoma 17 de HER2 $\geq 2,2$ (Yaziji et al. 2004).

A continuación se obtuvieron bloques de tejido embebido en parafina fijado con formalina (FFPE) correspondientes a pacientes designados como triple negativo con respecto al estatus de receptor hormonal, es decir, aquellos que eran ER-/PR-/HER2-. Los bloques de tejido fueron seccionados en serie en secciones de tejido de un espesor de 5 μm y se sometieron a análisis IHC para CK5/6 (D5 y 16B4, Cella Marque Corp, Rocklin, CA; sin dilución), CK14 (VP-C410, Vector Laboratories, Burlingame, CA; dilución 1:20) y FOXC1 (Ray et al. 2010). El análisis semicuantitativo fue

llevado a cabo por un patólogo (JMS) a ciegas respecto a los datos clínicos y patológicos que puntuó la intensidad de la inmunorreactividad en una escala de 0 (sin tinción) a 3 (tinción fuerte). Las tinciones de CK5/6 y CK14 fueron consideradas positivas si se observaba cualquier tinción celular de carcinoma invasivo citoplasmática y/o membranosa (Nielsen et al. 2004). El estatus de expresión de proteína FOXC1 se consideró positivo solo si se observaba alguna tinción nuclear de las células tumorales (Ray et al. 2010).

Definición inmunohistoquímica de subtipos moleculares de cáncer de mama. Para los fines de este estudio, los subtipos moleculares de cáncer de mama se definieron utilizando paneles de biomarcadores de IHC surrogados como se ha publicado previamente (Nielsen et al. 2004). Se usó el estatus de ER y el de HER2 para definir los subtipos moleculares luminal (ER⁺/HER2⁻), luminal/HER2⁺ (ER⁺/HER2⁺), HER2⁺ (ER⁻/HER2⁺) y tipo basal (ER⁻/HER2⁻). Además de determinar la significación pronóstica de la expresión de proteína FOXC1 en el cáncer de mama, también se comparó la significación pronóstica de tres paneles de biomarcadores de IHC surrogados separados y se usó para definir el BLBC: 1) el fenotipo triple negativo o TNP, que define al BLBC como negativo para los biomarcadores de receptor evaluados de forma rutinaria ER, PR y HER2; 2) un panel de 5 biomarcadores que comprende TNP combinado con CK5/6 y CK14, que define al BLBC como negativo para ER, PR y HER2 y como positivo para expresión de CK5/6 y/o CK14; y 3) un panel de 4 biomarcadores que comprende TNP y FOXC1, que define al BLBC como negativo para ER, PR y HER2 y como positivo para la expresión de proteína FOXC1. En los modelos de 5 biomarcadores y de 4 biomarcadores, el subconjunto de pacientes TNP negativos para todos los biomarcadores se denomina 5NP y 4NP, respectivamente.

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando SAS (versión 9.1.3, SAS, Cary, NC). Los criterios usados para determinar el estatus positivo o negativo de un biomarcador específico fueron determinados antes de llevar a cabo ningún análisis estadístico. El análisis de variables categóricas se llevó a cabo usando un test χ^2 y un test exacto de Fisher. Se empleó el test *U* de Mann-Whitney para comparar las variables continuas no normales. Para el análisis de supervivencia, la medida de resultado usada fue la supervivencia global (OS). El tiempo de supervivencia se calculó como el tiempo entre la fecha de diagnóstico y la fecha de la muerte. Los tiempos de supervivencia fueron censurados si el paciente todavía seguía vivo el 15 de octubre de 2009 (última fecha de actualización de la base de datos). Se generaron curvas de supervivencia univariable mediante el método de Kaplan-Meier (Bland et al. 1998) y se determinó la significación usando el test log-rank (Bland JM, Altman DG. The logrank test. BMJ; 328: 1073). El análisis multivariable se llevó a cabo usando el análisis de peligro proporcional de Cox. Para los propósitos de evaluación de la significación pronóstica de cada una de las anteriores definiciones de panel de biomarcadores de IHC de BLBC, se construyeron tres modelos separados para las definiciones de 3 biomarcadores, 5 biomarcadores y 4 biomarcadores de BLBC. Los tres modelos multivariable diferentes fueron comparados usando el test de relación de probabilidad y el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike 1974). Adicionalmente, todas las hipótesis fueron evaluadas usando el test de Wald (Cox 1974) y el valor *P* asociado. Todos los tests fueron de dos lados y los valores *P* < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

En esta serie de 904 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de mama ductal invasivo primario (Figura 15), todos los pacientes tenían datos preexistentes relativos a detección de IHC del estatus de receptor ER, PR y HER2. Los pacientes que fueron diagnosticados con cáncer de mama de estadio IV en la presentación inicial (n=19), que no se vieron sometidos a terapia quirúrgica primaria en el “John Wayne Cancer Institute” (n=125), fueron excluidos del análisis. El tamaño de muestra final de la cohorte de estudio fue de 759.

Características clinicopatológicas de la cohorte de estudio. Las características clinicopatológicas de los 759 pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 7 (a continuación) clasificadas según el estatus de ER y HER2, aproximando los subtipos moleculares.

Tabla 7. Características clínicas e hispatológicas de la cohorte de pacientes – estadio T y estatus de nodos basados en la determinación patológica final.

| Subtipo | Luminal (ER ⁺ /HER2 ⁻) n = 481 (63,3%) | Luminal/HER2 (ER ⁺ /HER2 ⁺) n = 95 (12,5%) | HER2 (ER ⁻ /HER2 ⁺) n = 57 (7,5%) | Tipo basal (ER ⁻ /HER2 ⁻) n = 126 (16,7%) |
|-------------------|--|--|---|---|
| Edad (media ± SD) | 58,3 ± 13,5 | 52,0 ± 11,7 | 53,5 ± 10,4 | 56,1 ± 15,2 |
| Tamaño de tumor | | | | |
| 0-2 cm | 356 (74,0) | 56 (59,0) | 31 (54,4) | 68 (54,0) |
| 2-5 cm | 102 (21,2) | 27 (28,4) | 17 (29,8) | 40 (31,7) |

| Subtipo | Luminal (ER ⁺ /HER2 ⁻) n = 481 (63,3%) | Luminal/HER2 (ER ⁺ /HER2 ⁺) n = 95 (12,5%) | HER2 (ER ⁻ /HER2 ⁺) n = 57 (7,5%) | Tipo basal (ER ⁻ /HER2 ⁻) n = 126 (16,7%) |
|-----------------------|--|--|---|---|
| >5 cm | 13 (2,7) | 10 (10,5) | 4 (7,0) | 15 (11,9) |
| Desconocido | 10 (2,1) | 2 (2,1) | 5 (8,8) | 3 (2,4) |
| Estatus de nodos | | | | |
| Negativo | 322 (66,9) | 56 (58,9) | 30 (52,6) | 70 (55,6) |
| Positivo | 140 (29,1) | 38 (40,0) | 26 (45,6) | 48 (38,1) |
| Desconocido | 19 (4,0) | 1 (1,1) | 1 (1,8) | 8 (6,3) |
| Grado de tumor | | | | |
| 1 | 149 (31,0) | 1 (1,0) | 0 (0) | 1 (0,8) |
| 2 | 225 (46,8) | 30 (31,6) | 8 (14,0) | 11 (8,7) |
| 3 | 101 (21,0) | 62 (65,3) | 47 (82,5) | 109 (86,5) |
| Desconocido | 6 (1,2) | 2 (2,1) | 2 (3,5) | 5 (4,0) |
| Terapia hormonal | | | | |
| No | 96 (20,0) | 16 (16,8) | 48 (84,2) | 85 (67,5) |
| Sí | 328 (68,2) | 67 (70,5) | 3 (5,3) | 9 (7,1) |
| Desconocido | 57 (11,9) | 12 (12,5) | 6 (10,5) | 32 (25,4) |
| Quimioterapia | | | | |
| No | 238 (49,5) | 21 (22,1) | 8 (14,0) | 24 (19,1) |
| Sí | 174 (36,2) | 69 (72,6) | 43 (75,5) | 67 (53,2) |
| Desconocido | 69 (14,4) | 5 (5,3) | 6 (10,5) | 35 (27,8) |
| Terapia de herceptina | | | | |
| No | - | 65 (68,4) | 34 (59,7) | - |
| Sí | - | 21 (22,1) | 14 (24,6) | - |
| Desconocido | - | 9 (9,5) | 9 (15,8) | - |

Tal como se ilustra en la Tabla 7, el 63,3% (481 de 759) fueron definidos con el subtipo luminal (ER⁺/HER2⁻), el 12,5% (57 de 759) con el subtipo Luminal/HER2 (ER⁺/HER2⁺), el 7,5% (57 de 759) con el subtipo HER2 (ER⁻/HER2⁺) y el 16,7% (126 de 759) fueron definidos como BLBC por la definición TNP (panel de 3 biomarcadores). 90 de esos 126 especímenes fueron sometidos a análisis IHC adicionales llevados a cabo para determinar CK5/6, CK14 y FOXC1. No se realizaron análisis a los 36 especímenes restantes debido a la falta de tejido tumoral invasivo, a un tumor invasivo restante inadecuado en el bloque de tejidos o a problemas técnicos. 60 de los 90 pacientes TNP resultaron ser BLBC según la definición de citoqueratina basal (panel de 5 biomarcadores), y 55 de los 87 pacientes TNP resultaron ser de tipo basal según la definición de FOXC1 (panel de 4 biomarcadores). Las características clinicopatológicas de los pacientes de TNP clasificados según el panel de 5 biomarcadores o según el panel de 4 biomarcadores aparecen a continuación en la Tabla 8. En la Figura 26 se muestran imágenes IHC representativas de secciones de FFPE teñidas con CK5/6, CK14 o FOXC1.

Tabla 8. Características clinicopatológicas del subconjunto de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

| | Basal CK ⁻ n = 38 (5,6%) | Basal CK ⁺ n = 60 (8,9%) | Valor-p | FOXC1 ⁻ n = 42 (6,3%) | FOXC1 ⁺ n = 49 (8,2%) | Valor-p |
|-------------------|---|---|---------|--|--|---------|
| Edad (media ± SD) | 59,7 ± 14,4 | 55,9 ± 16,6 | 0,2429 | 63,2 ± 15,2 | 51,5 ± 14,4 | 0,0003 |
| Tamaño de tumor | | | | | | |
| 0-2 cm | 24 (63,2) | 25 (41,7) | | 19 (45,2) | 23 (46,9) | |
| 2-5 cm | 7 (18,4) | 26 (43,3) | | 14 (33,3) | 19 (38,8) | |
| >5 cm | 7 (18,4) | 7 (11,7) | | 8 (19,1) | 6 (12,3) | |
| Desconocido | | 2 (3,3) | | 1 (2,4) | 1 (2,0) | |
| Estatus de nodos | | | | | | |
| Negativo | 21 (55,3) | 32 (53,4) | | 23 (54,7) | 26 (53,1) | |
| Positivo | 15 (39,5) | 23 (38,3) | | 13 (31,0) | 22 (44,9) | |
| Desconocido | 2 (5,3) | 5 (8,3) | | 6 (14,3) | 1 (2,0) | |
| Grado de tumor | | | | | | |
| 1 | 1 (2,6) | 0 (0) | | 0 (0) | 0 (0) | |
| 2 | 4 (10,5) | 4 (6,7) | | 6 (14,3) | 2 (4,1) | |
| 3 | 32 (84,2) | 54 (90,0) | | 35 (83,3) | 45 (91,8) | |
| Desconocido | 1 (2,6) | 2 (3,3) | | 1 (2,4) | 2 (4,1) | |
| Terapia hormonal | | | | | | |
| No | 23 (60,5) | 39 (65,0) | | 25 (59,6) | 32 (65,3) | |
| Sí | 4 (10,5) | 1 (1,7) | | 3 (7,1) | 1 (2,0) | |
| Desconocido | 11 (29,0) | 23 (33,3) | | 14 (33,3) | 16 (32,7) | |
| Quimioterapia | | | | | | |
| No | 9 (23,7) | 9 (15,0) | | 9 (21,4) | 5 (10,2) | |
| Sí | 17 (44,7) | 30 (50,0) | | 17 (40,5) | 28 (57,1) | |
| Desconocido | 12 (31,6) | 21 (35,0) | | 16 (38,1) | 16 (32,7) | |

** valor-p

5 **Valor pronóstico de la expresión de proteína FOXC1 en el cáncer de mama.** En el presente estudio, el estatus de FOXC1 se consideró positivo solo si se observaba alguna tinción nuclear (Ray et al. 2010). Se observó que la expresión positiva de proteína FOXC1 era un predictor significativo de la supervivencia global (Figura 16) entre los pacientes de cáncer de mama en el análisis univariable (HR 3,364 IC 95% 1,758-6,438, P=0,0002) (Tabla 9-10). También se observó que otros factores clinicopatológicos como la edad, el tamaño de tumor, el estatus de nodos y el grado tumoral eran predictores significativos de la supervivencia global. Las variables de tratamiento adyuvante tales como terapia hormonal, quimioterapia o terapia con trastuzumab (herceptina) no fueron predictores significativos en la supervivencia global, indicando efectos equivalentes en todos los grupos. Además, la significación pronóstica de FOXC1 sobre el análisis univariable se mantuvo independientemente del punto de corte usado para segregar pacientes entre los subconjuntos de FOXC1 positivo y FOXC1 negativo (Tabla 9, Figura 16). La significación pronóstica de la expresión de proteína FOXC1 como predictor independiente de OS persistió en el análisis multivariable, mientras que el fenotipo triple negativo y los fenotipos positivos en citoqueratinas basales no se mantuvieron como significativos en el análisis multivariable (Tabla 10). Nuevamente, la significación pronóstica de FOXC1 como predictor independiente de OS en el análisis multivariable también se mantuvo independientemente

del punto de corte usado para segregar a los pacientes entre los subconjuntos de FOXC1 positivo y FOXC1 negativo. El punto de corte óptimo para la expresión de proteína FOXC1 evaluado en IHC en este estudio fue 0-1 (n=42) frente a 2-3 (n=49), aunque la expresión de proteína FOXC1 siguió siendo un marcador pronóstico altamente significativo en todos los puntos de corte evaluados (0 frente a 1-3, 0-1 frente a 2-3 y 0-2 frente a 3).

5

Tabla 9. Análisis de regresión univariable de Cox de la significación pronóstica de variables clinicopatológicas individuales y de tratamiento en la supervivencia global a 5 años.

| | N | Valor-P | Relación de peligro (IC 95%) |
|--|----------|----------------|-------------------------------------|
| Edad | 759 | <0,0001 | 1,046 (1,028 1,064) |
| Tamaño tumoral (>=5, 2-4,99, 0-2) | 739 | 0,0006 | 1,826 (1,293 2,580) |
| Estatus de nodos (Positivo vs. Negativo) | 730 | 0,0113 | 1,913 (1,158 3,164) |
| Grado tumoral (1, 2, 3) | 744 | 0,0313 | 1,468 (1,035 2,082) |
| ER ⁻ /HER2 ⁻ vs. otros | 759 | 0,0104 | 2,027 (1,181 3,480) |
| Basal+ vs. otros | 731 | 0,0043 | 2,572 (1,344 4,919) |
| FOXC1 ⁺ (1, 2, 3) vs. otros | 724 | 0,0014 | 2,880 (1,505 5,510) |
| FOXC1 ⁺ (2, 3) vs. otros | 724 | 0,0002 | 3,364 (1,758 6,438) |
| FOXC1 ⁺ (3) vs. otros | 724 | 0,0012 | 3,392 (1,618 7,112) |
| Terapia hormonal (sí vs. no) | 652 | 0,1213 | 0,660 (0,390 1,116) |
| Quimioterapia (sí vs. no) | 644 | 0,2512 | 0,733 (0,432 1,245) |
| Terapia de herceptina (sí vs. no) | 688 | 0,6389 | 1,275 (0,462 3,524) |

10

Tabla 10. Análisis de regresión multivariable de Cox de la significación pronóstica de variables clinicopatológicas individuales y de tratamiento en la supervivencia global a 5 años.

| | N | Valor-P | Relación de peligro (IC 95%) |
|--|----------|----------------|-------------------------------------|
| Edad | 670 | <0,0001 | 1,049 (1,028 1,069) |
| Tamaño tumoral (>=5, 2-4,99, 0-2) | | 0,0022 | 1,797 (1,234 2,618) |
| Estatus de nodos (Positivo vs. Negativo) | | | |
| Grado tumoral (1, 2, 3) | | | |
| ER ⁻ /HER2 ⁻ vs. otros | | | |
| Basal+ vs. otros | | | |
| FOXC1 ⁺ (1, 2, 3) vs. otros | | *0,0005 | 3,406 (1,713 6,775) |
| FOXC1 ⁺ (2, 3) vs. otros | | *0,0001 | 3,839 (1,928 7,645) |
| FOXC1 ⁺ (3) vs. otros | | *0,0019 | 3,755 (1,632 8,636) |
| Terapia hormonal (sí vs. no) | | | |
| Quimioterapia (sí vs. no) | | | |
| Terapia de herceptina (sí vs. no) | | | |

Supervivencia global según los modelos IHC de subtipo molecular de cáncer de mama. Los subtipos de cáncer de mama definidos por los paneles de biomarcadores de IHC surrogados difirieron significativamente en la predicción de OS (Figura 17). El modelo que utiliza FOXC1 alcanzó el grado más significativo de estratificación pronóstica ($p < 0,0001$). En el panel de 3 biomarcadores, la OS a 5 años y a 10 años para pacientes de BLBC (definido usando TNP) fue del 85% y del 77%, respectivamente. En el panel de 5 biomarcadores, la OS a 5 años y a 10 años para pacientes de BLBC (definido usando TNP + CK5/6 y CK14) fue del 82% y del 66%, respectivamente. En el panel de 4 biomarcadores, la OS a 5 años y a 10 años para pacientes de BLBC (definido usando TNP + FOXC1) fue del 77% y del 69%, respectivamente.

En el análisis de regresión univariable de Cox, además de factores clinicopatológicos tales como la edad, el tamaño del tumor, el estatus de nodos linfáticos y el grado tumoral, los BLBC definidos según los paneles de 3 biomarcadores, 5 biomarcadores y 4 biomarcadores fueron todos predictores significativos de la OS de cáncer de mama (Tabla 9, ver antes). En el análisis de regresión multivariable de Cox, solo la edad, el tamaño tumoral y el BLBC definido según el panel de 4 biomarcadores en base a la expresión de proteína FOXC1 mantuvieron la significación y fueron predictores independientes de la OS. Tanto el panel de 3 biomarcadores que utiliza TNP como el panel de 5 biomarcadores basado en la expresión de CK basal perdieron significación en el análisis multivariable.

Para los propósitos de evaluar la significación pronóstica de cada una de las anteriores definiciones de panel de biomarcadores de BLBC, se construyeron tres modelos multivariable separados de subtipos moleculares de cáncer de mama para la definición de BLBC de 3 biomarcadores (basada en el fenotipo triple negativo (TNP)), la de 5 biomarcadores (basada en la expresión de citoqueratinas basales) y la de 4 biomarcadores (basada en la expresión de proteína de FOXC1), que incluye cada los factores clinicopatológicos estándares de edad, tamaño de tumor, estatus nodal y grado tumoral. Los tres modelos multivariable fueron comparados usando el test de relación de probabilidad y el Criterio de Información de Akaike (AIC). El modelo de 4 biomarcadores basado en la expresión de proteína de FOXC1 presentó la menor puntuación de AIC lo que indica que es el modelo con el mayor valor pronóstico (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de los tres modelos multivariable diferentes de subtipo molecular de cáncer de mama utilizando paneles de biomarcadores inmunohistoquímicos surrogados.

| Modelo pronóstico de 3 biomarcadores (TNP) | N = 702 | Valor-P | AIC = 748,576 Relación de peligro (IC 95%) |
|---|----------------|----------------|---|
| Edad | | <0,0001 | 1,049 1,029 1,069 |
| Tamaño tumoral (≥ 5 , 2-4,99, 0-2) | | 0,0153 | 1,600 1,094 2,338 |
| Estatus de nodos (Positivo vs. Negativo) | | | |
| Grado tumoral (Alto-3, Intermedio-2, Bajo-1) | | 0,0123 | 1,628 1,111 2,385 |
| ER ⁺ /HER2 ⁻ vs. otros | | | |
| | | | |
| Modelo pronóstico de 5 biomarcadores (citoqueratina basal) | N = 677 | Valor-P | AIC = 719,774 Relación de peligro (IC 95%) |
| Edad | | <0,0001 | 1,042 1,022 1,063 |
| Tamaño tumoral (≥ 5 , 2-4,99, 0-2) | | 0,0034 | 1,765 (1,207 2,581) |
| Estatus de nodos (Positivo vs. Negativo) | | | |
| Grado tumoral (Alto-3, Intermedio-2, Bajo-1) | | | |
| Basal+ vs. otros | | 0,01 | 2,499 1,245 5,016 |
| | | | |
| Modelo pronóstico de 4 | N = 670 | Valor-P | AIC = 712,989 |

| biomarcadores (FOXC1) | | | Relación de peligro (IC 95%) |
|--|--|---------|------------------------------|
| Edad | | <0,0001 | 1,045 1,028 1,069 |
| Tamaño tumoral (>=5, 2-4,99, 0-2) | | 0,0022 | 1,797 1,234 2,618 |
| Estatus de nodos (Positivo vs. Negativo) | | | |
| Grado tumoral (Alto-3, Intermedio-2, Bajo-1) | | | |
| FOXC1 ⁺ (2, 3) vs. otros | | <0,0001 | 3,839 1,928 7,645 |
| | | | |

5 En la cohorte de pacientes del presente estudio con cáncer de mama ductal invasivo, el fenotipo de tipo basal definido en base a la expresión positiva de proteína de FOXC1 fue superior al fenotipo triple negativo empleado tradicionalmente, para fines de estratificación pronóstica. Esto demuestra que ser “de tipo basal” no es sinónimo de ser “triple negativo”. La definición de IHC del fenotipo de tipo basal basada en la expresión positiva de proteína de FOXC1 también fue superior al fenotipo de tipo basal definido por la expresión positiva de CK basal, para fines de estratificación pronóstica. Esto representa un avance significativo ya que, al contrario que las CKs, el FOXC1 representa un candidato potencial para la terapia dirigida personalizada de pacientes con BLBC (Ray et al. 2010). El FOXC1 no solo promete ser un biomarcador pronóstico, sino también un biomarcador predictivo – predictivo de la eficacia terapéutica de cualquier fármaco o producto biológico futuro dirigido contra FOXC1 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama de tipo basal.

