



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Expresión génica de HHLA2 y TMIGD2 en Cáncer de  
Mama: Correlación con características Clínicopatológicas y  
Valor Pronóstico

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Llopis Gomez, Aitana

Tutor/a: Sirera Pérez, Rafael

Cotutor/a externo: Montoyo Pujol, Yoel Genaro

Director/a Experimental: Peiró Cabrera, Gloria

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## EXPRESIÓN GÉNICA DE *HHLA2* Y *TMIGD2* EN CÁNCER DE MAMA: CORRELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS Y VALOR PRONÓSTICO

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: AITANA LLOPIS GÓMEZ

TUTOR: RAFAEL SIRERA PÉREZ

TUTOR EXTERNO: YOEL GENARO MONTOYO PUJOL  
DIRECTORA EXPERIMENTAL: GLORIA PEIRÓ CABRERA

*Curso Académico: 2023-2024*

**VALENCIA, 4 de septiembre de 2024**



## Expresión génica de *HHLA2* y *TMIGD2* en Cáncer de Mama: Correlación con características Clínicopatológicas y Valor Pronóstico

### Resumen:

HHLA2 es una proteína transmembrana de tipo I perteneciente a la familia de proteínas B7 que desempeña un papel crucial en la regulación de las funciones de los linfocitos T. Mediante la interacción con el receptor TMIGD2 favorece la co-estimulación de estas células permitiendo su activación, proliferación y producción de citoquinas. A pesar de su relevancia en el sistema inmunológico, hay una falta de datos significativos sobre su implicación en el cáncer de mama (CM). Por lo tanto, se propuso investigar la expresión génica relativa de *HHLA2* y *TMIGD2* en una serie clínica de pacientes con CM y su asociación con factores clínico-patológicos y el pronóstico de las pacientes.

El estudio incluyó un total de 151 pacientes diagnosticadas de CM infiltrante en el Hospital General Universitario Dr. Balmis de Alicante entre los años 1994 y 2021, con un seguimiento clínico de al menos 1 año. El material biológico utilizado consistió en secciones y cilindros representativos de tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. Estos tumores fueron previamente clasificados inmunohistoquímicamente en los diferentes fenotipos: Luminal A, Luminal B/HER2-, Luminal B/HER2+, HER2-enriquecido y Triple-negativo/*Basal-like*. A partir del tejido tumoral se extrajo el ARN total, se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) y la expresión génica se cuantificó mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) empleando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para la normalización de los datos. Como muestras calibratoras se usó tejido mamario sano y como genes endógenos de referencia *PUM1* y *ACTB*. Los resultados se correlacionaron con una serie de factores clínico-patológicos, así como con la supervivencia global (SG) y la libre de enfermedad (SLE) de las pacientes.

Tras analizar los resultados, se observó que *HHLA2* se sobreexpresó en el fenotipo Luminal A, mientras que *TMIGD2* en el Luminal B/HER2+, pero sólo como tendencia. Además, *HHLA2* y *TMIGD2* se asociaron con tumores  $\leq 20$  mm y la ausencia de necrosis, respectivamente. En cuanto al valor pronóstico, la sobreexpresión de *TMIGD2* se correlacionó con una mayor SLE.

Como conclusión, nuestros datos apoyan que ambos genes están asociados a características clínico-patológicas favorables, siendo *TMIGD2* un potencial biomarcador de buen pronóstico para la SLE en pacientes con CM.

**Palabras clave:** “HHLA2”; “TMIGD2”; “cáncer de mama”; “puntos de control inmunitario”; “Clínico-patológico”; “Pronóstico”

## Gene Expression of *HHLA2* and *TMIGD2* in Breast Carcinoma: Correlation with Clinicopathological Features and Prognostic Value

### Abstract:

*HHLA2* is a type I transmembrane protein belonging to the B7 protein family that plays a crucial role in regulating T lymphocyte functions. Interaction with the *TMIGD2* receptor promotes the co-stimulation of these cells, allowing their activation, proliferation, and cytokine production. Despite its relevance in the immune system, there is a lack of significant data on its involvement in breast carcinoma (BC). Therefore, investigating the relative gene expression of *HHLA2* and *TMIGD2* was proposed in a clinical series of BC patients and their association with clinicopathological factors and patient survival.