10 La plataforma de microsistema de tejidos se basa en el muestreo con aguja de núcleos representativos de especímenes y es un método excelente para proyectos de investigación exploratorios que minimiza considerablemente la movilización de recursos. Es ideal para determinar la presencia de biomarcadores que se expresen homogéneamente a lo largo de un espécimen, tal como ER y HER2. Sin embargo, no es ideal para determinar la presencia de biomarcadores potenciales, tales como las CKs basales, que se expresan heterogéneamente a lo largo de la sección de tejido (referir a Laakso et al.). Por lo tanto, en lugar de microsistemas de tejido, para el análisis se usaron secciones de tejido enteras.

15 El análisis discutido anteriormente se restringió al tipo histológico de cáncer de mama ductal invasivo. Esto se realizó para minimizar potenciales efectos de confusión (pronósticos, biológicos o ambos) del subtipo histológico sobre el subtipo molecular en el cáncer de mama. Sin embargo, los anteriores descubrimientos en relación a la expresión de proteína de FOXC1 pueden extrapolarse a otros tipos histológicos de cáncer de mama tales como el cáncer de mama lobular.

20 Se ha observado que la expresión de ARNm de FOXC1 tiene un impacto pronóstico sobre la OS en el cáncer de mama que probablemente es independiente del estatus de nodos linfáticos, y que es al menos en parte atribuible a una velocidad significativamente más alta de asociación con la aparición temprana de metástasis cerebral, a menudo como el primer sitio de metástasis distante, incluso en pacientes negativos para nodos linfáticos. En el presente estudio, cuando se incluyó el estatus de expresión de proteína de FOXC1 determinado mediante IHC en el modelo multivariable, el estatus nodal falló en retener significación. Esto confirma adicionalmente el impacto pronóstico de FOXC1 como independiente de la implicación nodal.

25 El panel de 4 biomarcadores que utiliza la expresión de proteína de FOXC1 mostró un pronóstico superior en comparación con el panel de 5 biomarcadores que utiliza CK5/6 y/o CK14 basales en la presente cohorte de pacientes (cuando se considera en combinación con el estatus de ER, PR y HER2 de especímenes de cáncer de mama). Esto sugiere que la expresión de proteína de FOXC1, cuando está presente, permite diagnosticar a pacientes que poseen el verdadero subtipo molecular de tipo basal de entre los pacientes con el fenotipo triple negativo. Un análisis de subconjunto solo de pacientes triple negativos en esta cohorte de estudio mostró una tendencia que apoya esta conclusión (datos no incluidos).

30 **Ejemplo 4: el FOXC1 es responsable del fenotipo agresivo e invasor, lo que le convierte en una diana terapéutica viable.**

40 **Materiales y métodos**

Células con FOXC1 bloqueado. Los ARNsh de FOXC1 y un ARNsh de control que no coincide con ningún ADNc conocido fueron adquiridos en Sigma. Las células fueron transfectadas de forma estable con la construcción de FOXC1 o de ARNsh de control y se seleccionaron con 5 µg/mL de puomicina. Las células bloqueadas agrupadas fueron usadas para los experimentos.

ARNsh de FOXC1. Se adquirieron los siguientes ARNsh en Sigma:

Secuencias de ARNsh de FOXC1 de ratón:

CCGGGAGCAGAGCTACTATCGCGCTCTCGAGAGCGCGATAGTAGCTCTG

CTCTTTTG (ARNsh1; SEQ ID NO: 1); y

5 CCGGTGGGAATAGTAGCTGTGATCTCGAGATCTGACAGCTACTATTCC

CATTTTGT (ARNsh2; SEQ ID NO: 2); y

Secuencias de ARNsh de FOXC1 de humano:

CCGGCAAGAAGAAGGACGCGGTGAAGTTCACCGCGTCTTCTTCT

TGTTTTTG (ARNsh1; SEQ ID NO: 3); y

10 CCGGCCCGGACAAGAAGATCACCTCTCGAGAGGGTGATCTTCTTGCCG

GGTTTTT (ARNsh2; SEQ ID NO: 4); y

ARNsh de control (no se dirige contra ningún gen humano o de ratón conocido):

CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTTTCATCTTGTT

GTTTTT (SEQ ID NO: 5)

15 *Células que sobreexpresan FOXC1.* Se transdujo de forma estable un ADNc de FOXC1 humano de longitud completa en las células de cáncer de mama. Las líneas celulares estables fueron seleccionadas con 800 µg/mL de G418. Las poblaciones agrupadas fueron usadas para los experimentos.

20 *Cultivo celular.* Las líneas celulares de cáncer fueron de la “American Type Culture Collection”. Las células epiteliales mamarias humanas normales (HMEC) procedían de Clonetics. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Se llevó a cabo un cultivo celular tridimensional usando una matriz Matrigel BD en placas de 96 pocillos.

25 *Ensayo de migración celular e invasión.* Resumidamente, se llevaron a placa 10⁴ células en la parte superior de insertos de cámara Boyden con un tamaño de poro de 8 µm. Los insertos fueron transferidos a continuación a una placa de 24 pocillos. Cada pocillo contenía DMEM con un 10% de suero como quimioattractor. Para descartar el efecto de la proliferación celular, se añadieron 2 µg/mL de mitomicina C a las células. Tras la incubación, las células que permanecían sobre la superficie superior de las cámaras fueron eliminadas con palillos de algodón. Las células de la superficie inferior de los insertos fueron teñidas con el kit HEMA3 (Fisher). A continuación se montó la membrana sobre un portaobjetos de microscopio y se contabilizaron las células migrantes en 5 áreas diferentes usando un microscopio de luz. Para los ensayos de invasión, los insertos fueron recubiertos con una capa fina de matriz de membrana de base Matrigel (BD Biosciences) y se siguieron los mismos procedimientos.

30

La *inmunohistoquímica* y la *inmunotinción* se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión

35 Se examinó la función del FOXC1 en las células de cáncer de mama. La sobreexpresión de FOXC1 en células de BLBC MDA-MB-231 (que albergan niveles moderados de FOXC1 endógena) incrementó la proliferación celular, la migración y la invasión (Figura 11A). Se observaron resultados similares en células de cáncer de mama luminal MCF-7 (que albergan niveles indetectables de FOXC1 endógeno; Figura 12A). La sobreexpresión de FOXC1 también potenció el crecimiento independiente de anclaje de células MCF-7 en agar blando. La inmunotinción indicó que la ciclina D1, los marcadores de fibroblasto (vimentina, fibronectina y una actina de músculo liso α), las integrinas β 4 y β 1, y las metaloproteinasas de matriz MMP2 y MMP9 fueron reguladas al alza por la sobreexpresión de FOXC1 (Figuras 12B-D). También se ha demostrado que el FOXC1 induce la transición epitelial-mesenquimal (EMT) en células epiteliales mamarias MCF-12A (Bloushtain-Qimron et al. 2008 -21). De forma similar, la sobreexpresión de FOXC1 en células epiteliales mamarias MCF-10A indujo un fenotipo mesenquimal acompañado de un aumento de la expresión del marcador basal P-caderina y un descenso de la expresión del marcador epitelial E-caderina (Figura 12E). La regulación de estos genes por FOXC1 también fue confirmada mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el FOXC1 puede activar un fenotipo agresivo asociado a las células de BLBC.

45

Para determinar los efectos del agotamiento de FOXC1, se transdujo de forma estable ARNsh de FOXC1 en células de cáncer de mama de ratón 4T1, que son un modelo para el cáncer de mama humano de estadio IV (Aslakson y Miller, 1992 -22) y poseen niveles elevados de FOXC1 endógeno (Figura 13A). Dichos ARNsh redujeron los niveles

de FOXC1 en >90% (Figura 13B) y disminuyeron la proliferación celular, la migración y la invasión (Figura 11B). Se obtuvieron resultados similares con células de cáncer de mama humano BT549 cuando el FOXC1 fue reducido por ARNsh (Figuras 13C y D). El agotamiento de FOXC1 también convirtió células 4T1 de tipo fibroblasto a tipo epitelial y suprimió el crecimiento celular en el cultivo tridimensional y la formación de colonias en el agar blando (Figuras 11C y D). Estos datos sugieren además una función del FOXC1 en la regulación de la función celular. Diversos estudios han sugerido que el BLBC puede poseer tasas de crecimiento extraordinariamente elevadas (Seewaldt y Scott, 2007) y un fenotipo EMT (Sarrío et al. 2008) en comparación con otros subgrupos de cáncer de mama. El FOXC1 puede desempeñar un papel en la coordinación de estas propiedades de los BLBC. Además, la metilación de ADN puede desempeñar una función en la expresión de FOXC1 asociada a BLBC. En resumen, estos estudios confirman al FOXC1 como biomarcador teranóstico, es decir, un biomarcador diagnóstico y pronóstico, así como un agente terapéutico.

Ejemplo 5: regulación mediante FOXC1 de la expresión y la función de ER α

En base a los estudios mostrados a continuación, se descubrió que el FOXC1 induce la señalización de NF- κ B para inhibir la expresión de ER α . Este estudio proporciona una base molecular para el fenotipo negativo en ER α de cáncer de mama de tipo basal y también proporciona implicaciones para la función del FOXC1 en la respuesta de las células de cáncer de mama al tratamiento antiestrógenos.

Materiales y métodos

Cultivo celular. Se obtuvieron líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 y T47D en el "Breast Center" del "Baylor College of Medicine". Las células fueron mantenidas de forma rutinaria en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mM, 50 IU/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomina y 10 μ g/mL de insulina. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO₂. El tamoxifeno y el 17 β -estradiol procedieron de Sigma (St. Louis, MO). El inhibidor de molécula pequeña IKK BMS-345541 se adquirió en Calbiochem (Gibbstown, NJ). Para los experimentos que implicaban estradiol y tamoxifeno, las células fueron sometidas a ayuno de suero durante una noche y a continuación fueron estimuladas con los ligandos de ER a diferentes periodos de tiempo antes de los ensayos de proliferación celular.

Análisis de datos de microsistema. Los datos de expresión en bruto procedentes de conjuntos de datos de microsistemas de expresión génica de cáncer de mama humano disponibles públicamente (Ginestier et al., 2006; Lu et al., 2008; Perou et al., 2000; Pollack et al., 2002; Richardson et al., 2006; Schuetz et al., 2006; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003; Zhao et al., 2004) y la base de datos del "Oncology – Breast Samples Project" (Bittnet et al.) del "International Genomics Consortium" (IGC) en <https://expo.intgen.org/expo/public> fueron analizados usando el software OncoPrint 4.0.

Transfección estable. Las células MCF-7 y T47D fueron transfectadas de forma estable durante 24 h con una construcción de FOXC1 marcada con FLAG o el vector vacío usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). A continuación se seleccionaron los clones estables usando 800 μ g/mL de G418 (Invitrogen). Se verificó la expresión de FLAG-FOXC1 mediante ensayo de transferencia Western con un anticuerpo anti-FOXC1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo anti-FLAG (Origene, Rockville, MD).

Transfección temporal. Se cultivaron células MCF-7 durante 48 h hasta alcanzar una confluencia del 80% antes de la transfección. Para las co-transfecciones, se añadió a discos de 60 mm 0,1 μ g de construcción indicadora de ADN de ERE-tk-luc o NF- κ B-luc (Promega, Madison, WI) y 1 μ g de vector FLAG-FOXC1 o NF- κ B p65. Las células transfectadas fueron cultivadas durante 24 h. El plásmido indicador de respuesta a estrógenos ERE-tk-luc contiene un único ERE de consenso 5' de un promotor de timidina quinasa mínimo y el gen de luciferasa (Cui et al., 2003). 24 h después de la transfección las células fueron lavadas dos veces con PBS y recolectadas en 200 μ L de tampón de lisis de indicador (Promega). Se co-transfectaron veinte nanogramos de un vector de expresión de β -galactosidasa pSV- β -Gal (Promega) como control interno. Se llevaron a cabo ensayos de luciferasa y β -galactosidasa usando reactivos de ensayo de indicador Promega y el sistema de multi-detección GloMax. Para evaluar si la sobreexpresión de p65 inhibe la expresión de ER α , se transfectaron células MCF-7 con una construcción p65 o con el vector durante 48 h, seguido de inmunotinción.

Análisis de inmunotinción. Se generaron lisatos celulares completos para la tinción Western usando tampón de lisis celular (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, 1% de NP-40, 10% de glicerol) suplementado con un cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma, St. Louis, MO). Se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE al 10% y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las etapas restantes fueron llevadas a cabo según un protocolo de inmunotinción estándar (Qu et al., 2009). La inmunotinción se realizó con anticuerpos policlonales contra p65, FOXC1, IRS1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology), anticuerpos policlonales contra fosfo-p65, p50, I κ B α (1:1000; Cell Signal), o anticuerpos monoclonales contra ER α (1:500; Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, R.U.), PR (1:500; DAKO, Carpinteria, CA). Se usó anti- β actina (Sigma) con una dilución de 1:10000. Después de la incubación de anticuerpos primaria, la membrana se volvió a lavar con PBST tres veces (5 minutos cada vez) y a continuación se incubó con un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de

rábano (HRP) (Amersham, Piscataway, NJ) con una dilución de 1:4000 en disolución de bloqueo. La membrana se lavó tres veces y las bandas fueron visualizadas usando ensayos de quimioluminiscencia.

5 *Transcripción inversa en tiempo real-PCR.* Se aisló ARN total de células de cáncer de mama usando el mini-kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). La amplificación de PCR se llevó a cabo usando el Sistema de PCR en Tiempo Real Rotor-Gene 3000 (CoRbett Research) en un volumen de reacción de 25 μ L. La mezcla de PCR contenía Transcriptasa Inversa SuperScript® III, sonda TaqMan y cebadores directos e inversos. Las muestras fueron incubadas durante 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 30 s y 60°C durante 60 s. Todas las muestras fueron tratadas por triplicado. Los resultados se analizaron usando el paquete de software Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). La información de cebador es como se indica a continuación: cebador directo de FOXC1
10 5'-CGGTATCC AGCCAGTCTCTGTACCG-3' (SEQ ID NO: 6), cebador inverso de FOXC1 5'-
GTTCCGGCTTTGAGGGTGTGTC-3' (SEQ ID NO: 7), cebador directo de ER α 5'-
CGGTTAGATTCATCATGCGGAACCG-3' (SEQ ID NO: 8), y cebador inverso de ER α 5'-
TGTGTAGAGGCATGGTGGAG-3' (SEQ ID NO: 9). Los datos de ARNm de ER α y FOXC1 fueron normalizados respecto al valor de ARNm de β -actina.

15 *Tinción de inmunofluorescencia.* Las células MCF-7 fueron transfectadas temporalmente con plásmido GFP-FOXC1 durante 24 h. A continuación las células fueron digeridas con tripsina y sembradas en portas de cámara (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Tras 12 h de incubación, las células fueron fijadas con un 4% de formaldehído y a continuación fueron permeabilizadas con PBS que contenía un 0,1% de Triton X-100. Los portas fueron bloqueados con un 5% de BSA durante 30 minutos y se incubaron con un anticuerpo anti-ER α primario (1:100) a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 546 (1:200, Invitrogen) durante 30 minutos. Los portas fueron lavados con PBS tres veces durante 5 minutos cada vez, se montaron en DAPI, y se observaron en un microscopio Nikon TI-E de alta resolución.

25 *Análisis del mecanismo de señalización IPA.* El conjunto de datos de Richardson et al. (Richardson et al., 2006) fue sometido a Análisis de Mecanismo Ingenuity (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Resumidamente, se analizaron los perfiles de expresión génica globales de todas las muestras de cáncer de mama de acuerdo a su subgrupo molecular (tipo basal, HER2 y luminal) con respecto a su asociación con un mecanismo canónico específico en la Base de Conocimiento de Mecanismos Ingenuity. La significación de la asociación entre el perfil de expresión génica global promedio asociado a un subgrupo particular y el mecanismo canónico específico se midió de dos maneras: 1) Se calculó una relación del número promedio de genes de un subgrupo particular que mapean al mecanismo dividido por el número total de genes (que tiene representación de sonda en la plataforma de microsistema) asignado al mecanismo canónico. 2) Se usó el test exacto de Fischer para calcular el valor-p que determina la probabilidad de que la asociación entre los genes de cualquier subgrupo particular y el mecanismo canónico se explique únicamente por oportunidad. El logaritmo negativo de dicho valor-p es el Factor de Impacto.

35 *Ensayo TransAM de factor de transcripción de NF- κ B.* La actividad de la familia NF- κ B se midió usando el kit ELISA TransAM NF- κ B (Active Motif, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, las partículas nucleares aisladas fueron resuspendidas en tampón de extracción (Hepes 20 mM, pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM). El sobrenadante (extracto nuclear) se retuvo tras una segunda centrifugación. Las muestras (10 μ g) fueron añadidas por triplicado a placas de 96 pocillos recubiertas con un oligonucleótido que contiene una secuencia de unión de consenso para los componentes NF- κ B. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, se añadieron anticuerpos primarios de los distintos componentes de NF- κ B; la adición subsiguiente de anticuerpo secundario conjugado a HRP produjo una lectura colorimétrica sensible cuantificada mediante espectrofotometría en la longitud de onda de 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm.

45 *Ensayo de proliferación celular.* La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a un 30% de confluencia y el ensayo MTT se llevó a cabo uno, dos, tres y cuatro días tras el tratamiento. Para cada ensayo, se añadieron 50 μ L de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y las células fueron incubadas a 37°C durante otras 4 h. Tras centrifugación, el sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y se añadió a cada pocillo 300 μ L de DMSO (Sigma). Inmediatamente tras la resolubilización, todas las placas fueron escaneadas a 575 nm en un lector de microplacas. El valor de absorbancia (A) representaba el número de células vivas.

50 *Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).* Los ensayos ChIP fueron llevados a cabo usando el kit enzimático CHIP-IT Express (Active Motif) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia en DMEM suplementado con un 10% de FBS y a continuación se reticularon con un 1% de formaldehído a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células fueron recolectadas y digeridas con tripsina, seguido de centrifugación. Los sobrenadantes se prelimpiaron a 4 °C durante 30 minutos con proteína A-Sepharose-ADN de esperma de salmón y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology) durante una noche a 4°C. La inmunoprecipitación con IgG de conejo normal se llevó a cabo para evaluar la presencia de interacciones no específicas, y se analizaron alícuotas de complejos ADN-proteína mediante PCR para normalizar la entrada de ADN. Los inmunocomplejos fueron incubados con ADN de esperma de salmón-Sepharose de proteína A durante 1 h a 48°C. Las partículas fueron lavadas y eluidas siguiendo las instrucciones del fabricante y después se incubaron durante una noche a 65°C. Los fragmentos de ADN fueron purificados con un QIAquick Spin Kit (Qiagen, Valencia, CA). Los cebadores usados para los ensayos ChIP fueron como se indica a continuación: cebador directo
55
60

de ER α , 5'-AGAAGCTAGACCTCTGCAGG-3' (SEQ ID NO: 10), y cebador inverso de ER α , 5'-AAGCAGGGGCAAGGAAATATC-3' (SEQ ID NO: 11). El fragmento de 140 pb amplificado expande un sitio de unión a p65 conservado GGGACTTTCT en el promotor F. Para PCR, se usaron 2 μ L de una extracción de ADN de 30 μ L y 30 ciclos de amplificación.

- 5 *Análisis estadístico.* Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (SD) de muestras medidas por triplicado o duplicado. Cada experimentos se llevó a cabo tres veces, a menos que se indique lo contrario. El test t de Student fue usado para calcular diferencias entre los diversos grupos experimentales. La diferencia se consideró estadísticamente significativa con $P < 0,05$.

Resultados y discusión

- 10 *FOXC1 está asociado al cáncer de mama humano negativo en ER α .* Se ha identificado el FOXC1 como un marcador principal para el cáncer de mama de tipo basal (Ray et al., 2010), que se caracteriza por una expresión baja o nula de ER, PR y HER-2/neu. El análisis de la base de datos de Oncomine, que proporciona conjuntos de datos de perfiles de expresión génica de cánceres humanos disponibles públicamente, reveló que los niveles de ARNm de FOXC1 se correlacionaban a la inversa con la expresión de ER α en múltiples conjuntos de datos de sistemas de micrositio de ADNc de cáncer de mama (Ginestier et al., 2006; Lu et al., 2008; Perou et al., 2000; Pollack et al., 2002; Richardson et al., 2006; Schuetz et al., 2006; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003; Zhao et al., 2004) (Figuras 18A y 19). A continuación se examinaron los niveles de FOXC1 en líneas celulares de cáncer de mama humano bien conocidas positivas o negativas en ER α .

- 20 *FOXC1 regula a la baja la expresión de ER α .* En vista de la fuerte correlación inversa entre los niveles de FOXC1 y ER en el cáncer de mama, se determinó si el FOXC1 afecta a la expresión de ER α . Para abordar esta cuestión, se transfectó de forma estable FOXC1 en células de cáncer de mama MCF-7 positivas en ER α . La sobreexpresión ectópica de FOXC1 redujo sustancialmente los niveles de ER α en transfectantes estables, tal como muestra la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y la tinción western (Figuras 20A y 20B). Por consiguiente, los genes regulados por estrógeno bien establecidos PR y sustrato-1 de receptor de insulina (IRS-1) también fueron regulados a la baja en las células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 (Figura 20B). También se observaron resultados similares en las células de cáncer de mama T47D positivas en ER α (Figura 21).

- 30 Para corroborar el anterior descubrimiento, se transfectó de forma temporal una construcción génica de fusión GFP-FOXC1 en células MCF-7. La tinción inmunofluorescentes demostró que los niveles de ER α eran claramente inferiores en las células MCF-7 que expresaban GFP-FOXC1 en comparación con las células vecinas que apenas presentaban señal de GFP detectable (Figura 20C). A continuación, se co-transfectó de forma temporal células MCF-7 con una construcción indicadora de elemento de respuesta a estrógeno (ERE)-luciferasa tal como se ha descrito previamente (Cui et al., 2003), y un plásmido de FOXC1, y a continuación se estimuló a las células con estradiol. Tal como ilustra la Figura 20D, el FOXC1 suprimió la actividad de luciferasa inducida por estradiol, lo que sugiere que la actividad transcripcional de ER α se vio inhibida. Considerándolos en conjunto, estos resultados indican que el FOXC1 es un represor de la expresión de ER α y por tanto de su actividad.

- 40 *FOXC1 reduce la sensibilidad de las células de cáncer de mama a ligandos de ER α .* Previamente se ha demostrado que la sobreexpresión de FOXC1 potencia el crecimiento celular en condiciones normales de cultivo (Ray et al., 2010). Por tanto, se determinó si el FOXC1 afecta al crecimiento de células MCF-7 en otras condiciones de cultivo. Tal como se ilustra en la Figuras 22A y 22B, la sobreexpresión de FOXC1 potenció el crecimiento de células MCF-7 en medio libre de suero, pero disminuyó el aumento del crecimiento celular inducido por el tratamiento con estradiol en comparación con las condiciones en ayunas de suero. Adicionalmente, la sobreexpresión de FOXC1 dio lugar a células MCF-7 menos sensibles al tratamiento del antiestrógeno tamoxifeno (Figura 22C). En conjunto, estos datos sugieren que la regulación a la baja de ER α por FOXC1 permite que el crecimiento celular de MCF-7 sea menos dependiente de la activación de ER α inducida por E2 o de la desactivación de ER α inducida por tamoxifeno.

- 45 *FOXC1 regula al alza la actividad de NF- κ B.* Puesto que el análisis del promotor de gen ER α humano (Kos et al., 2001; Tanimoto et al., 1999) no encontró sitios de unión a FOXC1 conservados, se postuló que la inhibición de ER α por FOXC1 puede estar mediada por otros mecanismos de señalización. Teniendo esto en cuenta, se adoptó una estrategia de escrutinio sin tendencia. Puesto que el FOXC1 es un marcador importante para el cáncer de mama de tipo basal, se llevó a cabo un análisis de red de señalización sistemático de conjuntos de datos de micrositio de ADNc de cáncer de mama usando la plataforma IPA de Ingenuity (ver Materiales y métodos) para identificar mecanismos de señalización asociados al cáncer de mama de tipo basal. Como se muestra en la Figura 23A, se descubrió el NF- κ B como uno de los mecanismos más distintivos del subtipo de tipo basal, lo cual es consistente con el descubrimiento previo de que el factor de transcripción de NF- κ B está activado constitutivamente en el cáncer de mama negativo en ER y es esencial para la proliferación de células de cáncer de mama de tipo basal (Karin et al., 2002; Nakshatri et al., 1997; Singh et al., 2007).

Dado el anterior descubrimiento, se determinó si la FOXC1 regula la función de NF- κ B. La inmunotinción demostró que la subunidad p65 y p-p65 (Ser546, un sitio de fosforilación de quinasa I κ B [IKK]) era inducidamente de forma destacada por la sobreexpresión de FOXC1 en células MCF-7 (Figura 23B). A la inversa, el bloqueo de FOXC1 por su ARNsh reprimió la expresión de p65 en células de cáncer de mama de ratón 4T1, que poseen niveles elevados

de FOXC1 endógeno (Figura 23C). Previamente se ha demostrado que los niveles de p65 están controlados principalmente a nivel de estabilidad de proteína (Ryo et al., 2003). Usando RT-PCR y el inhibidor de traducción de proteína cicloheximida, se confirmó que esta regulación al alza de p65 por FOXC1 era mediante un incremento de su estabilidad proteínica (datos no mostrados). La inmunotinción con extractos nucleares indicó que el FOXC1 promueve la traslocalización de p65 al interior del núcleo (Figura 23D). En concordancia, un ELISA TransAM con oligonucleótidos que comprenden las secuencias de unión a NF- κ B de consenso demostró que el FOXC1 aumenta considerablemente la actividad de unión a ADN del p65 (Figura 23E). Para corroborar que el FOXC1 potencia la actividad de NF- κ B, se usó una construcción indicadora de luciferasa que responde a NF- κ B. Tal como se muestra en la Figura 23F, la sobreexpresión de FOXC1 aumentó significativamente la actividad de luciferasa dirigida por NF- κ B. La co-expresión de un super-represor I κ B α , una proteína de inhibición de p65, eliminó dicho efecto del FOXC1. Cabe destacar que la sobreexpresión de FOXC1 sensibilizó a las células MCF-7 frente a la inhibición farmacológica de NF- κ B mediante su inhibidor de molécula pequeña BMS-345541 en los ensayos de proliferación celular (Figura 23G). Se obtuvieron resultados similares con otras líneas celulares de cáncer de mama positivas para ER α (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados demuestran que el FOXC1 es un potente inductor de la activación de NF- κ B.

NF- κ B regula a la baja la expresión de ER α . El NF- κ B está asociado al estatus negativo de ER α en el cáncer de mama (Biswas et al., 2004; Nakshatri et al., 1997). Se ha demostrado que el NF- κ B regula de forma negativa la expresión de ER α (Biswas et al., 2005; Holloway et al., 2004). Para profundizar en la investigación de si el NF- κ B desempeña un papel en el efecto del FOXC1 sobre la expresión de ER α , la subunidad p65 de NF- κ B de las células MCF-7 fue sobreexpresada mediante transfección. La inmunotinción mostró que un aumento de la expresión de p65 disminuyó los niveles de proteína de ER α en células MCF-7 (Figura 24A). La RT-PCR en tiempo real indicó que los niveles de ARNm de ER α también se vieron reducidos (Figura 25). Inversamente, la inhibición de NF- κ B por el inhibidor IKK BMS-345541 en células MCF-7 que sobreexpresan FOXC1 elevó los niveles de ER α , PR e IRS-1 (Figura 24B). Adicionalmente, cuando se co-transfectó de manera transitoria p65 o ER α con una construcción indicadora de luciferasa ERE, la actividad de luciferasa inducida por E2 se vio sustancialmente reducida por la co-transfección de p65, aunque aumentó por la co-transfección de ER α (Figura 24C).

El ARNm de ER α humano se transcribe desde al menos siete promotores diferentes con regiones únicas no traducidas en 5' (Kos et al., 2001). Todos estos transcritos de ER α utilizan un mismo sitio de aceptación de separación en el nucleótido +163 desde el sitio de inicio de la transcripción en el exón 1 identificado originalmente (Green et al., 1986). Estudios previos han demostrado que el p65 se une al promotor B del gen ER α (Tanimoto et al., 1999). De forma destacable, también existe un sitio de unión a p65 altamente conservado GGGACTTTCA en la posición -430 del promotor F de ER α (Mahmoodzadeh et al., 2009). Para confirmar que el p65 se une a esta región de promotor, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando extractos celulares preparados a partir de células MCF-7 de control y que sobreexpresan FOXC1. La región promotora amplificada de 140 pb se extiende desde el sitio de unión. Tal como se presenta en la Figura 24D, la unión de p65 al promotor F de ER α se vio incrementada por la sobreexpresión de FOXC1. En conjunto, estos resultados sugieren que el p65 media en la supresión de FOXC1 de la expresión de ER.

En este estudio, se ha demostrado que la expresión de FOXC1, un factor de transcripción esencial para el desarrollo de tejido de mesoderma en vertebrados (Berry et al., 2002; Saleem et al., 2003) y un marcador para el cáncer de mama de tipo basal (Ray et al., 2010), se correlaciona inversamente con los niveles de ER α en tejidos y líneas celulares de cáncer de mama. Específicamente, se descubrió que el FOXC1 regula al alza la subunidad p65 de NF- κ B, lo cual regula entonces a la baja la expresión de ER α a través de un mecanismo transcripcional. La regulación al alza de p65 también des-sensibiliza a las células de cáncer de mama frente al estradiol y el antiestrógeno tamoxifeno. En esencia, la sobreexpresión de FOXC1 hace que las células cambien de ser dependientes de estrógeno a una proliferación dependiente de NF- κ B, un descubrimiento confirmado por la sensibilidad de las células de cáncer de mama a la inhibición de NF- κ B. El NF- κ B es un factor de transcripción bien establecido que desempeña un papel central en la regulación de la expresión de muchos genes asociados a la proliferación celular, la respuesta inmune, la inflamación, la supervivencia celular y la oncogénesis (Karin et al., 2002; Lin et al.). Este estudio proporciona evidencias de la interrelación entre ER α y FOXC1 mediada por NF- κ B.

Estudios previos han revelado que la caja forkhead A1 (FOXA1) y la proteína de unión 3 (GATA-3) son expresadas en íntima asociación con el ER α (Albergaria et al., 2009). Ambos son factores de transcripción implicados en la acción mediada por ER α en el cáncer de mama (Eeckhoutte et al., 2007; Lupien et al., 2008; van der Heul-Nieuwenhuijzen et al., 2009). El FOXA1 se une a ADN de cromatina y abre la estructura de la cromatina potenciando con ello la unión de ER α a los promotores de sus genes diana. El sitio de unión de FOXA1 habitualmente está en estrecha proximidad respecto a los sitios de unión a ER α . A este respecto, el FOXA1 actúa como factor imprimador en el reclutamiento de ER α a sus elementos cis-reguladores en el genoma y la subsiguiente inducción transcripcional de genes diana tales como ciclina D1 en las células de cáncer de mama (Carroll et al., 2005; Laganieri et al., 2005). El GATA-3 es requerido para la estimulación de estrógeno en la progresión del ciclo celular en las células de cáncer de mama. Regula al alza el ER α uniéndose a dos elementos cis-reguladores localizados dentro del gen ER α ; esta unión permite el reclutamiento de ARN polimerasa II a promotores de ER α (Eeckhoutte et al., 2007). Otro factor de transcripción de cabeza forkhead, FOXO3a, también induce la expresión de ER α a través de la unión al promotor de ER α (Belguise y Sonenshein, 2007; Guo y Sonenshein, 2004).

Además de su asociación al cáncer de mama negativo para ER α en general, la activación de NF- κ B se ha asociado a la pérdida de ER asociada a la sobreexpresión de EGFR ó HER-2 en el cáncer de mama inflamatorio (Van Laere et al., 2007). Esto es consistente con el descubrimiento anterior de que el NF- κ B media en la regulación a la baja de ER mediante MAPK hiperactivo (Holloway et al., 2004; Oh et al., 2001), inducido normalmente por la sobreexpresión de EGFR y HER-2. Cabe destacar que los mecanismos para la inhibición de ER α por NF- κ B todavía no se entienden bien. El p65 de NF- κ B puede actuar uniéndose directamente al promotor de ER α (Mahmoodzadeh et al., 2009; Tanimoto et al., 1999). Además de los sitios de unión de NF- κ B publicados para el promotor B del gen ER α (Tanimoto et al., 1999), existe un sitio de unión de NF- κ B altamente conservado en el promotor F de ER α en los nucleótidos -380 a -420 (Mahmoodzadeh et al., 2009). El análisis ChIP confirmó que el NF- κ B se puede unir a la región que contiene las secuencias conservadas. Otra posibilidad es que el p65 interaccione con ER α inhibiendo con ello la actividad de ER α (Gionet et al., 2009; Stein y Yang, 1995). Esto a su vez puede reducir la transcripción de ER α , que puede ser regulada positivamente mediante el propio ER α activado por estrógenos a través de EREs medios en su promotor (Piva et al., 1988; Treilleux et al., 1997). El efecto de NF- κ B también puede explicarse en parte por su regulación de genes que modulan la expresión de ER α .

En resumen, este estudio esboza un mecanismo para la expresión baja o nula de ER α en el cáncer de mama de tipo basal y propone un nuevo paradigma para investigar el control de la expresión de ER α durante la progresión del cáncer de mama. Estos descubrimientos ahondan en el informe previo de que la expresión de ciclina D1 y otros genes promotores del crecimiento se ve aumentada en las células que sobreexpresan FOXC1. Una relación entre el ER α y FOXC1/NF- κ B puede tener implicaciones clínicas para los pacientes de cáncer de mama positivos en ER α que recurren con cáncer negativo en ER α .

Ejemplo 6: Estratificación pronóstica de pacientes enriquecidos en HER2 utilizando una determinación de FOXC1 de microsistemas de expresión génica semi-cuantitativa

Los tumores enriquecidos en receptor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2) presentan amplificación génica o sobreexpresión proteínica. Este subtipo de cáncer de mama es notable por su prognosis variable y su respuesta a la terapia sistémica. Se ha sugerido que un subconjunto de tumores positivos en HER2 exhibe características de tipo basal, el denominado subtipo HER2 basal. El subtipo HER2 basal ha demostrado presentar el peor pronóstico entre los tumores que sobreexpresan HER2. Se ha sugerido que el subtipo HER2 basal simultáneamente co-expresa HER2 y marcadores típicos del cáncer de mama de tipo basal. Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, el FOXC1 es un biomarcador terapéutico del subtipo molecular de cáncer de mama de tipo basal. Por lo tanto, se puede investigar la expresión de FOXC1 dentro de los tumores que sobreexpresan HER2 para determinar si la expresión de FOXC1 representa el subtipo HER2 basal y pronostica una mala supervivencia global (OS).

Se obtuvieron datos de microsistema de expresión génica de 58 tumores amplificados de HER2 en una base de datos disponible públicamente que contenía datos de resultados clínicos ligados (J Clin Oncol. 10 abril 2010; 28(11): 1813-20. Epub 15 marzo 2010). Los datos fueron analizados para expresión de FOXC1 y se usó un valor de corte de mediana (percentil 50) para segregar los tumores entre las designaciones de FOXC1 alta y FOXC1 baja. La significación pronóstica del FOXC1 (alta vs. baja) se determinó usando análisis univariable y multivariable.

La Figura 14 muestra que la designación FOXC1 alta presentó una OS significativamente peor que la designación FOXC1 baja ($p=0,0313$). La designación FOXC1 alta fue un indicador pronóstico independiente para la OS cuando se controló la edad, el tamaño tumoral y el estatus de nodos linfáticos (HR 2,54, IC 95% 1,21-5,33, $p=0.0138$).

Los tumores que co-expresan FOXC1 y HER2 pueden representar el subtipo híbrido tipo basal/HER2+. Los pacientes con tumores enriquecidos en HER2 que presentan una expresión de FOXC1 elevada presentan una peor supervivencia. La determinación de la expresión de FOXC1 con tumores enriquecidos en HER2 puede representar una estrategia pragmática para la diagnosis y la prognosis del subtipo basal-HER2.

Ejemplo 7: Estratificación pronóstica de pacientes luminales que utilizan determinación de microsistemas de expresión génica semi-cuantitativa de FOXC1.

Los tumores enriquecidos en receptor de estrógeno y/o receptor de progesterona presentan amplificación génica o sobreexpresión proteínica de ER y/o PR. Un subconjunto de tumores positivos en ER y/o positivos en PR puede exhibir características de tipo basal, el denominado subtipo híbrido de tipo basal/luminal. El subtipo híbrido de tipo basal/luminal probablemente tiene el peor pronóstico entre los tumores que sobreexpresan ER o PR. El subtipo híbrido de tipo basal/luminal probablemente co-expresa de forma simultánea ER y/o PR y marcadores típicos del cáncer de mama de tipo basal. Tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores, el FOXC1 es un biomarcador terapéutico del subtipo molecular de cáncer de mama de tipo basal. Por lo tanto, se puede investigar la expresión de FOXC1 en tumores que sobreexpresan ER y/o PR para determinar si la expresión de FOXC1 representa el subtipo híbrido de tipo basal/luminal y pronostica una mala supervivencia global (OS).

Los datos de microsistemas de expresión génica de tumores amplificados en ER y/o PR pueden obtenerse en una base de datos disponible públicamente que contiene datos de resultados clínicos asociados. Los datos pueden analizarse para determinar la expresión de FOXC1 y se debería usar un valor de corte de mediana para segregar los

tumores entre las designaciones FOXC1 alta y FOXC1 baja. La significación pronóstica del FOXC1 (alta vs. baja) puede determinarse usando análisis univariable y multivariable.

5 La designación de FOXC1 alta probablemente tiene una OS significativamente peor en comparación con la designación FOXC1 baja dentro del subtipo luminal. La designación FOXC1 alta probablemente es un indicador pronóstico independiente para pero OS cuando se controla la edad, el tamaño tumoral y el estatus de nodos linfáticos.

10 Los tumores que co-expresan FOXC1 y ER y/o PR pueden representar el subtipo híbrido de tipo basal/luminal. Los pacientes con tumores enriquecidos en ER y/o PR que presentan una expresión elevada de FOXC1 probablemente presenten una peor supervivencia. La determinación de la expresión de FOXC1 en tumores enriquecidos en ER y/o PR puede representar una estrategia pragmática para el diagnóstico y el pronóstico del subtipo híbrido de tipo basal/luminal.

Ejemplo 8: Estratificación pronóstica de pacientes triple negativos utilizando determinación de microsistemas de expresión génica semi-cuantitativa de FOXC1.

15 Los tumores triple negativos no expresan ER, PR ó HER2. Un subconjunto de tumores triple negativos puede exhibir características de tipo basal, el denominado subtipo híbrido de tipo basal/triple negativo. El subtipo híbrido de tipo basal/triple negativo se asocia con el peor pronóstico dentro de los tumores triple negativos. El subtipo híbrido de tipo basal/triple negativo probablemente expresa marcadores típicos del cáncer de mama de tipo basal. Tal como se describe en los anteriores ejemplos, el FOXC1 es un biomarcador teranóstico del subtipo molecular de cáncer de mama de tipo basal. Por lo tanto, se puede investigar la expresión de FOXC1 en tumores triple negativos para
20 determinar si la expresión de FOXC1 representa el subtipo híbrido de tipo basal/triple negativo y pronostica una mala supervivencia global (OS).

25 Los datos de microsistema de expresión génica de tumores triple negativos pueden obtenerse de una base de datos disponible públicamente que contiene datos de resultados clínicos asociados. Los datos se pueden analizar para determinar la expresión de FOXC1 y se debería usar un valor de corte de mediana para segregar los tumores entre las designaciones de FOXC1 alta y FOXC1 baja. La significación pronóstica de FOXC1 (alta vs. baja) puede determinarse usando análisis univariable y multivariable.

30 La designación de FOXC1 alta probablemente presenta una OS significativamente peor en comparación con la designación de FOXC1 baja dentro del subtipo triple negativo. La designación de FOXC1 alta probablemente es un indicador pronóstico independiente para peor OS cuando se controla la edad, el tamaño tumoral y el estatus de nodos linfáticos.

35 Los tumores que expresan FOXC1 y no ER, PR y HER2 pueden representar el subtipo híbrido de tipo basal/triple negativo. Los pacientes con tumores triple negativos que presentan una expresión elevada de FOXC1 probablemente presentan una peor supervivencia. La determinación de la expresión de FOXC1 en tumores triple negativos puede representar una estrategia pragmática para el diagnóstico y el pronóstico del subtipo híbrido de tipo basal/luminal.

Referencias

- Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automatic Control* 1974; 19: 716-23.
- Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, Kawasaki S, Oie SH, Murayama A et al (2009). KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of Eralpha. *Oncogene* 28: 2894-902.
- 5 Albergaria A, Paredes J, Sousa B, Milanezi F, Carneiro V, Bastos J et al (2009). Expression of FOXA1 and GATA-3 in breast cancer: the prognostic significance in hormone receptor-negative tumors. *Breast Cancer Res* 11: R40.
- Andre F, Job B, Dessen P, et al. Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 441-51.
- 10 Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992; 52: 1399-105.
- Belguise K, Sonenshein GE (2007). PKC θ promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor alpha synthesis. *J Clin Invest* 117: 4009-21.
- Berry FB, Saleem RA, Walter MA (2002). FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain. *J Biol Chem* 277: 10292-7.
- 15 Berry FB, Mirzayans F, Walter MA. Regulation of FOXC1 stability and transcriptional activity by an epidermal growth factor-activated mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *J Biol Chem* 2006; 281: 10098-104.
- Biswas DK, Shi W, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB et al (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10137-42.
- 20 Biswas DK, Singh S, Shi Q, Pardee AB, Iglehart JD (2005). Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Sci STKE* 2005: pe27.
- Bland JM, Altman DG. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ*. 5 diciembre 1998; 317(7172): 1572.
- Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL, et al. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14076-81.
- 25 Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295: 2492-502.
- Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ et al. (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122: 33-43.
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Bertucci F, et al. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 1779-85.
- 30 Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 1 marzo 2008; 14(5): 1368-76.
- Couse, JF, Korach KS (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20: 358-417.
- 35 Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB et al (2003). Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. *Mol Endocrinol* 17: 575-88.
- Cox DR HD. *Theoretical Statistics*. Nueva York, NY, Chapman y Hall, 1974. 1974.
- 40 deConinck EC, McPherson LA, Weigel RJ (1995). Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol Cell Biol* 15: 2191-6.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4429-34.
- 45 Dhasarathy A, Kajita M, Wade PA (2007). The transcription factor snail mediates epithelial to mesenchymal transitions by repression of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 21: 2907-18.
- Eeckhoutte J, Keeton EK, Lupien M, Krum SA, Carrol JS, Brown M (2007). Positive cross-regulatory loop ties GATA.3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res* 67: 6477-83.

- Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Caveolin 1 and caveolina 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype. *Br J Cancer* 2008; 99: 327-34.
- Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24: 4660-71.
- 5 Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Moore JT, Mohsin SK, Osborne CK et al (2003). Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumour parameters. *Cancer Res* 63: 2434-9.
- Ginestier C, Cervera N, Finetti P, Esteyries S, Esterni B, Adelaide J et al (2006). Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clin Cancer Res* 12: 4533-44.
- 10 Gionet N, Jansson D, Mader S, Pratt MA (2009). NF-kappaB and estrogen receptor alpha interactions: Differential function in estrogen receptor-negative and -positive hormone-independent breast cancer cells. *J Cell Biochem* 107: 448-59.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P et al (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-9.
- 15 Guo S, Sonenshein GE (2004). Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24: 8681-90.
- Hasegawa M, Moritani S, Murakumo Y, et al. CD109 expression in basal-like breast carcinoma. *Pathol Int* 2008; 58: 288-94.
- 20 Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007; 8: R76.
- Hess KR, Anderson K, Symmans WF, et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4236-44.
- Holloway JN, Murthy S, El-Ashry D (2004). A cytoplasmic substrate of mitogen-activated protein kinase is responsible for estrogen receptor alpha down-regulation in breast cancer cells: the role of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 18: 1396-410.
- 25 Hosey AM, Gorski JJ, Murray MM, Quinn JE, Chung WY, Stewart GE et al (2007). Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 99: 1683-94.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7: 96.
- 30 Ihemelandu CU, Leffall LD, Jr., Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res*. Nov 2007; 143(1): 109-18.
- Ihemelandu CU, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, Siram SM, Leffall LD, Jr., et al. Treatment and survival outcome for molecular breast cancer subtypes in black women. *Ann Surg*. Marzo 2008; 247(3): 463-9.
- 35 Ivshina AV, George J, Senko O, et al. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 10292-301.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2: 301-10.
- Keen JC, Davidson NE (2003). The biology of breast carcinoma. *Cancer* 97: 825-33.
- 40 Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol* 2008; 61: 553-60.
- Kos M, Redi G, Denger S, Gannon F (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15: 2057-63.
- 45 Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R65.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-70.

- Laganier J, Deblois G, Lefebvre C, Bataille AR, Robert F, Giguere V (2005). From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11651-6.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1989). Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 49: 8-31, 1.
- 5 Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 14: 45-55.
- Lin Z, Yin P, Reierstad S, O'Halloran M, Coon VJ, Pearson EK et al. Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptoralpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer. *Oncogene* 29: 1114-22.
- 10 Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 264-71.
- Lu S, Simin K, Khan A, Mercurio AM. Analysis of integrin beta4 expression in human breast cancer: association with basal-like tumors and prognostic significance. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1050-8.
- Lu X, Wang ZC, Iglehart JD, Zhang X, Richardson AL (2008). Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. *Breast Cancer Res Treat* 108: 191-201.
- 15 Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W et al (2008). FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* 132: 958-70.
- Mahmoodzadeh S, Fritschka S, Dworatzek E, Pham TH, Becher E, Kuehne A et al. (2009). Nuclear factor-kappaB regulates estrogen receptor-alpha transcription in the human heart. *J Biol Chem* 284: 24705-14.
- 20 Mani SA, Yang J, Brooks M, et al. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10069-74.
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer*. 22 agosto 2015; 93(4): 387-91.
- Miller LD, Smeds J, George J, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13550-5.
- 25 Moyano JV, Evans JR, Chen F, et al. AlphaB-crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *J Clin Invest* 2006; 116: 261-70.
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 17: 3629-39.
- 30 Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-74.
- Nishimura DY, Swiderski RE, Alward WL, Searby CC, Patil SR, Bennet SR et al (1998). The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. *Nat Genet* 19: 140-7.
- Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D (2001). Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 15: 1344-59.
- 35 Osborne CK (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 51: 227-38.
- Park WC, Jordan VC (2002). Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med* 8: 82-8.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-7.
- 40 Pawitan Y, Bjohle J, Amler L, et al. Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R953-64.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.
- Piva R, Bianchini E, Kumar VL, Chambon P, del Senno L (1988). Estrogen induced increase of estrogen receptor RNA in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 943-9.
- 45 Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE et al (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12963-8.

- Qu Y, Wang J, Sim MS, Liu B, Giuliano A, Barsoum J et al (2009). Elesclomol, counteracted by Akt survival signaling, enhances the apoptotic effect of chemotherapy drugs in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*.
- Ray P, Wang J, Qu Y, Sim M, Shamonki J, Bagaria SP et al (2010). FOXC1 Is a Potential Prognostic Biomarker with Functional Significance in Basal-like Breast Cancer. *Cancer Research*, 15 mayo.
- 5 Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 1 abril 2009; 15(7): 2302-10.
- Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006; 9: 121-32.
- 10 Rosen EM, Fan S, Isaacs C (2005). BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer* 12: 533-48.
- Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G et al (2003). Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12: 1413-26.
- Saceda M, Grunt TW, Colomer R, Lippman ME, Lupu R, Martin MB (1996). Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology* 137: 4322-30.
- 15 Saleem RA, Banerjee-Basu S, Berry FB, Baxevanis AD, Walter MA (2003). Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in the forkhead domain of FOXC1. *Hum Mol Genet* 12: 2993-3005.
- Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68: 989-97.
- 20 Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M et al (2006). Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 66: 5278-86.
- Seewaldt VL, Scott V. Images in clinical medicine. Rapid progression of basal-type breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: e12.
- 25 Shirley SH, Rundhaug JE, Tian J, Cullinan-Ammann N, Lambertz I, Conti CJ et al (2009). Transcriptional regulation of estrogen receptor-alpha by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 3405-14.
- Singh S, Shi Q, Bailey ST, Palczewski MJ, Pardee AB, Iglehart JD et al (2007). Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer. *Mol Cancer Ther* 6: 1973-82.
- 30 Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8418-23.
- 35 Staaf J, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson H, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Grabau D, Fernö M, Malmström PO, Johannsson OT, Loman N, Barkardóttir RB, Borg A. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2—positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 10 abril 2010; 28(11): 1813-20.
- Stein B, Yang MX (1995). Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* 15: 4971-9.
- 40 Tanimoto K, Eguchi H, Yoshida T, Hajiro-Nakanishi K, Hayashi S (1999). Regulation of estrogen receptor alpha gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expression in human breast cancer. *Nucleic Acids Res* 27: 903-9.
- Treilleux, Peloux N, Brown M, Sergeant A (1997). Human estrogen receptor (ER) gene promoter-P1: estradiol-independent activity and estradiol inducibility in ER+ and ER- cells. *Mol Endocrinol* 11: 1319-31.
- 45 van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Dits NF, Jenster G (2009). Gene expression of forkhead transcription factors in the normal and diseased human prostate. *BJU Int* 103: 1574-80.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009.

Van Laere SJ, Van der Auwera I, Van den Eynden GG, van Dam P, Van Marck EA, Vermeulen PB et al (2007). NF-kappaB activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation. *Br J Cancer* 97: 659-69.

5 Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 671-9.

Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 28 abril 2004; 291(16): 1972-7.

10 Yoshida T, Eguchi H, Nakachi K, Tanimoto K, Higashi Y, Suemasu K et al (2000). Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor alpha gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis* 21: 2193-201.

Zhao H, Langerod A, Ji Y, Nowels KW, Nesland JM, Tibshirani R et al (2004). Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol Biol Cell* 15: 2523-36.

Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X et al (2008). MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 283: 31079-86.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> RAY, Partha S.
 BAGARIA, Sanjay
 CUI, Xiaojiang
 5 WANG, Jinhua
 <120> MÉTODOS PARA DIAGNOSIS, PROGNOSIS Y TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA DE TIPO BASAL PRIMARIO Y METASTÁSICO Y OTROS TIPOS DE CÁNCER
 <130> 71754.8001.WO00
 <140> PCT/US10/44817
 10 <141> 2010-08-06
 <150> US 61/231.984
 <151> 2009-08-06
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 15 <210> 1
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de ARNsh de FoxC1 de ratón
 <400> 1
 ccgggagcag agctactatc gcgctctcga gagcgcgata gtagctctgc tcttttg 57
 <210> 2
 <211> 58
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ARNsh de FoxC1 de ratón
 <400> 2
 30 ccggtgggaa tagtagctgt cagatctcga gatctgacag ctactattcc catttttg 58
 <210> 3
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de ARNsh de FoxC1 de humano
 <400> 3

ES 2 546 410 T3

| | | |
|----|---|----|
| | ccggcaagaa gaaggacgcg gtgaactcga gttcaccgcg tccttcttct tgtttttg | 58 |
| | <210> 4 | |
| | <211> 57 | |
| | <212> ADN | |
| 5 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Secuencia de ARNsh de FoxC1 de humano | |
| | <400> 4 | |
| | ccggcccgga caagaagatc accctctcga gagggatgatc ttcttgccg ggttttt | 57 |
| 10 | <210> 5 | |
| | <211> 57 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> ARNsh de control | |
| | <400> 5 | |
| | ccggcaaaa gatgaagagc accaactcga gttggatgctc ttcattctgt tgttttt | 57 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 25 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador directo de FOXC1 | |
| | <400> 6 | |
| 25 | cggtatccag ccagtctctg taccg | 25 |
| | <210> 7 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 30 | <220> | |
| | <223> Cebador inverso de FOXC1 | |
| | <400> 7 | |
| | gttcggcttt gagggatggt c | 21 |
| | <210> 8 | |
| 35 | <211> 25 | |

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de ERalfa de FOXC1
 5 <400> 8
 cggttagatt catcatgcgg aaccg 25
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de ERalfa de FOXC1
 <400> 9
 tgtgtagagg gcatggtgga g 21
 15 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Cebador directo de ERalfa de ensayo CHIP
 <400> 10
 agaagctaga cctctgcagg 20
 <210> 11
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de ERalfa de ensayo CHIP
 <400> 11
 30 aagcaggggc aaggaaat c 21
 <210> 12
 <211> 3946
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Gen de FOXC1/FKHL7

ES 2 546 410 T3

<300>

<308> GenBank/AR140209

<309> 2001-06-16

<313> (1) .. (3946)

5 <400> 12

```
cgagaaaagg tgacgcgggg cccgggcagg cggccggcgc gcggccccc cccccccgc      60
cctggttatt tggccgcctt cgccggcagc tcagggcaga gtctcctgga aggcgcaggc      120
agtgtggcga gaagggcgcc tgcttgttct ttctttttgt ctgctttccc ccgtttgcgc      180
ctggaagctg cgccgcgagt tcttgcaagg cggctctgcc cgccggggcc cggccttctc      240
ccctcgcagc gaccccgctt cgccggccgc cgggccccga ggtagcccga ggcgccggag      300
gagccagccc cagcgagcgc cgggagaggg ggcagcgcag ccggacgcac agcgcagcgg      360
gccggcacca gctcggccgg gcccgactc ggactcggcg gccggcgcgg cgcggcccgg      420
cccgagcgag ggtggggggc ggcgggcggc gcggggcggc ggcgagcggg ggccatgcag      480
gcgcgctact ccgtgtccag ccccaactcc ctgggagtgg tgccctacct cggcggcgag      540
cagagctact accgcgcggc ggccgcggcg gccggggggcg gctacaccgc catgccggcc      600
cccatgagcg tgtactcgca ccctgcgcac gccgagcagt acccgggcgg catggccccg      660
gcctacgggc cctacacgcc gcagccgcag cccaaggaca tggatgaagcc gccctatagc      720
tacatcgcgc tcatcaccat ggccatccag aacgccccgg acaagaagat caccctgaac      780
ggcatctacc agttcatcat ggaccgcttc cccttctacc gggacaacaa gcagggctgg      840
```

ES 2 546 410 T3

cagaacagca tccgccacaa cctctcgctc aacgagtgtc tcgtcaaggt gccgcgagc 900
 gacaagaagc cgggcaaggg cagctactgg acgctggacc cggactccta caacatgttc 960
 gagaacggca gcttcctgcg gcggcggcgg cgcttcaaga agaaggacgc ggtgaaggac 1020
 aaggaggaga aggacaggct gcacctcaag gagccgccc cgcccggccg ccagcccccg 1080
 cccgcgcccg cggagcaggc cgacggcaac gcgcccgtc cgagccgccc gcccgtagc 1140
 atccaggaca tcaagaccga gaacggtacg tgccccctgc cgccccagcc cctgtccccg 1200
 gccgcccggc tgggcagcgg cagcgcggcc gcggtgcca agatcgagag ccccgacagc 1260
 agcagcagca gcctgtccag cgggagcagc cccccgggca gcctgcccgc ggcgcggccg 1320
 ctcagcctgg acggtgcgga ttccgcggc cgccgcccg cgccctccgc cccgcccgg 1380
 caccatagcc agggcttcag cgtggacaac atcatgacgt cgctgcgggg gtcgcccagc 1440
 agcgcggccg cggagctcag ctccggcctt ctggcctcgg cggccgcgtc ctcgcgcgcg 1500
 gggatcgac ccccgtggc gctcggcgc tactcgccc gccagagctc cctctacagc 1560
 tccccctgca gccagacctc cagcgcgggc agctcgggcg gcggcggcgg cggcgcgggg 1620
 gccgcggggg gcgcgggccc cgccgggacc taccactgca acctgcaagc catgagcctg 1680
 tacgcggccc gcgagcgcgg gggccacttg cagggcgcgc ccgggggccc gggcggctcg 1740
 gccgtggaca accccctgcc cgactactct ctgcctccgg tcaccagcag cagctcgtcg 1800
 tcctgagtc acggcggcgg cggcggcggc ggccggggag gccaggaggc cggccaccac 1860
 cctgcggccc accaaggccc cctcacctcg tggtagctga accaggcggg cggagacctg 1920
 gggcacttgg caagcgcggc ggccggcggc gcggccgag gctaccggg ccagcagcag 1980
 aacttccact cggtagcggg gatgttcgag tcacagagga tcggcttgaa caactctcca 2040
 gtgaacggga atagtagctg tcaaatggc ttccctcca gccagtctct gtaccgcagc 2100
 tccggagctt tcgtctacga ctgtagcaag ttttgacaca ccctcaaagc cgaactaat 2160
 cgaaccccaa agcaggaaaa gctaaaggaa cccatcaagg caaaatcgaa actaaaaaaaa 2220
 aaaaatccaa ttaaaaaaaaa ccctgagaa tattcaccac accagcgaac agaatatccc 2280
 tccaaaaatt cagctcacca gcaccagcac gaagaaaact ctattttctt aaccgattaa 2340
 ttcagagcca cctccacttt gccttgtcta aataaaciaa cccgtaact gttttataca 2400
 gagacagcaa aatcttggtt tattaagga cagtgttact ccagataaca cgtaagtttc 2460
 ttcttgcttt tcagagacct gctttccct cctcccgtct cccctctctt gccttcttcc 2520
 ttgccttca cctgtaagat attattttat cctatgttga agggaggggg aaagtccccg 2580
 tttatgaaag tcgctttctt tttattcatg gacttgtttt aaaatgtaa ttgcaacata 2640
 gtaatttatt ttaatttgt agttggatgt cgtggaccaa acgccagaaa gtgttcccaa 2700
 aacctgacgt taaattgcct gaaacttta attgtgcttt ttttctcatt ataaaaaggg 2760

ES 2 546 410 T3

aaactgtatt aatcttattc taccctcttt tctttctttt tgttgaacat attcattggt 2820
 tgtttattaa taaattacca ttcagtttga atgagaccta tatgtctgga tactttaata 2880
 gagctttaat tattacgaaa aaagatttca gagataaaac actagaagt acctattctc 2940
 cacctaaatc tctgaaaaat ggagaaaacc tctgactagt ccatgtcaaa ttttactaaa 3000
 agtctttttg tttagattta ttttcctgca gcatcttctg caaaatgtac tatatagtca 3060
 gcttgctttg aggctagtaa aaagatattt ttctaaacag attggagttg gcatataaac 3120
 aaatacgttt tctcactaat gacagtccat gattcggaaa ttttaagccc atgaatcagc 3180
 cgcggtctta ccacggtgat gcctgtgtgc cgagagatgg gactgtgcyg ccagatatgc 3240
 acagataaat atttggcttg tgtattccat ataaaattgc agtgcattat atacatccct 3300
 gtgagccaga tgctgaatag attttttctt attatttcag tcttttataa aaggaaaaat 3360
 aaaccagttt ttaaattgat gtatataatt ctccccatt tacaatcctt catgtattac 3420
 atagaaggat tgctttttta aaaatatact gcgggttggg aagggatatt taatctttga 3480
 gaaactattt tagaaaatat gttttagtaa caattatttt tgaaaaagat ttaaagcaat 3540
 aacaagaagg aaggcgagag gagcagaaca ttttggctta ggggtgtttc tttttaaac 3600
 attttttctt gtaattttac agttaaacct aggggacaat ccggattggc cctccccctt 3660
 ttgtaataaa cccaggaaat gtaataaatt cattatctta gggatgatctg ccctgccaat 3720
 cagactttgg ggagatggcg atttgattac agacgttcgg ggggtgtggg ggcttgcaat 3780
 ttgttttgga gataatacag tttcctgcta tctgccgctc ctatctagag gcaaacctta 3840
 agcagtaatt gctgttgctt gttgtcaaaa tttgatcatt gttaaaggat tgctgcaaat 3900
 aaatacactt taatttcagt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 3946

<210> 13

<211> 1659

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia codificadora de gen de FOXC1/FKHL7

<300>

<308> GenBank/AR140210

10 <309> 2001-06-16

<313> (1) . . (1659)

<400> 13

ES 2 546 410 T3

atgcaggcgc gctactccgt gtccagcccc aactccctgg gagtggtgcc ctacctcggc 60
 ggcgagcaga gctactaccg cgcggcggcc gcggcggccg ggggcggcta caccgccatg 120
 ccggccccc ttagcgtgta ctgcaccct gcgcacgccg agcagtacc gggcggcatg 180
 gcccgcgctt acgggccccta cagcccgag ccgcagccca aggacatggt gaagccgccc 240
 tatagctaca tcgcgctcat caccatggcc atccagaacg ccccggacaa gaagatcacc 300
 ctgaacggca tctaccagtt catcatggac cḡcttccc̄t̄ t̄ctaccgḡga caacaagcag 360
 ggctggcaga acagcatccg ccacaacctc tcgctcaacg agtgcttcgt caaggtgccg 420
 cgcgacgaca agaagccggg caagggcagc tactggacgc tggaccggga ctctacaac 480
 atgttcgaga acggcagctt cctgcgggcg gcggcgcgct tcaagaagaa ggacgcggtg 540
 aaggacaagg aggagaagga caggctgcac ctcaaggagc cggcccgcc cggccgcccag 600
 ccccgccccg cggcccgga gcaggccgac ggcaacgcgc ccggtccgca gccgccc 660
 gtgcgcatcc aggacatcaa gaccgagaac ggtacgtgcc cctcgccgcc ccagcccctg 720
 tccccggccg ccgccctggg cagcggcagc gccgcccggg tgcccaagat cgagagcccc 780
 gacagcagca gcagcagcct gtccagcggg agcagcccc cgggcagcct gccgtcggcg 840
 cggccgctca gcctggacgg tgcggattcc gcgccgccgc cggcccgcc ctccgccccg 900
 ccgcccacc atagccaggg cttcagcgtg gacaacatca tgacgtcgtc gcgggggctc 960
 ccgagagcg cggcccgga gctcagctcc ggccttctgg cctcggcggc cgcgtcctc 1020
 cgcgcgggga tcgaccccc gctggcgtc ggcgcctact cggccggcca gagctccctc 1080
 tacagctccc cctgcagcca gacctcagc gcgggcagct cgggcggcgg cggcggcggc 1140
 gcgggggccc cggggggcgc gggcggcgc gggacctacc actgcaacct gcaagccatg 1200
 agcctgtacg cggccggcga gcgcgggggc cacttgacg gcgcgcccgg gggcgcgggc 1260
 ggctcggccg tggacaacct cctgcccgac tactctctgc ctccggtcac cagcagcagc 1320
 tcgtcgtccc tgagtcacgg cggcggcggc ggcggcggcg ggggaggcca ggaggccggc 1380
 caccaccctg cggcccacca aggccgctc acctcgtggt acctgaacca ggcgggcgga 1440
 gacctgggcc acttggcaag cgcggcggcg gcggcggcgg ccgcaggcta cccgggcccag 1500
 cagcagaact tccactcggg gcgggagatg ttcgagtcac agaggatcgg cttgaacaac 1560
 tctccagtga acgggaatag tagctgtcaa atggccttcc cttccagcca gtctctgtac 1620
 cgcacgtccg gagcttctgt ctacgactgt agcaagttt 1659

<210> 14

<211> 553

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de proteína de FOXC1/FKHL7

ES 2 546 410 T3

<300>

<308> GenBank/AAE63616

<309> 2001-06-16

<313> (1) .. (553)

5 <400> 14

Met Gln Ala Arg Tyr Ser Val Ser Ser Pro Asn Ser Leu Gly Val Val
1 5 10 15

ES 2 546 410 T3

Pro Tyr Leu Gly Gly Glu Gln Ser Tyr Tyr Arg Ala Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Ala Met Pro Ala Pro Met Ser Val Tyr Ser
 35 40 45
 His Pro Ala His Ala Glu Gln Tyr Pro Gly Gly Met Ala Arg Ala Tyr
 50 55 60
 Gly Pro Tyr Thr Pro Gln Pro Gln Pro Lys Asp Met Val Lys Pro Pro
 65 70 75 80
 Tyr Ser Tyr Ile Ala Leu Ile Thr Met Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asp
 85 90 95
 Lys Lys Ile Thr Leu Asn Gly Ile Tyr Gln Phe Ile Met Asp Arg Phe
 100 105 110
 Pro Phe Tyr Arg Asp Asn Lys Gln Gly Trp Gln Asn Ser Ile Arg His
 115 120 125
 Asn Leu Ser Leu Asn Glu Cys Phe Val Lys Val Pro Arg Asp Asp Lys
 130 135 140
 Lys Pro Gly Lys Gly Ser Tyr Trp Thr Leu Asp Pro Asp Ser Tyr Asn
 145 150 155 160
 Met Phe Glu Asn Gly Ser Phe Leu Arg Arg Arg Arg Arg Phe Lys Lys
 165 170 175
 Lys Asp Ala Val Lys Asp Lys Glu Glu Lys Asp Arg Leu His Leu Lys
 180 185 190
 Glu Pro Pro Pro Pro Gly Arg Gln Pro Pro Pro Ala Pro Pro Glu Gln
 195 200 205
 Ala Asp Gly Asn Ala Pro Gly Pro Gln Pro Pro Pro Val Arg Ile Gln
 210 215 220
 Asp Ile Lys Thr Glu Asn Gly Thr Cys Pro Ser Pro Pro Gln Pro Leu
 225 230 235 240
 Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Ser Gly Ser Ala Ala Ala Val Pro Lys
 245 250 255
 Ile Glu Ser Pro Asp Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