The study included a total of 151 patients diagnosed with invasive BC at the Dr. Balmis University General Hospital in Alicante between 1994 and 2021, with at least one year of clinical follow-up. The biological material used consisted of sections and representative cylinders of tumor tissue fixed in formalin and embedded in paraffin. These samples were previously classified immunobiologically into different phenotypes: Luminal A, Luminal B/HER2-, Luminal B/HER2+, HER2-enriched, and Triple-negative/Basal-like. Total RNA was extracted from the tumor tissue, reverse transcribed to complementary DNA (cDNA), and gene expression was quantified using real-time PCR (qRT-PCR) employing the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for data normalization. Healthy breast tissue was used as calibrator samples, and *PUM1* and *ACTB* were used as endogenous reference genes. The results were correlated with a series of clinicopathological factors as well as overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) of the patients.

Upon analyzing the results, it was observed that *HHLA2* was overexpressed in the Luminal A phenotype, while *TMIGD2* in Luminal B/HER2+, but only as a trend. Additionally, *HHLA2* and *TMIGD2* were associated with tumors  $\leq 20$  mm and the absence of necrosis, respectively. Regarding prognostic value, *TMIGD2* overexpression correlated with increased DFS.

In conclusion, our data support that both genes are associated with favorable clinicopathological features, with *TMIGD2* being a potential prognostic biomarker for favorable DFS in BC patients.

**Key words:** "HHLA2"; "TMIGD2"; "breast cancer"; "Immune checkpoints"; "Clinicopathological"; "Prognosis"

## Expressió gènica de *HHLA2* i *TMIGD2* en Carcinoma de Mama: Correlació amb característiques Clínico-patològiques i Valor Pronòstic

### Resum:

*HHLA2* és una proteïna transmembrana de tipus I pertanyent a la família de proteïnes B7 que exercix un paper crucial en la regulació de les funcions dels limfòcits T. Mitjançant la interacció amb el receptor *TMIGD2* afavorix la coestimulació d'estes cèl·lules permetent la seua activació, proliferació i producció de citoquines. Malgrat la seua rellevància en el sistema immunològic, hi ha una manca de dades significatives sobre la seua implicació en el càncer de mama (CM). Per tant, es proposà investigar l'expressió gènica relativa d'*HHLA2* i *TMIGD2* en una sèrie clínica de pacients amb CM i la seua associació amb factors clinicopatològics i el pronòstic de les pacients.

L'estudi inclogué un total de 151 pacients diagnosticades de CM infiltrant a l'Hospital General Universitari Dr. Balmis d'Alacant entre els anys 1994 i 2021 i amb un seguiment clínic d'almenys 1 any. El material biològic utilitzat consistí en seccions i cilindres representatius de teixit tumoral fixat en formol i inclòs en parafina. Estes mostres foren prèviament classificades immunohistoquímicament en els diferents fenotips: Luminal A, Luminal B/HER2-, Luminal B/HER2+, HER2-enriquit i Triple-negatiu/*Basal-like*. A partir del teixit tumoral s'extragué l'ARN total, es retrotranscriví a ADN complementari (ADNc) i l'expressió gènica es va quantificar mitjançant PCR en temps real (qRT-PCR) emprant el mètode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  per a la normalització de les dades. Com a mostres calibradores es va usar teixit mamari sa i com a gens endògens de referència *PUM1* i *ACTB*. Els resultats es van correlacionar amb una sèrie de factors clinicopatològics, així com amb la supervivència global (SG) i lliure de malaltia (SLM) de les pacients.