ES 2 546 410 T3

Pro Pro Gly Ser Leu Pro Ser Ala Arg Pro Leu Ser Leu Asp Gly Ala
 275 280 285
 Asp Ser Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Ser Ala Pro Pro Pro His His
 290 295 300
 Ser Gln Gly Phe Ser Val Asp Asn Ile Met Thr Ser Leu Arg Gly Ser
 305 310 315 320
 Pro Gln Ser Ala Ala Ala Glu Leu Ser Ser Gly Leu Leu Ala Ser Ala
 325 330 335
 Ala Ala Ser Ser Arg Ala Gly Ile Ala Pro Pro Leu Ala Leu Gly Ala
 340 345 350
 Tyr Ser Pro Gly Gln Ser Ser Leu Tyr Ser Ser Pro Cys Ser Gln Thr
 355 360 365
 Ser Ser Ala Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala
 370 375 380
 Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Thr Tyr His Cys Asn Leu Gln Ala Met
 385 390 395 400
 Ser Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Arg Gly Gly His Leu Gln Gly Ala Pro
 405 410 415
 Gly Gly Ala Gly Gly Ser Ala Val Asp Asn Pro Leu Pro Asp Tyr Ser
 420 425 430
 Leu Pro Pro Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser His Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Glu Ala Gly His His Pro Ala
 450 455 460
 Ala His Gln Gly Arg Leu Thr Ser Trp Tyr Leu Asn Gln Ala Gly Gly
 465 470 475 480
 Asp Leu Gly His Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 485 490 495
 Tyr Pro Gly Gln Gln Gln Asn Phe His Ser Val Arg Glu Met Phe Glu
 500 505 510
 Ser Gln Arg Ile Gly Leu Asn Asn Ser Pro Val Asn Gly Asn Ser Ser
 515 520 525
 Cys Gln Met Ala Phe Pro Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Arg Thr Ser Gly

ES 2 546 410 T3

530

535

540

Ala Phe Val Tyr Asp Cys Ser Lys Phe
545 550

REIVINDICACIONES

1. Un método de clasificación teranóstica, que proporciona información relativa al diagnóstico, el pronóstico y la optimización del tratamiento de un tumor de cáncer de mama, método que comprende:
 - determinar un estatus de expresión de ER, PR y HER2 de una muestra de tumor de cáncer de mama;
- 5
 - detectar un nivel de expresión de FOXC1 a partir de la muestra de tumor de cáncer de mama;
 - comparar el nivel de expresión de FOXC1 con un nivel de corte predeterminado; y
 - clasificar la muestra de tumor de cáncer de mama como perteneciente a un subtipo de tumor de cáncer de mama híbrido de tipo basal/triple negativo teranóstico cuando el estatus de expresión de ER es negativo (ER-), el estatus de expresión de PR es negativo (PR-), el estatus de expresión de HER2 es negativo (HER2-) y el nivel de expresión de FOXC1 es superior a un nivel de corte predeterminado, donde el nivel de corte predeterminado se determina mediante un nivel de percentil 90 de los niveles de expresión de FOXC1 correspondientes a un conjunto de datos de tumores de cáncer de mama, comprendiendo el conjunto de datos todos los subtipos de cáncer de mama.
- 10
2. Un método para predecir un pronóstico de un cáncer de mama de tipo basal, método que comprende:
 - detectar un nivel de expresión de FOXC1 en una muestra de tumor de cáncer de mama;
 - comparar el nivel de expresión de FOXC1 con un nivel de corte predeterminado; y
 - predecir un mal pronóstico del cáncer de mama de tipo basal si el nivel de expresión de FOXC1 es superior al nivel de corte predeterminado, donde el nivel de corte predeterminado se determina mediante un nivel de percentil 90 de los niveles de expresión de FOXC1 correspondientes a un conjunto de datos de tumores de
- 15
- 20
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde la muestra de tumor de cáncer de mama es una muestra embebida en parafina y fijada con formalina (FFPE).
4. El método de la reivindicación 3, donde el nivel de expresión de FOXC1 se determina mediante reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR) o mediante un ensayo Quantigene® FFPE.
- 25
5. El método de la reivindicación 2, donde el pronóstico es supervivencia global o supervivencia libre de recurrencia.
6. El método de la reivindicación 2, donde el pronóstico es una propensión a desarrollar una metástasis distante o un tiempo para metástasis distante.
7. El método de la reivindicación 6 donde la metástasis distante es metástasis cerebral.
8. El método de la reivindicación 2, donde el pronóstico es una propensión a resistencia a una terapia dirigida contra el cáncer.
- 30
9. El método de la reivindicación 8, donde la terapia dirigida es una sustancia que inhibe la expresión y/o la actividad de HER2.
10. El método de la reivindicación 9, donde la sustancia es trastuzumab (Herceptin®).
11. El método de la reivindicación 8, donde la terapia dirigida es una sustancia que inhibe la expresión y/o la actividad de ER.
- 35
12. El método de la reivindicación 11, donde la sustancia es tamoxifeno o un inhibidor de aromatasa.

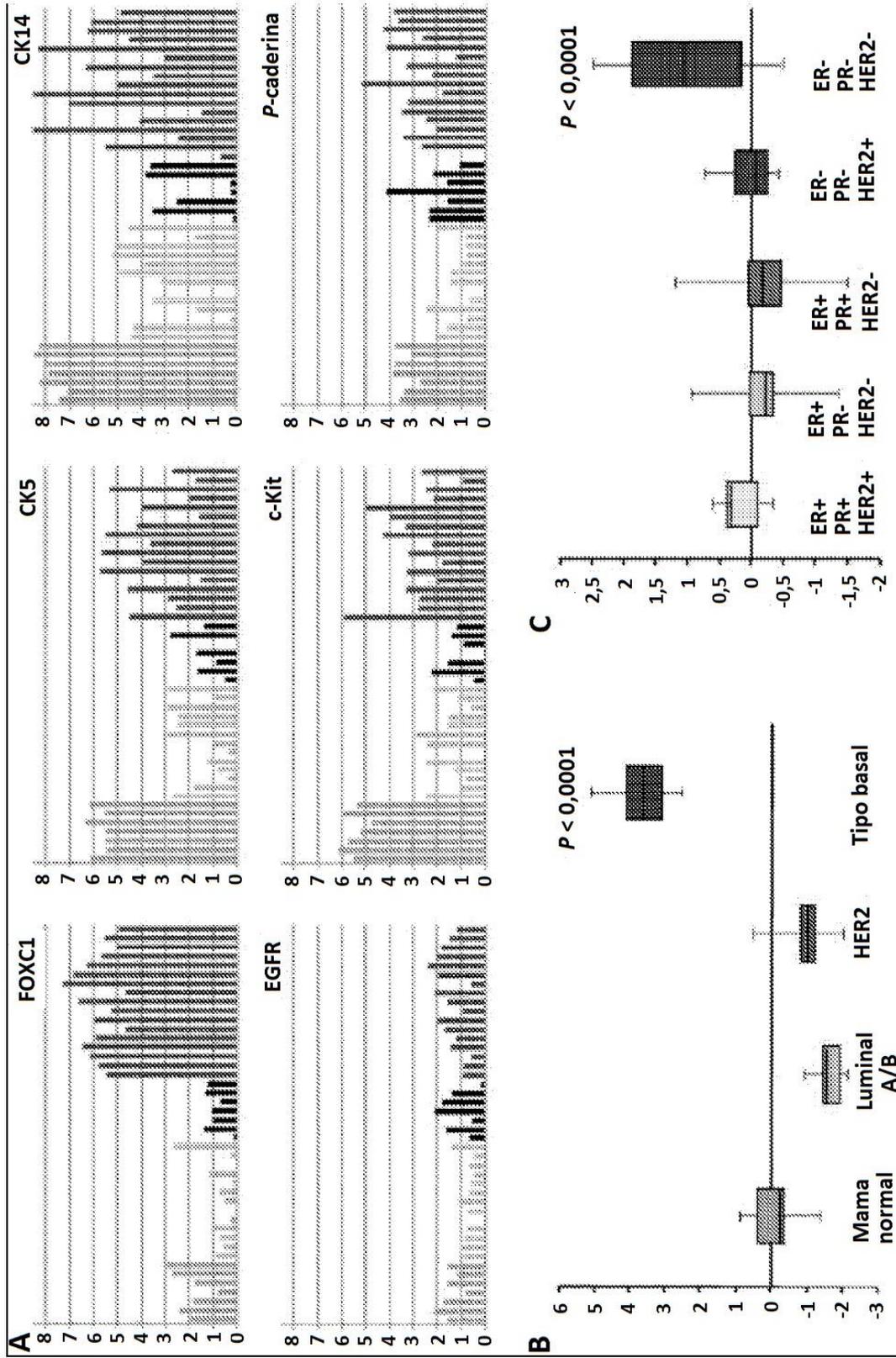


Fig. 1A-C

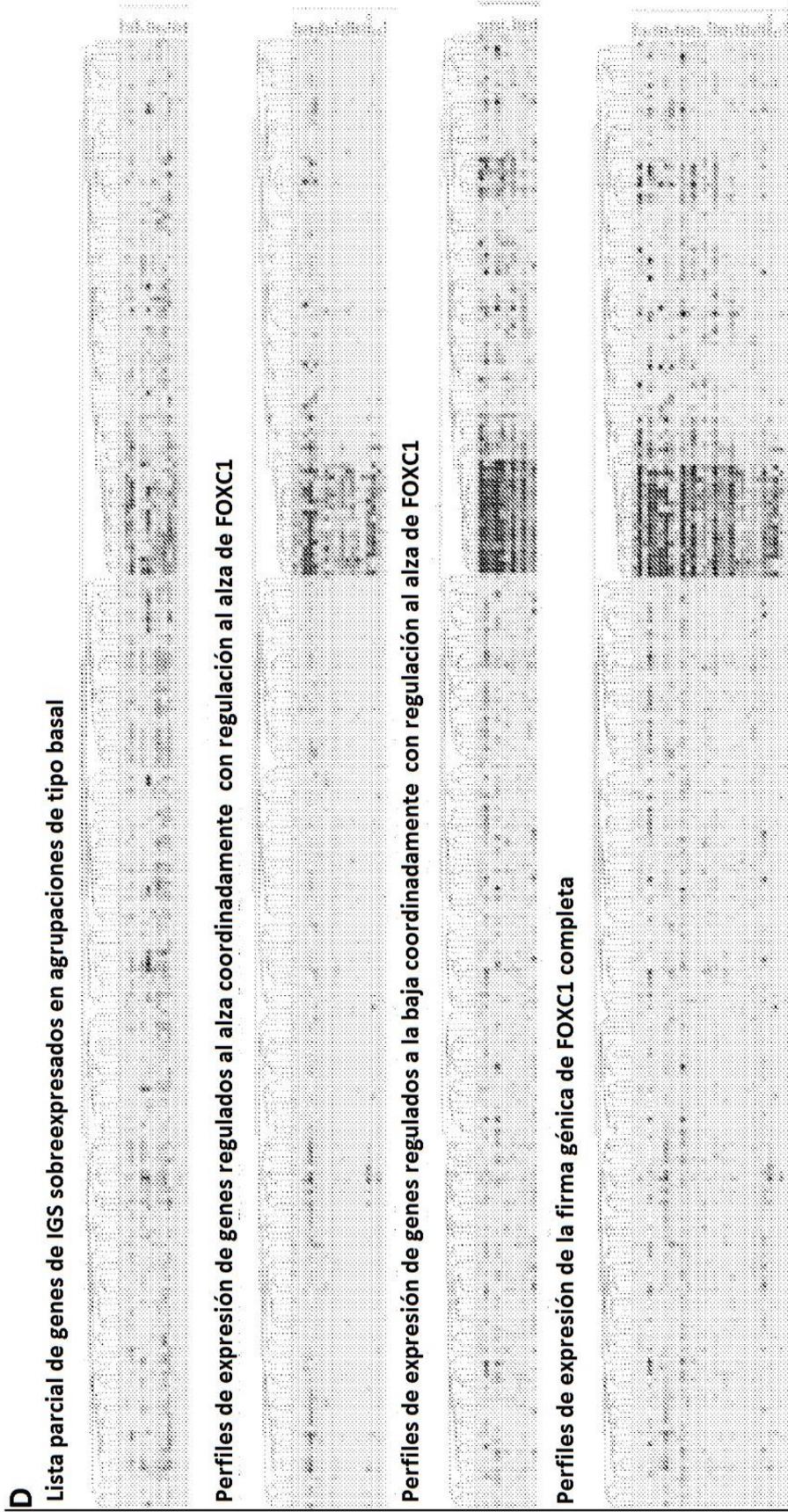


Fig. 1D

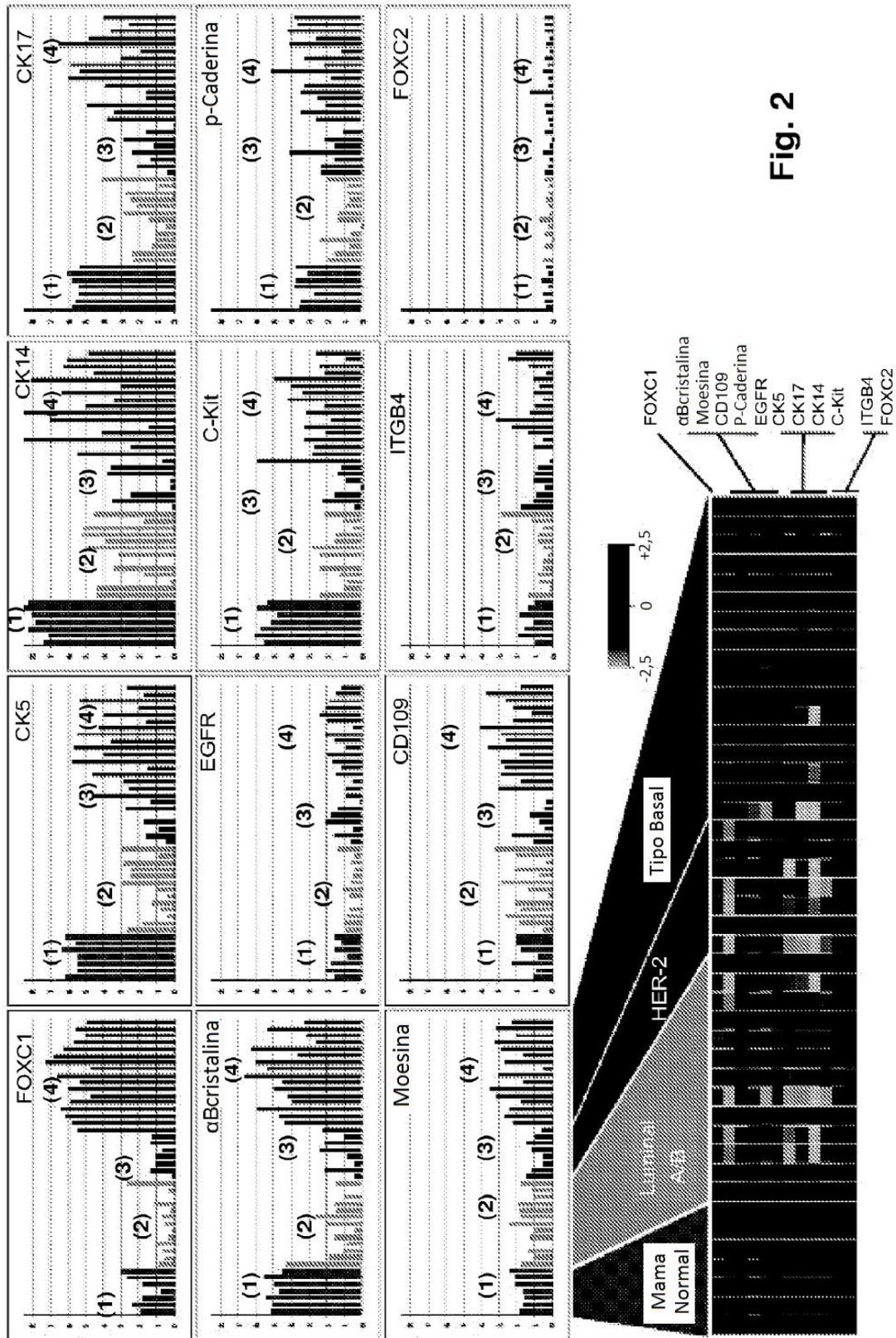


Fig. 2

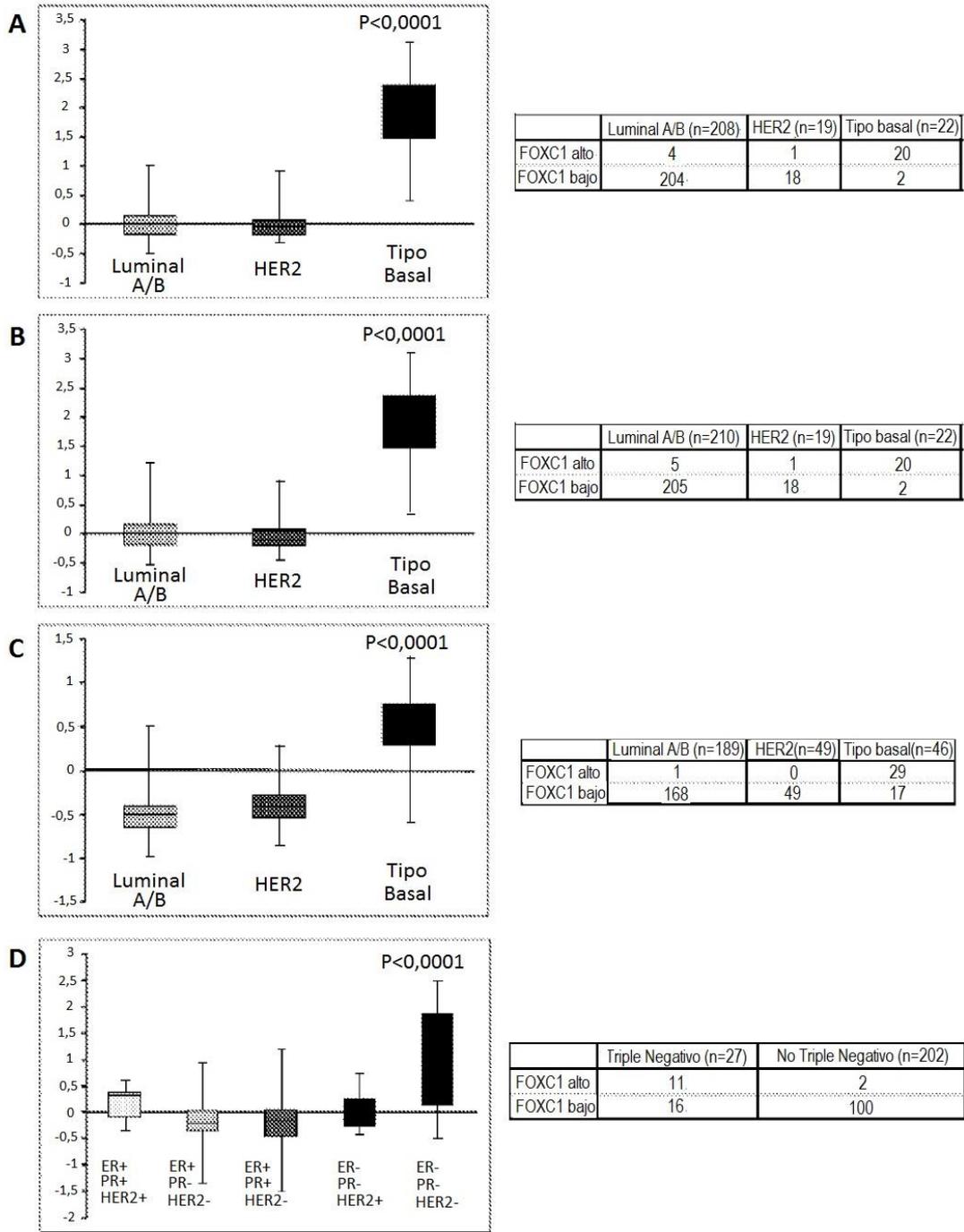


Fig. 3

Lista parcial de genes de IGS sobreexpresados en agrupaciones de tipo basal



Perfiles de expresión de genes regulados al alza coordinadamente con regulación al alza de FOXC1



Perfiles de expresión de genes regulados a la baja coordinadamente con regulación al alza de FOXC1



Perfiles de expresión de la firma génica de FOXC1 completa

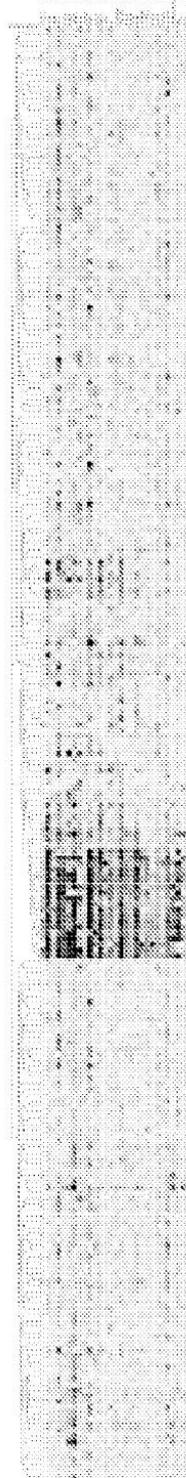
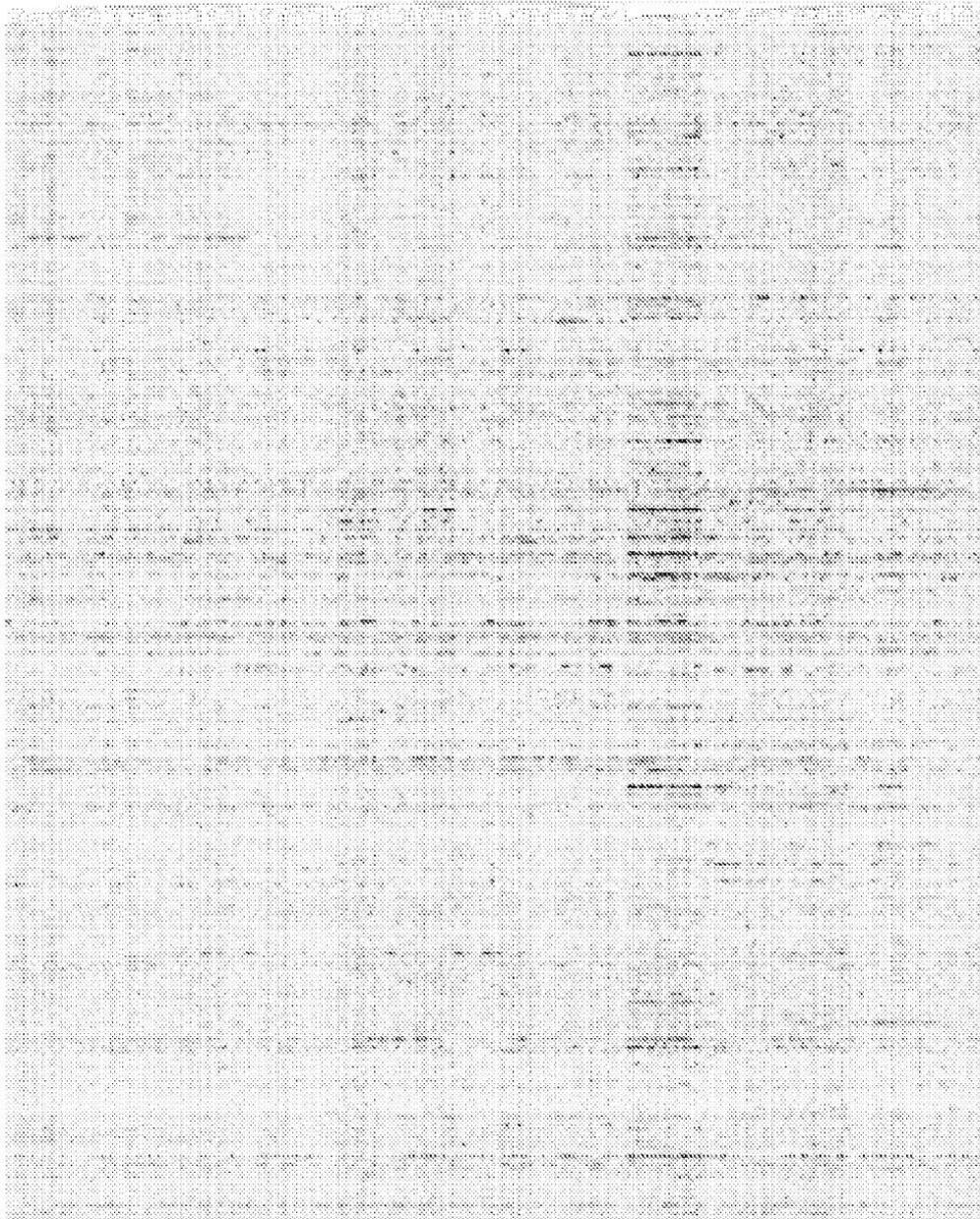