Després d'analitzar els resultats, s'observà que *HHLA2* se sobreexpressà en el fenotip Luminal A, mentre que *TMIGD2* en el Luminal B/HER2+, però només com a tendència. A més, *HHLA2* i *TMIGD2* s'associaren amb tumors  $\leq 20$  mm i l'absència de necrosi, respectivament. Quant al valor pronòstic, la sobreexpressió de *TMIGD2* es correlacionà amb una major SLM.

Com a conclusió, les nostres dades recolzen que tots dos gens estan associats a característiques clinicopatològiques favorables, sent *TMIGD2* un potencial biomarcador de pronòstic positiu per a la SLE en pacients amb CM.

**Paraules clau:** "*HHLA2*"; "*TMIGD2*"; "càncer de mama"; "punts de control immunitari";

"Clínico-patològic"; "Pronòstic"

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Yoel Genaro Montoyo Pujol, por su imprescindible guía, su apoyo continuo y su paciencia a lo largo de este proyecto. Su dedicación ha sido esencial para que este trabajo llegara a buen término. Asimismo, quiero mostrar mi agradecimiento a la Dra. Gloria Peiró Cabrera, cuya experiencia y valiosos consejos han sido pilares fundamentales en el desarrollo de esta investigación. También extendo mi gratitud al profesor Rafael Sirera Pérez, por su orientación y apoyo que han sido clave durante todo este proceso.

A mi familia y amigos les dedico un agradecimiento especial por nunca haber dejado de creer en mí. En particular, a Elena y Adrián, quienes han sido mi refugio seguro durante todo el proceso. Sin su respaldo emocional y logístico, este logro no hubiera sido posible.

Finalmente, quiero reconocer a todas las personas que, directa o indirectamente, han contribuido al éxito de este trabajo, y a las pacientes que han participado en los estudios, cuya valentía y generosidad inspiran continuamente a la comunidad científica en la lucha contra el cáncer de mama.

## ÍNDICE

<b>1. ESTADO DE LA CUESTIÓN. Cáncer: aproximación a la enfermedad</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Cáncer de mama</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 Epidemiología del cáncer de mama .....	5
1.1.2 Factores de riesgo .....	5
1.1.3 Clasificación histológica del cáncer de mama .....	7
1.1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama .....	10
1.1.5 Diagnóstico .....	12
1.1.6 Tratamiento .....	13
<b>1.2 Sistema inmunitario</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Relación entre el sistema inmunitario y el cáncer</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Teoría de la inmunovigilancia .....	16
1.3.2 Teoría de la Inmunoedición .....	17
1.3.3 Puntos de control inmunológico .....	17
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>22</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Hipótesis .....	24
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>25</b>
4.1 Diseño del estudio .....	25
4.2 Número de sujetos .....	25
4.2.1 Criterios de inclusión .....	25
4.2.2 Criterios de exclusión .....	26
4.2.3 Variables de estudio .....	26
4.3 Aislamiento de ARN .....	27
4.4 Cuantificación y control de calidad del ARN .....	27
4.5 Reacción de retrotranscripción .....	28
4.6 Reacción de amplificación a tiempo real (qPCR) .....	28
4.7 Análisis estadístico .....	30
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas .....	32
5.2 Análisis descriptivo de las variables moleculares .....	34
5.2.1 Datos de expresión génica relativa. ....	34
5.2.2 Datos de expresión génica según fenotipo .....	34
5.3 Correlación entre variables clínico-patológicas y moleculares .....	36
5.3.1 Asociación entre <i>HHLA2</i> y variables clínico-patológicas .....	36
5.3.2 Asociación entre <i>TMIGD2</i> y variables clínico-patológicas .....	37
5.4 Análisis de supervivencia .....	39
5.4.1 Análisis univariante .....	39
5.4.2 Análisis multivariante .....	45
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>