Fig. 4

Agrupamiento Jerárquico basado en IGS



Agrupamiento Jerárquico basado en la firma de 30 genes de FOXC1

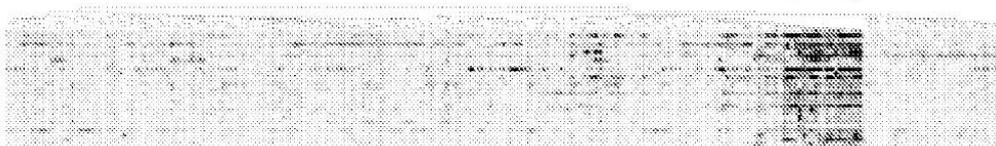


Fig. 5

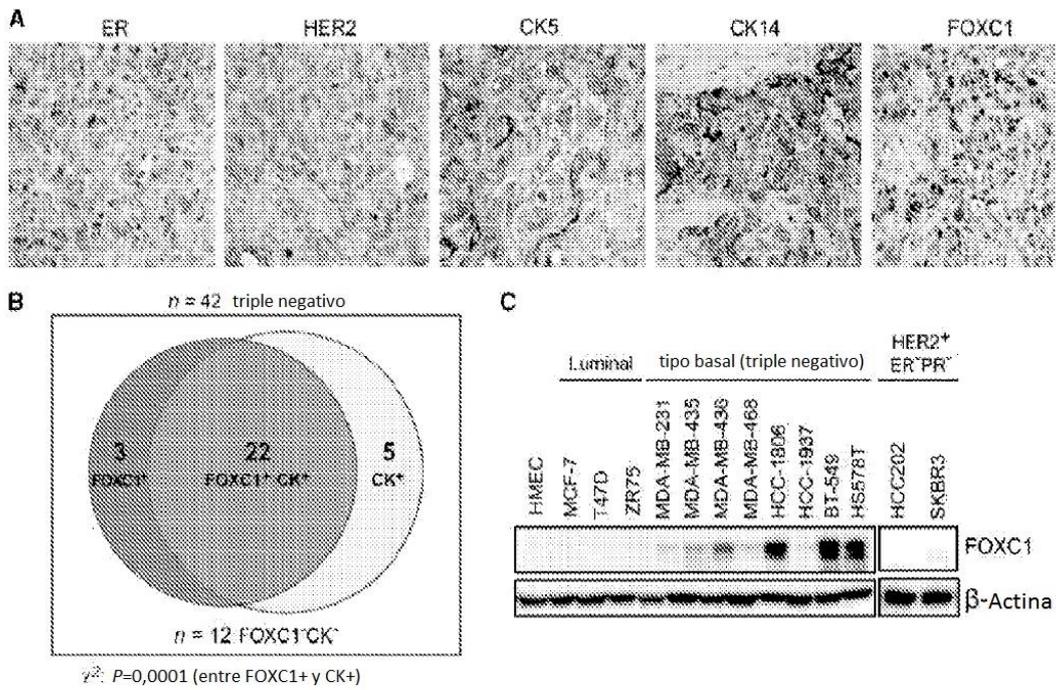


Fig. 6

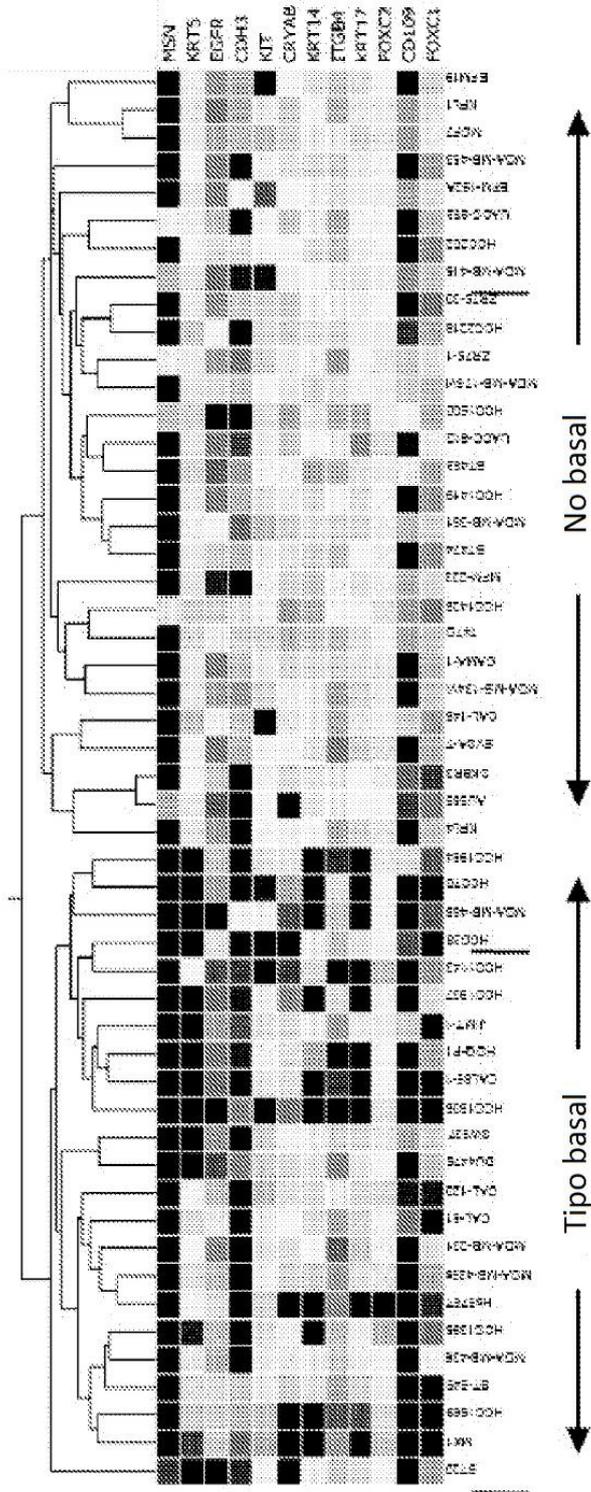


Fig. 7

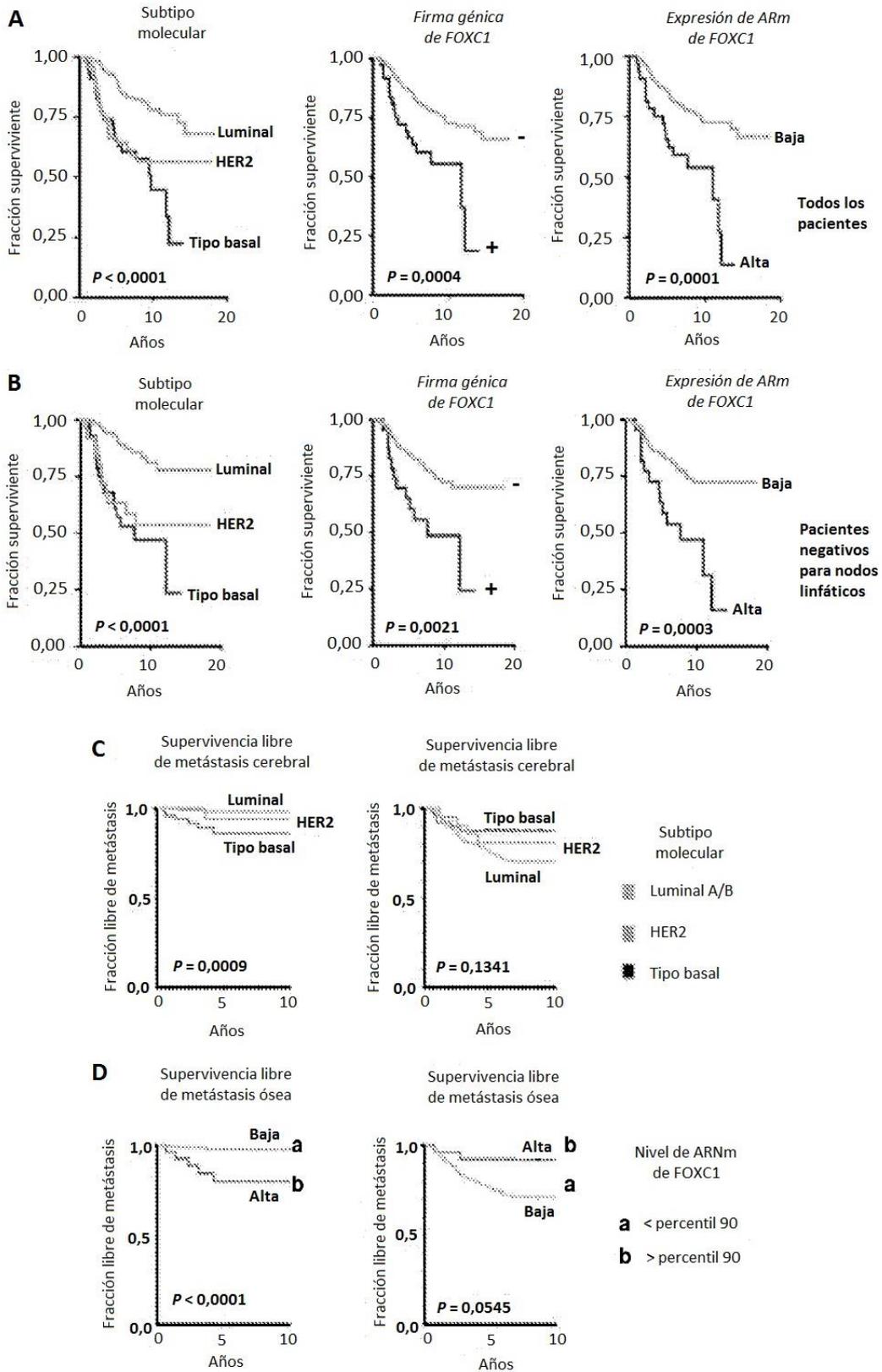


Fig. 8

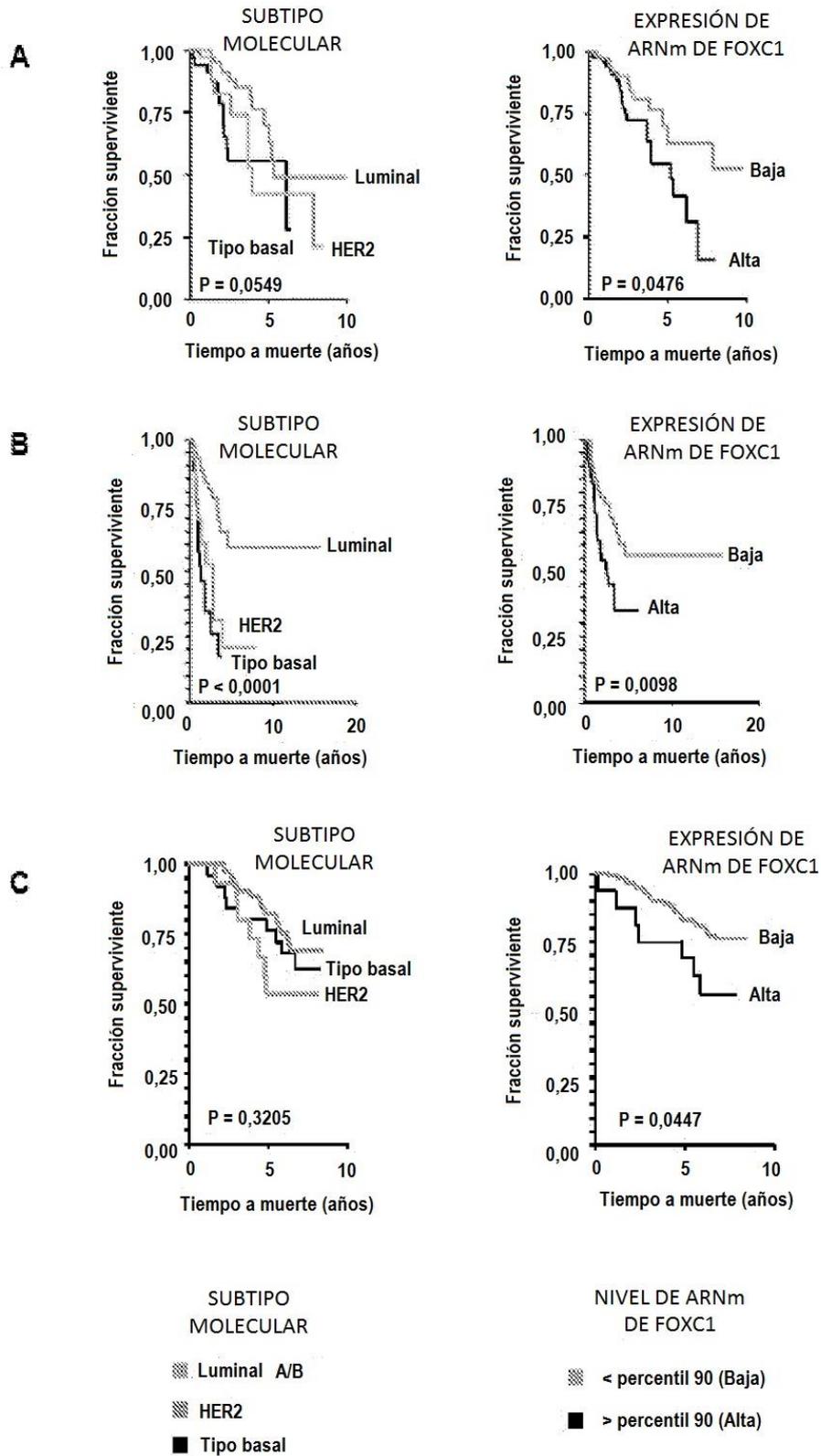


Fig. 9

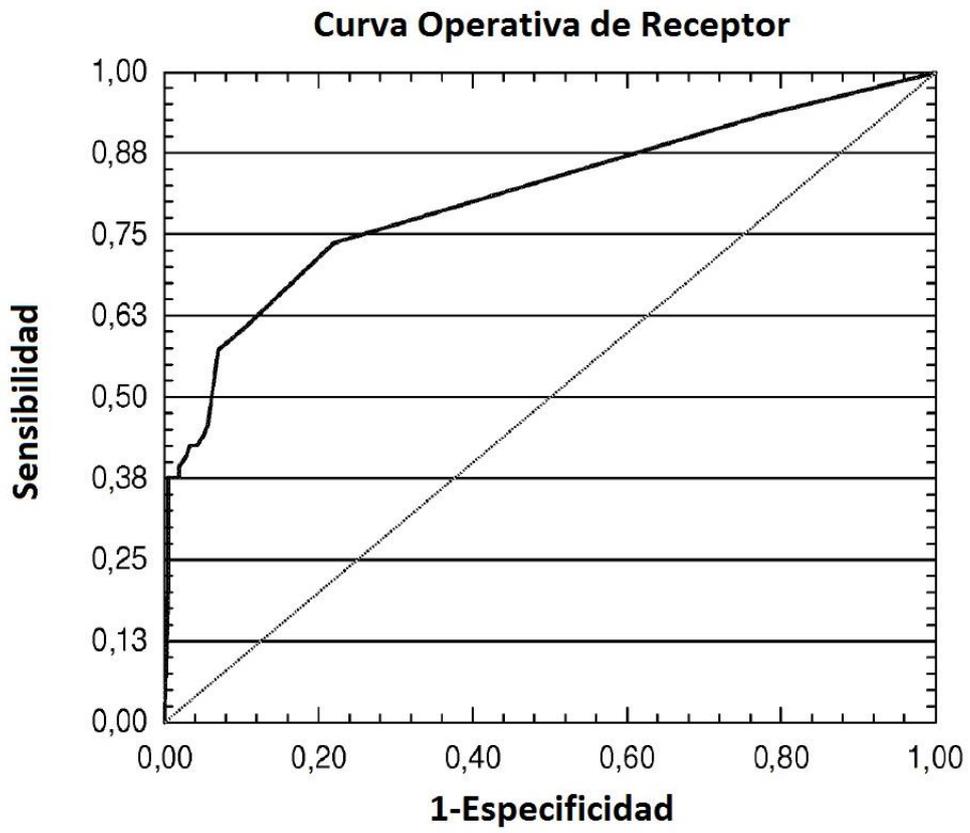


Fig. 10

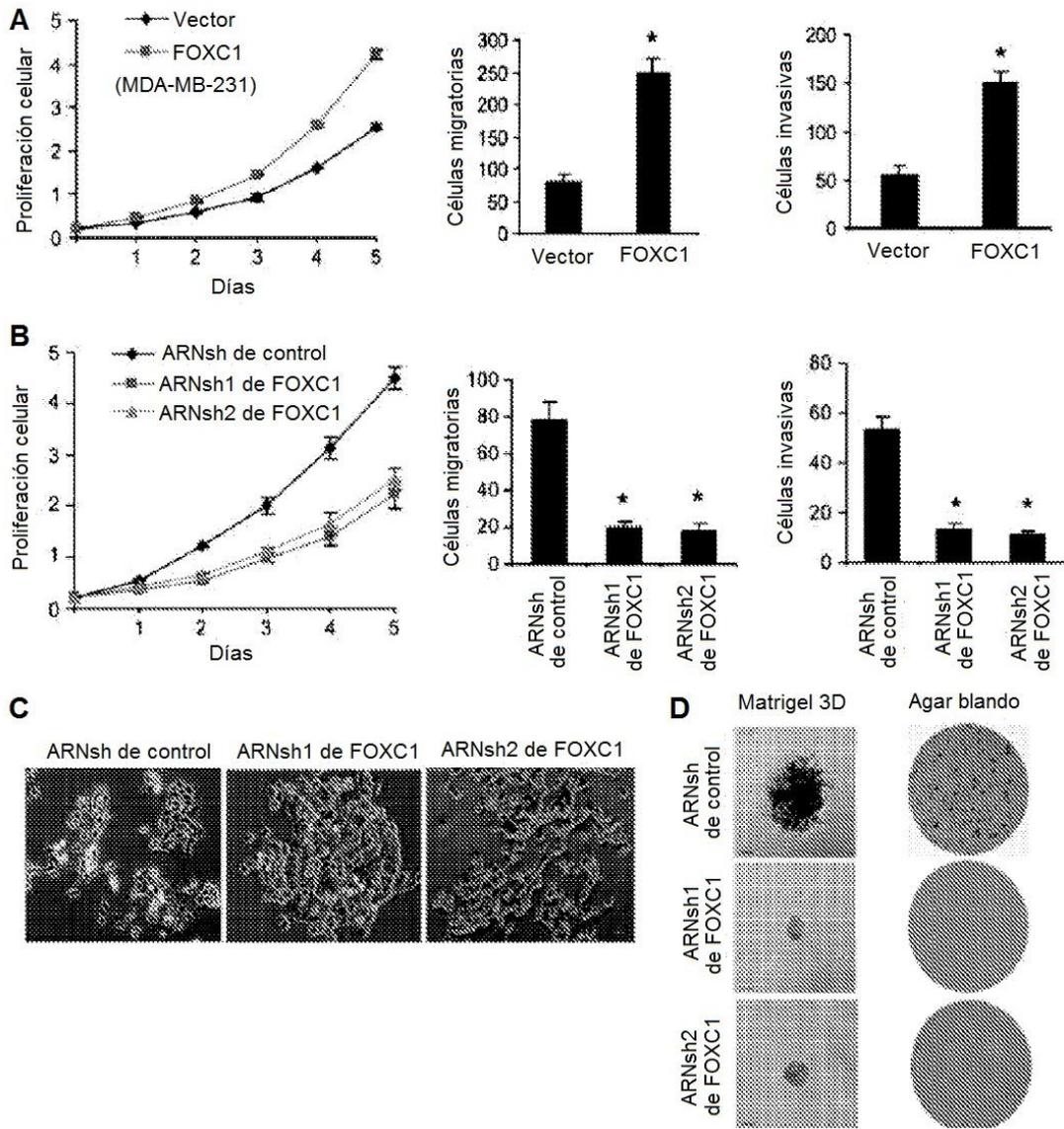


Fig. 11

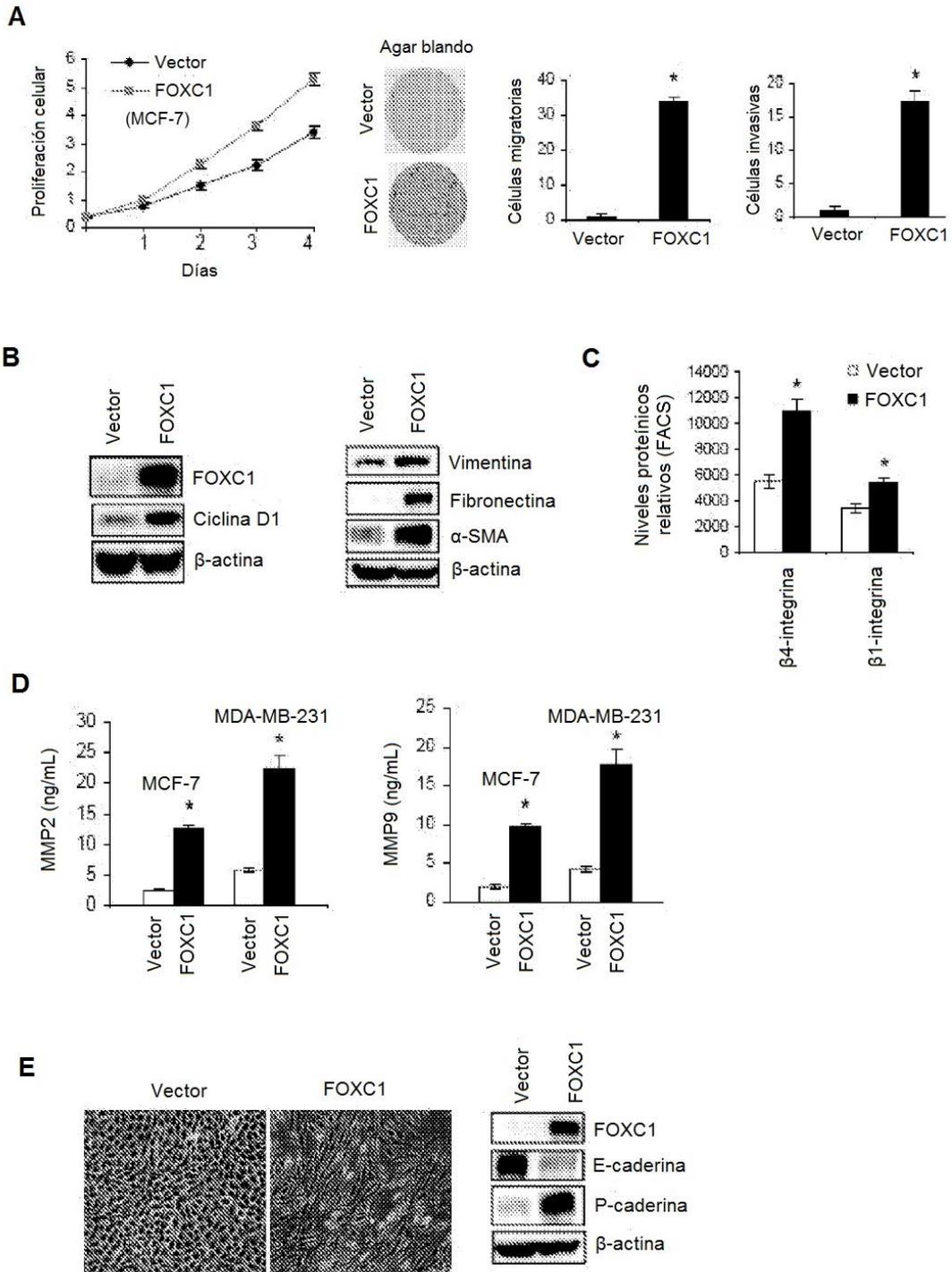


Fig. 12

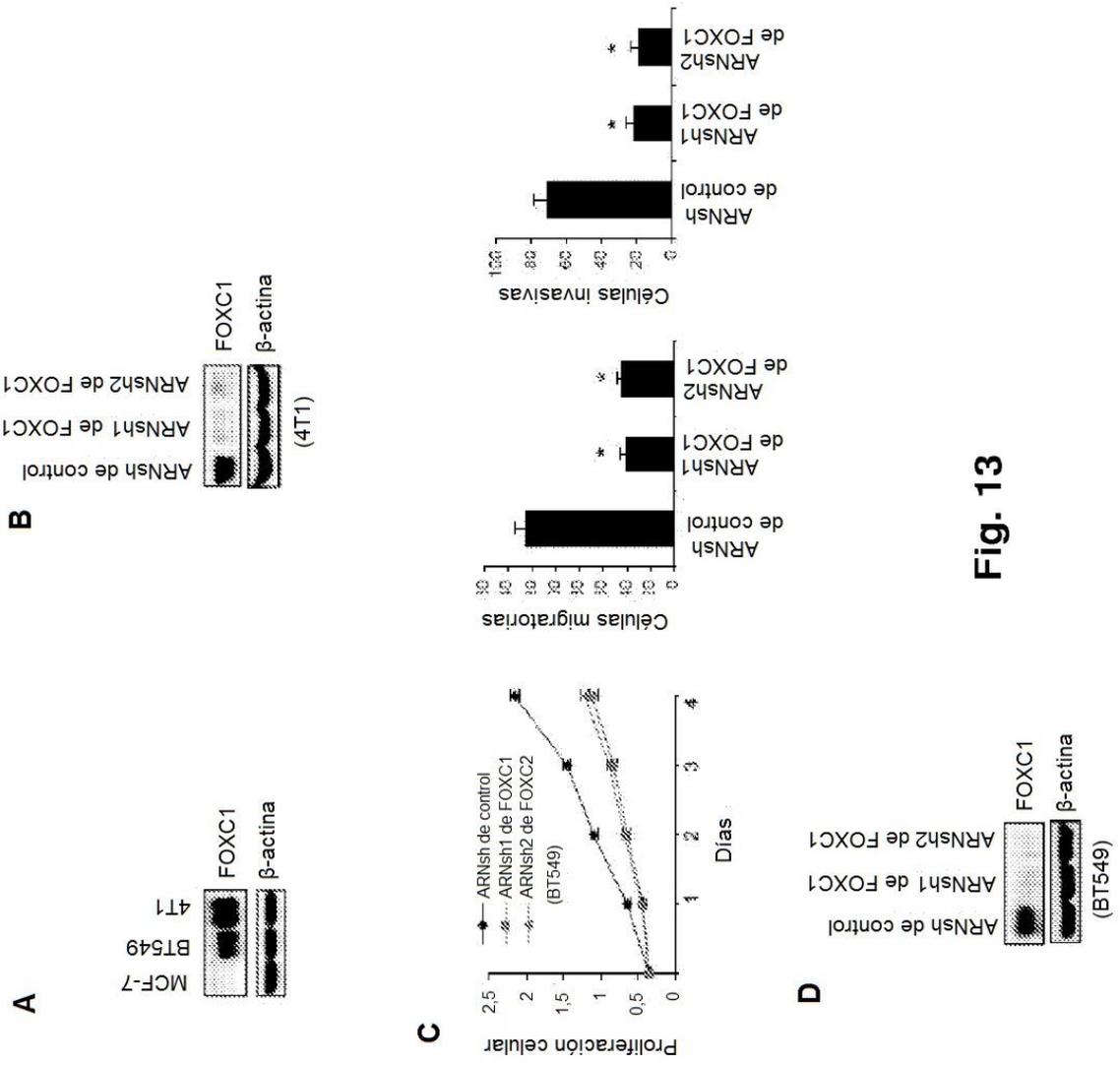


Fig. 13

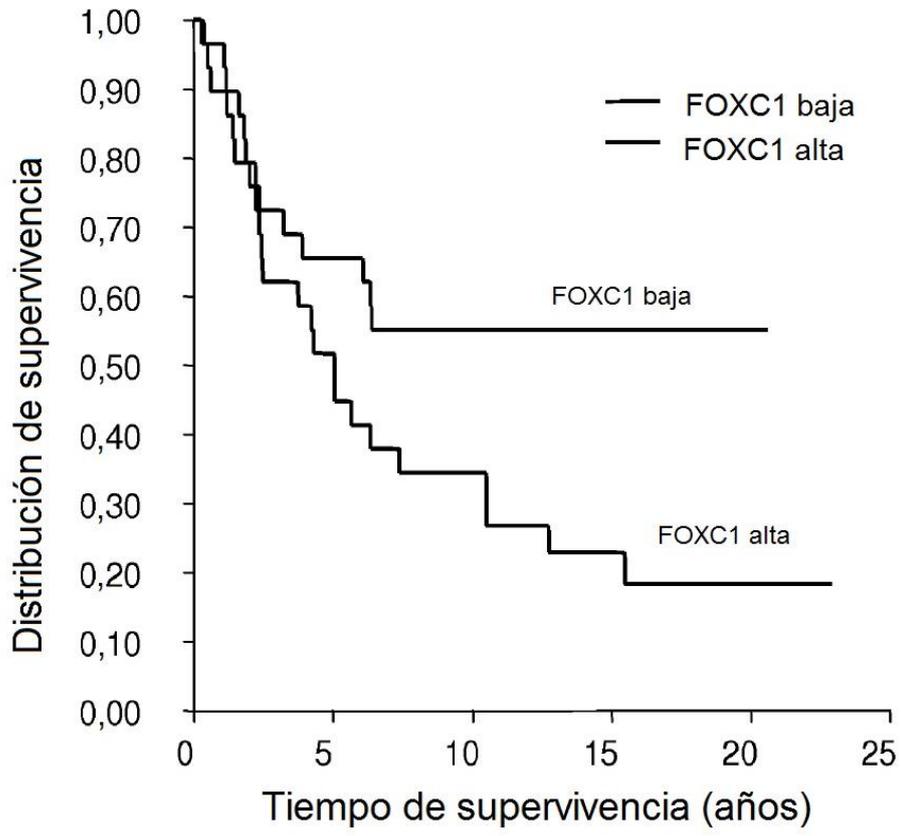


Fig. 14

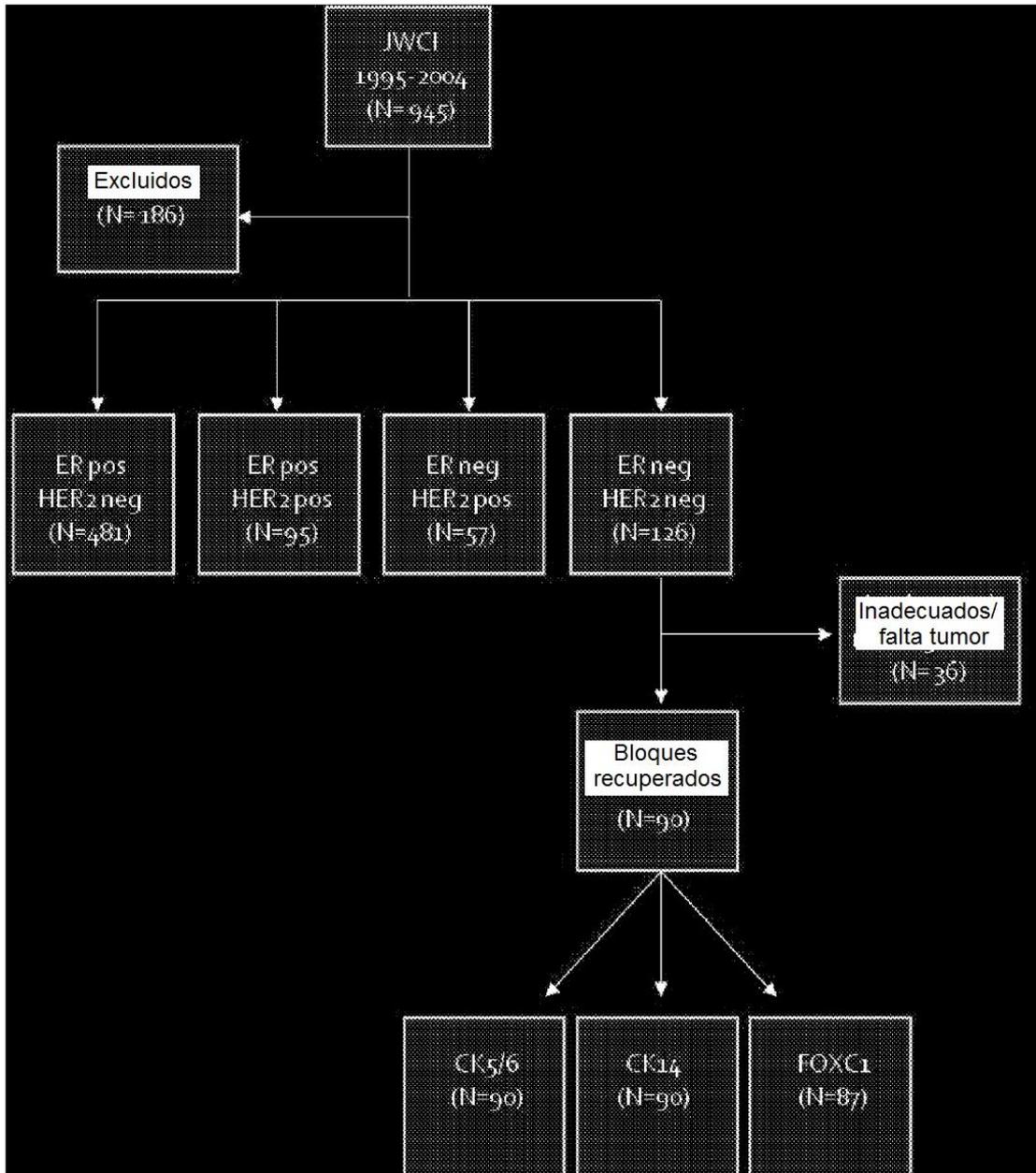


Fig. 15

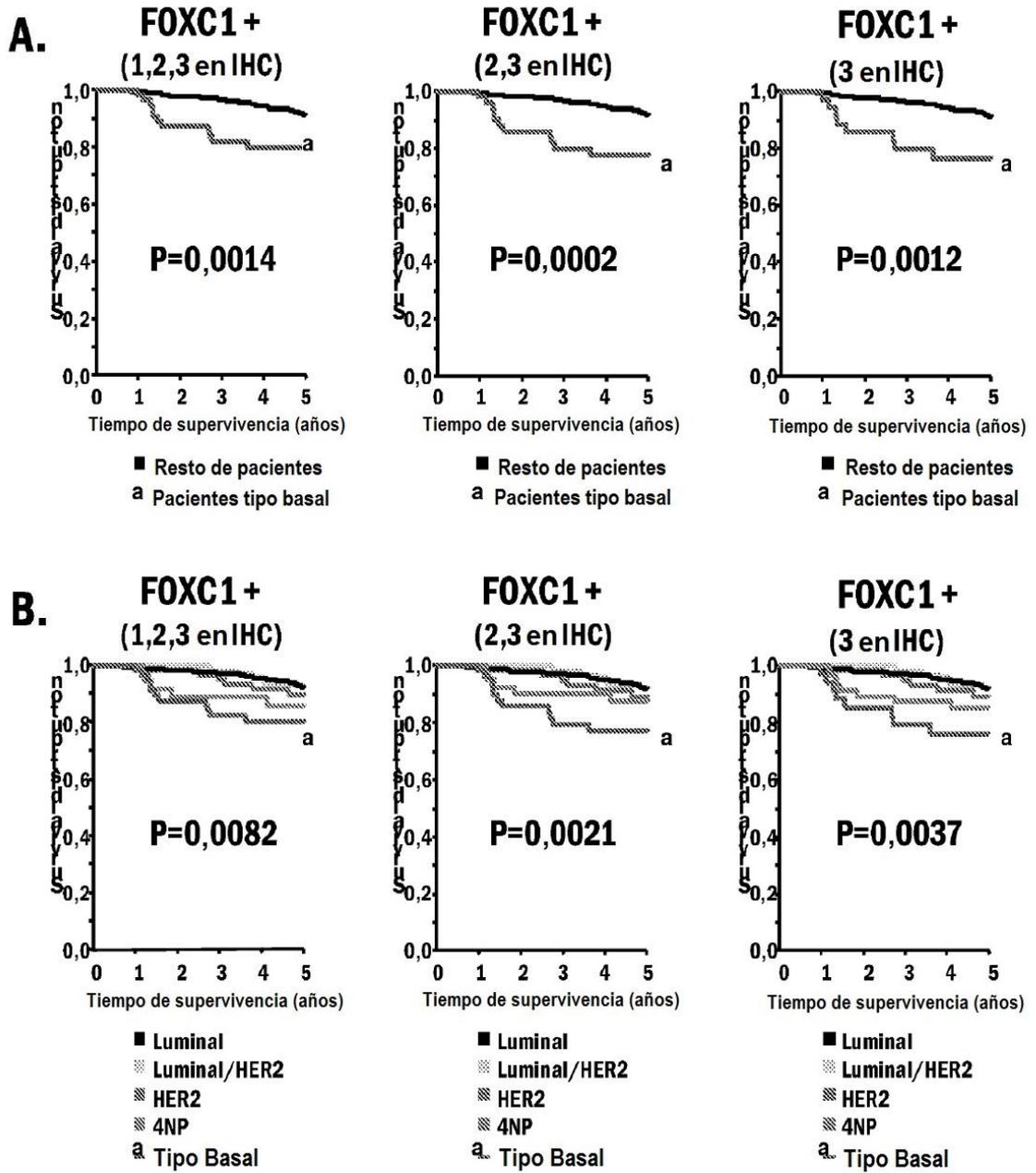


Fig. 16

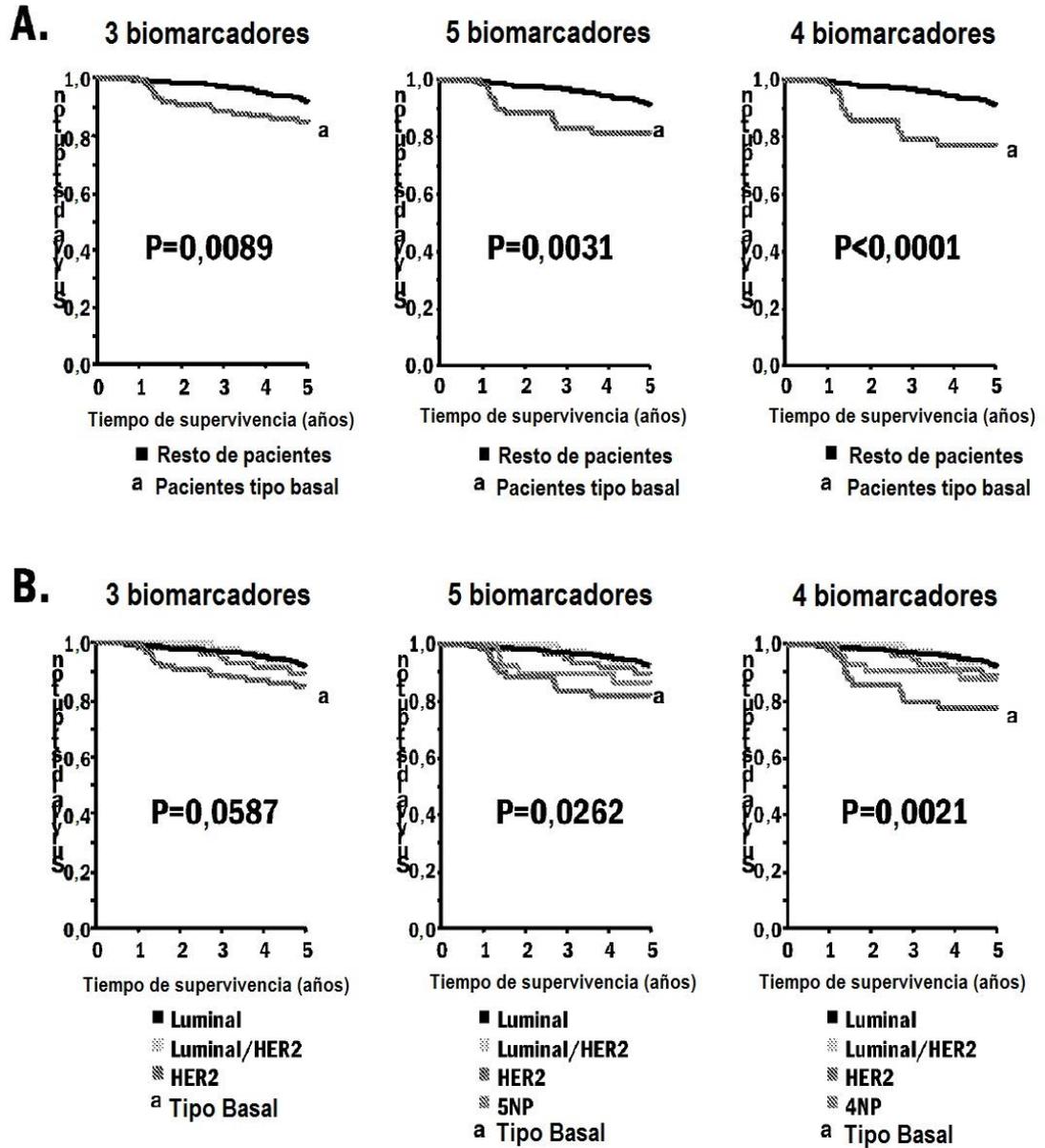


Fig. 17

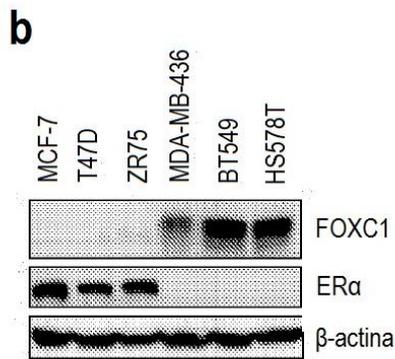
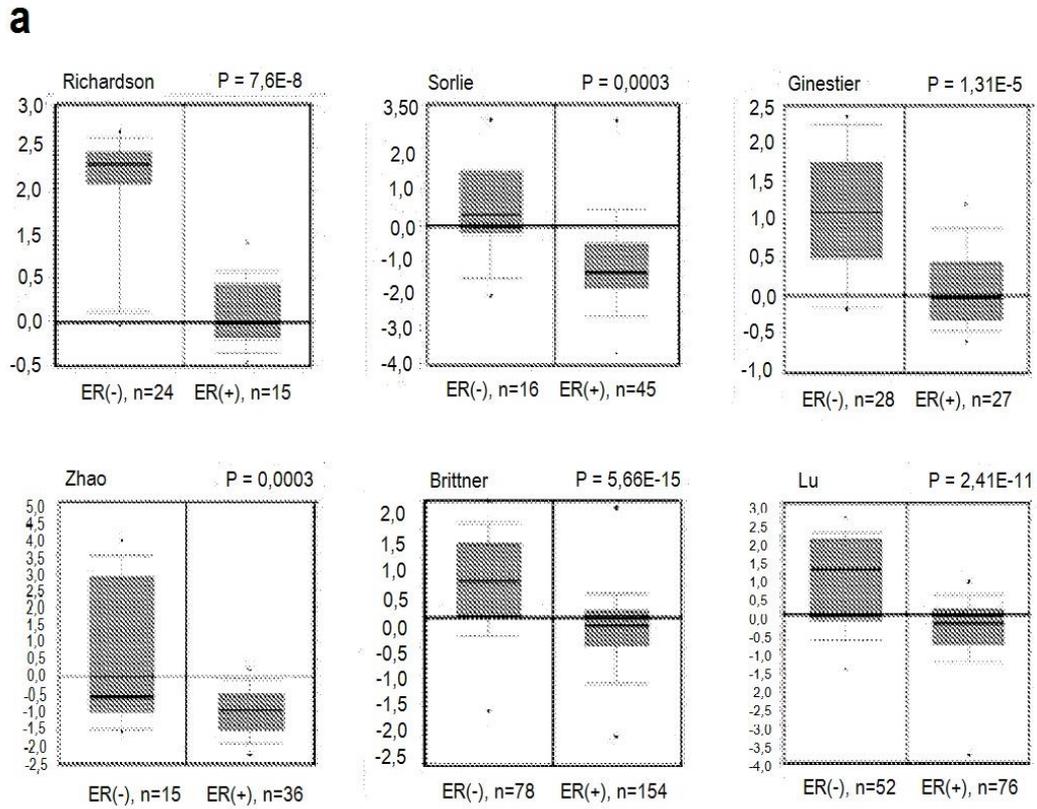


Fig. 18

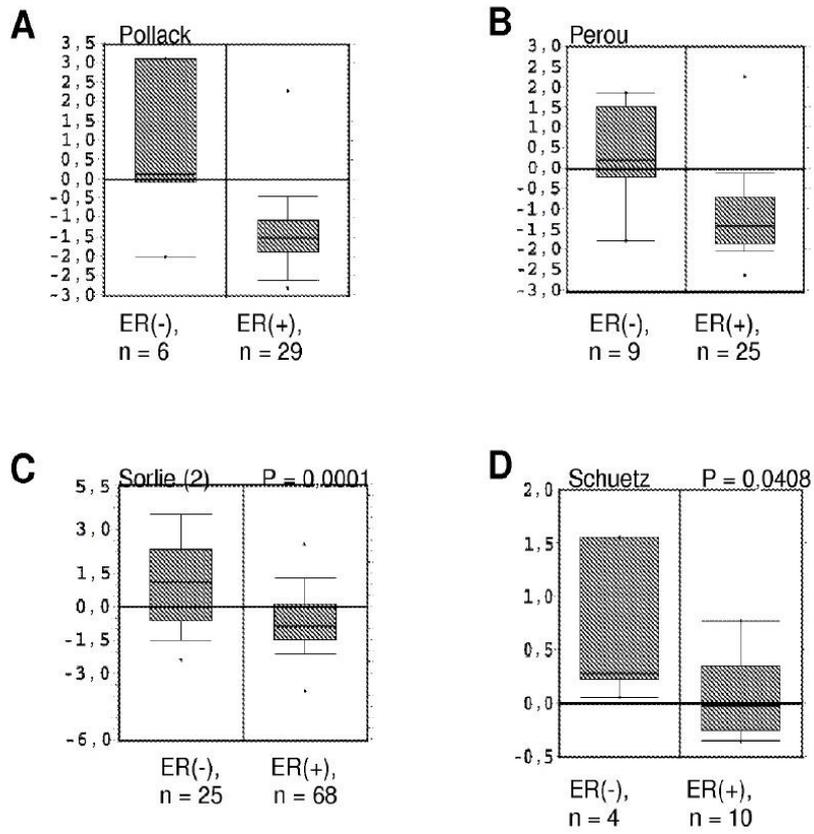


Fig. 19

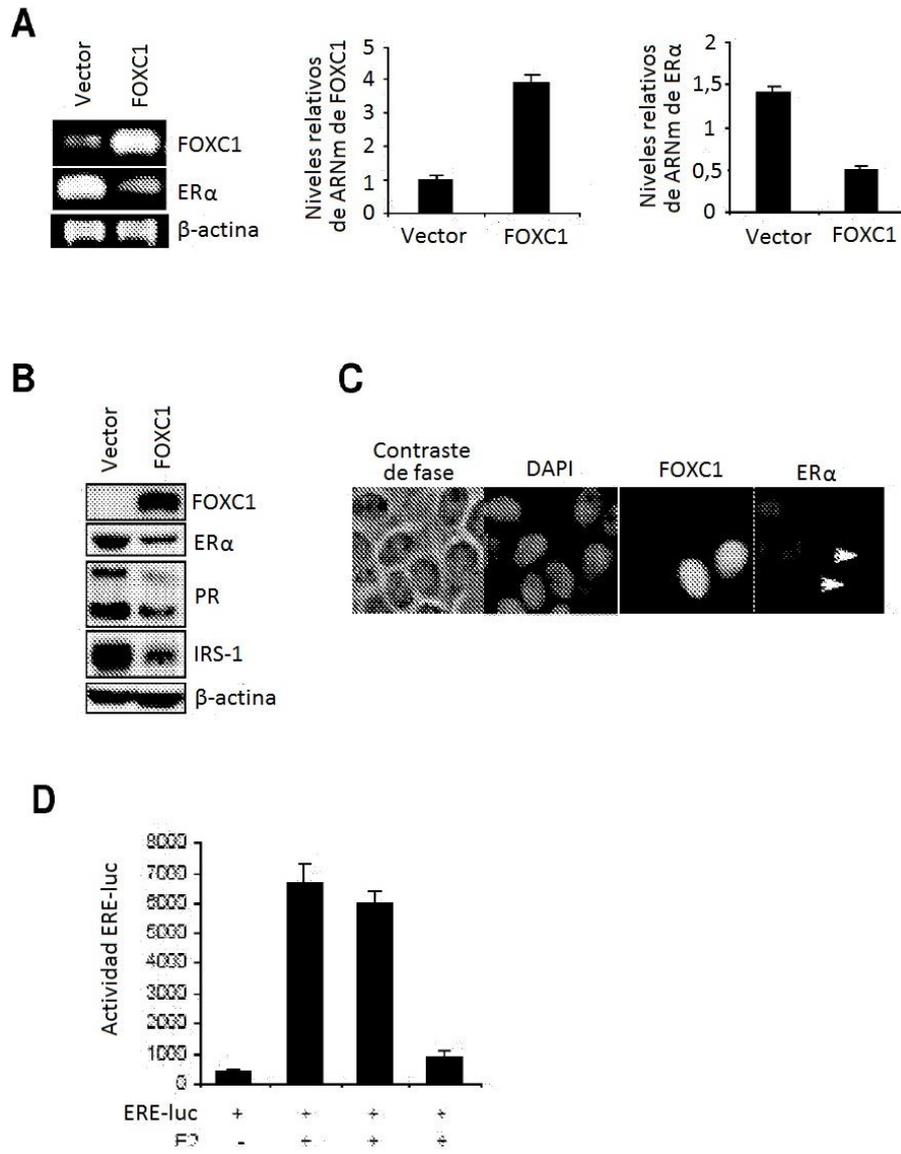


Fig. 20

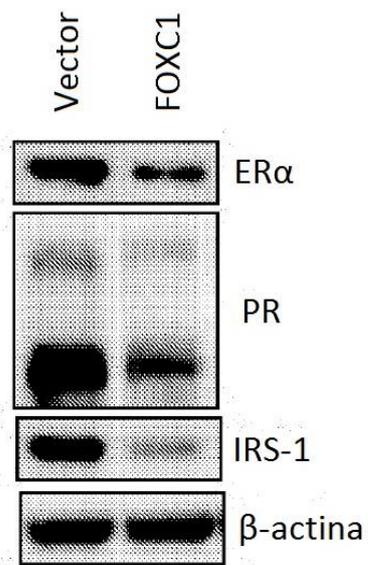


Fig. 21

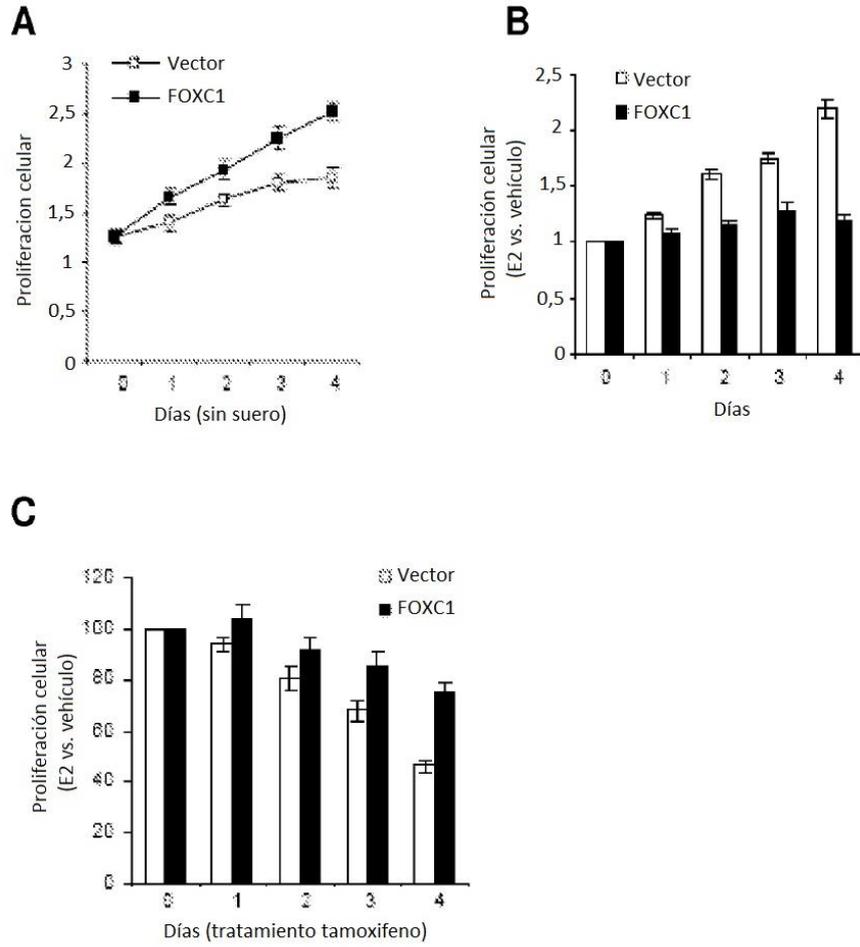


Fig. 22

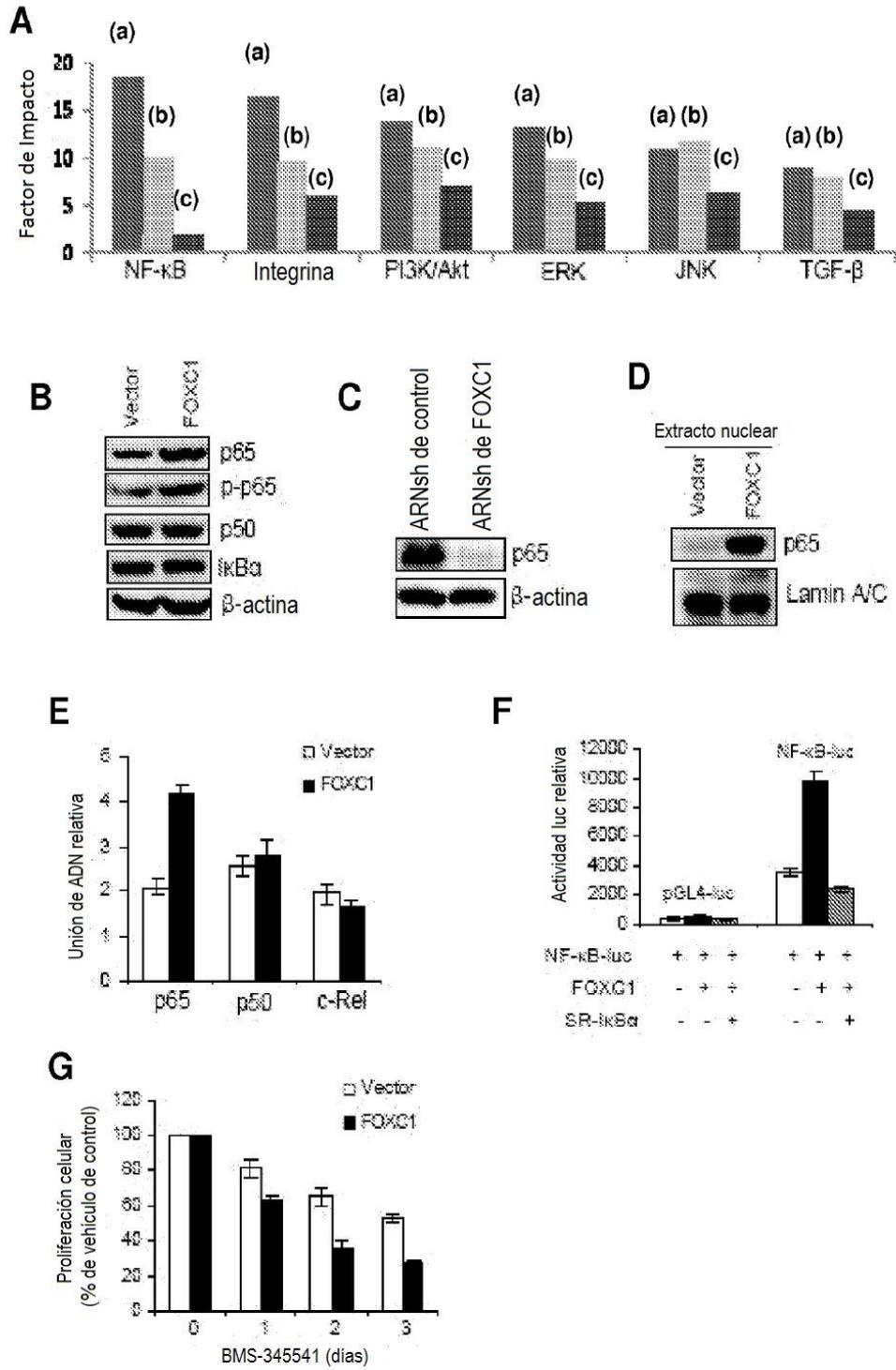


Fig. 23

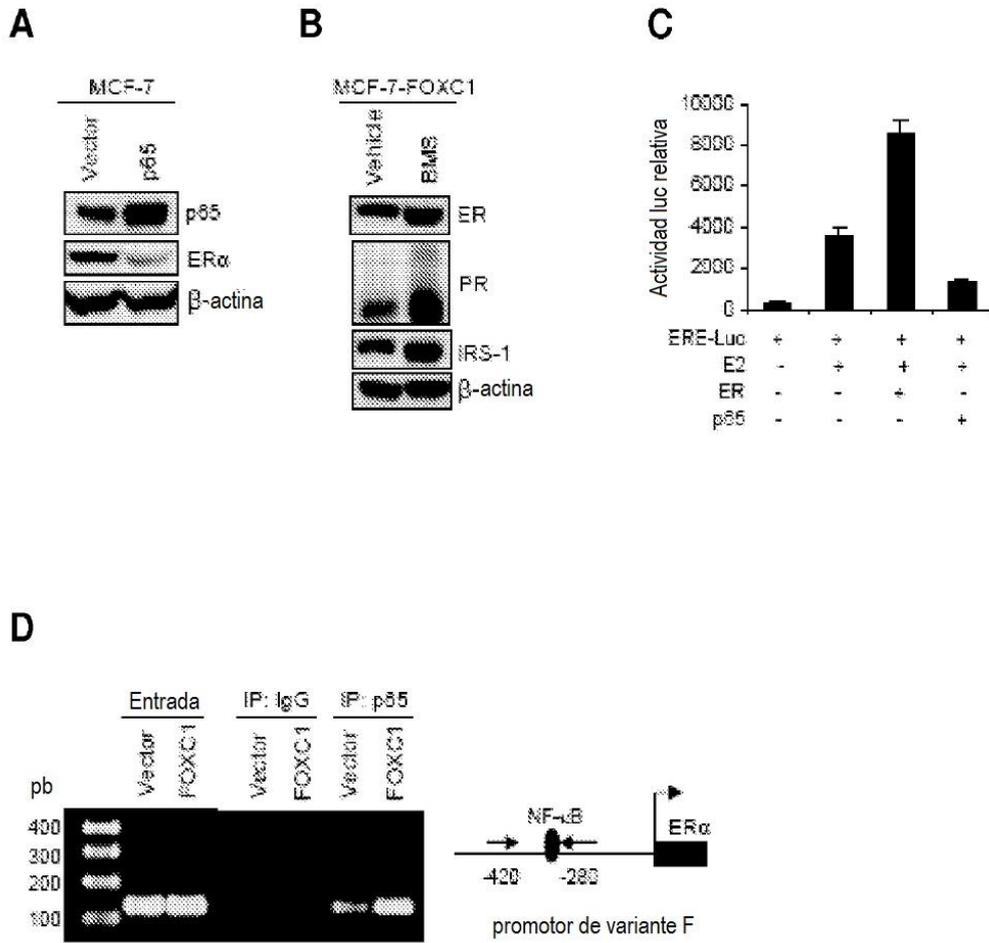


Fig. 24

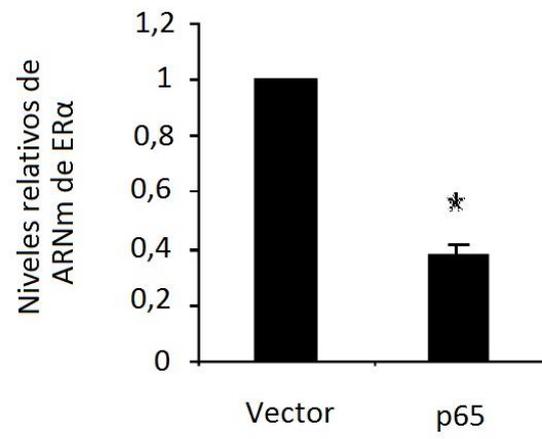


Fig. 25

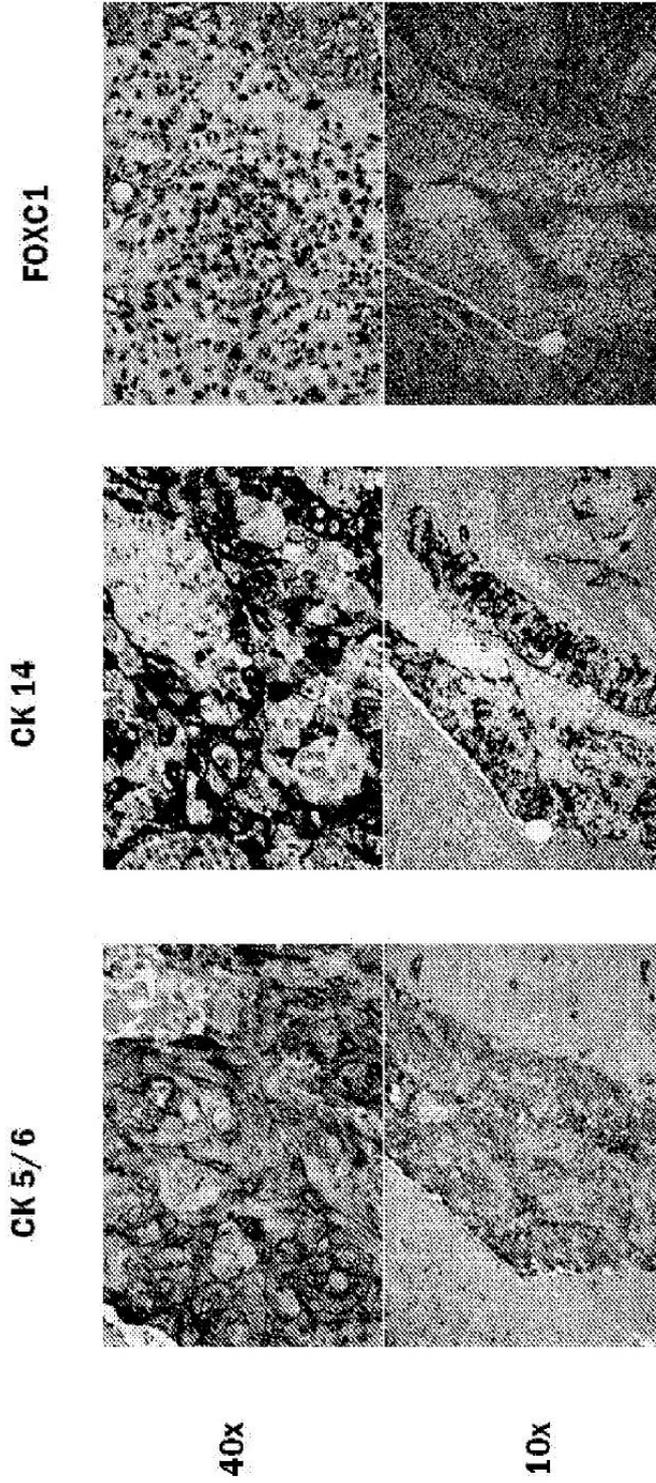


Fig. 26