<b>7. FORTALEZAS Y LIMITACIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>57</b>
<b>10.1 Informe del comité de ética del departamento de Salud de Alicante – Hospital General Universitario Dr. Balmis .....</b>	<b>57</b>
<b>10.2 Presentación del trabajo al congreso 36th European Congress of Pathology.....</b>	<b>58</b>
<b>10.3 Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030 ..</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE FIGURAS

<i>Figura 1. Adaptación ilustrada de las características del cáncer.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 2. Progresión multietapa de la carcinogénesis.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Teorías sobre las hipótesis del origen y desarrollo del CM.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 4. Anatomía de la mama femenina.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 5. Clasificación histológica del cáncer de mama.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 6. Esquema representativo de las fases de la teoría de la inmunoección .....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 7. Esquema de los mecanismos moleculares de acción de CTLA-4 y PD-1.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8. Secuencia aminoacídica del ligando HHLA2 .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 9. Secuencia aminoacídica de TMIGD2 .....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 10. Vía de señalización de KIR2DL3 .....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 11. Mecanismo de una sonda TaqMan .....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 12. Gráficas de Kaplan-Meyer para la SG en función de las variables clinicopatológicas. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. Gráficas de Kaplan-Meyer para la SLE en función de las variables clinicopatológicas .....</i>	<i>44</i>

## ÍNDICE TABLAS

<i>Tabla 1. Procesos que interfieren en la progresión tumoral .....</i>	<i>2</i>
<i>Tabla 2. Ensayos TaqMan .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 3. Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas .....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Análisis descriptivo de los valores de expresión génica relativa. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 5. Expresión génica relativa de TMIGD2 y HHLA2 .....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 6. Análisis de la expresión génica relativa según los diferentes fenotipos de CM.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 7. Resultados de la regresión logística binaria.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 8. Análisis de la asociación entre los valores de expresión génica de HHLA2 y cada una de las variables clinicopatológicas. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 9. Análisis de la asociación entre los valores de expresión génica de TMIGD2 y las variables clinicopatológicas .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 10. Análisis de la asociación entre la SG y las variables clinicopatológicas. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 11. Asociación entre los datos de expresión génica relativa con la SG .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 12. Análisis de la asociación SLE y cada una de las variables clinicopatológicas .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 13. Asociación entre los datos de expresión génica relativa con la SG .....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 14. Asociación las variables con un <math>p \leq 0.100</math> en el análisis univariante con la SG .....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 15. Asociación las variables con un <math>p \leq 0.100</math> en el análisis univariante con la SLE .....</i>	<i>46</i>

## ABREVIATURAS

**ADP:** Adenosín difosfato  
**BAG:** Biopsia con aguja gruesa  
**BIRADS:** Sistema de informes y datos de imágenes de mama  
**BRCA1/2:** Genes de predisposición al cáncer de mama y ovario  
**CAR:** Receptor de antígeno quimérico  
**CLIS:** Carcinoma lobulillar *in situ*  
**CM:** Cáncer de mama  
**CMT:** Células madre tumorales  
**CMTN:** Carcinoma de mama triple negativo  
**CPA:** Célula presentadora de antígeno  
**CTLA-4:** Antígeno 4 asociado a células T citotóxicas  
**DCT:** Ciclo de umbral de detección  
**GCO:** Observatorio Global de Cáncer (del inglés *Global Cancer Observatory*)  
**HER2:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2).  
**HHLA2:** Ligando 2 de antígeno humano  
**HGUDrB:** Hospital General Universitario Dr. Balmis de Alicante  
**HR:** Hazard Ratio  
**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (del inglés *International Agency for Research on Cancer*)  
**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma  
**Ki67:** Marcador de proliferación celular  
**KIR3DL3:** Receptor Killer Immunoglobulin-like receptor 3DL3  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad  
**NK:** Células asesinas naturales  
**NPX267:** Anticuerpo monoclonal bloqueador de KIR3DL3  
**PAAF:** Punción aspiración con aguja fina  
**PARP:** Poli (ADP-ribosa) polimerasa  
**PD-1:** Receptor 1 de muerte programada  
**PD-L1:** Ligando 1 de muerte programada  
**PD-L2:** Ligando 2 de muerte programada  
**PET-TAC:** Tomografía por emisión de positrones combinada con tomografía axial computarizada  
**PET:** Tomografía por emisión de positrones  
**PMM:** Patrones moleculares de agentes microbianos  
**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa  
**QT:** Quimioterapia  
**RE:** Receptores de estrógeno  
**RPg:** Receptores de progesterona  
**RT:** Radioterapia  
**SASP:** Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (del inglés *Senescence-Associated Secretary Phenotype*)  
**SEOM:** Sociedad Española de Oncología Médica  
**SG:** Supervivencia global  
**SI:** Sistema inmunitario  
**SIA:** Sistema inmunitario adaptativo  
**SII:** Sistema inmunitario innato  
**SLE:** Supervivencia libre de enfermedad  
**TAC:** Tomografía axial computarizada  
**TAMs -** Macrófagos Asociados a Tumores (del inglés *Tumor-Associated Macrophages*)  
**TCR:** Receptor de células T  
**TFM:** Trabajo de Fin de Máster  
**TILs:** Linfocitos infiltrantes en tumor  
**TMIGD2:** Receptor transmembrana de inmunoglobulina G con dominio de inmunoglobulinaD2



## 1. ESTADO DE LA CUESTIÓN. Cáncer: aproximación a la enfermedad

Según el Instituto Nacional del Cáncer, el término cáncer se puede definir como un conjunto de afecciones caracterizadas por la presencia de células anómalas, denominadas cancerígenas, que experimentan una proliferación descontrolada e invaden los tejidos circundantes.

En un contexto de crecimiento celular normal se mantiene un delicado equilibrio entre las señales que fomentan la proliferación celular y aquellas que la restringen, asegurando así una replicación celular solo cuando es necesario. Este equilibrio puede verse alterado en las células tumorales, donde la proliferación continúa sin restricciones y puede ir acompañada de una pérdida de la diferenciación celular. De este modo, el proceso normal de muerte celular programada (apoptosis) puede dejar de funcionar.

La investigación de esta enfermedad no es un hecho reciente y tampoco aislado, y por ello, se ha tomado la decisión de acotar para este trabajo de fin de máster (TFM) la extensa trayectoria indagatoria a los últimos 25 años. A principios del siglo XXI, Hanahan y Weinberg observaron seis características distintivas de la mayoría de los cánceres: 1) la capacidad de crecimiento autónomo, 2) la evasión de señales inhibitoras de crecimiento, 3) la evasión de la muerte celular por apoptosis, 4) el potencial de replicación ilimitado, 5) la angiogénesis y 6) la invasión y la metástasis. Todas ellas resultan esenciales para la carcinogénesis, es decir, para la formación del tumor. Unos años después, ampliaron su concepto incorporando dos características habilitadoras, como son: la inestabilidad genómica y la inflamación. Éstas son cruciales para adquirir las características anteriormente mencionadas. Al mismo tiempo, destacaron dos características emergentes como son la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmunitario (Hanahan y Weinberg, 2011).

A medida que ha avanzado el conocimiento de los mecanismos del cáncer han surgido otros aspectos de la enfermedad como posibles refinamientos. Recientemente, Douglas Hanahan (Hanahan, 2022) planteó la posibilidad de que la plasticidad fenotípica y la diferenciación interrumpida sean una capacidad distintiva, y que la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos constituyan características habilitadoras que faciliten la adquisición de capacidades fundamentales. Además, presentó a las células senescentes como un conjunto de tipos celulares funcionalmente importantes en el microambiente tumoral.

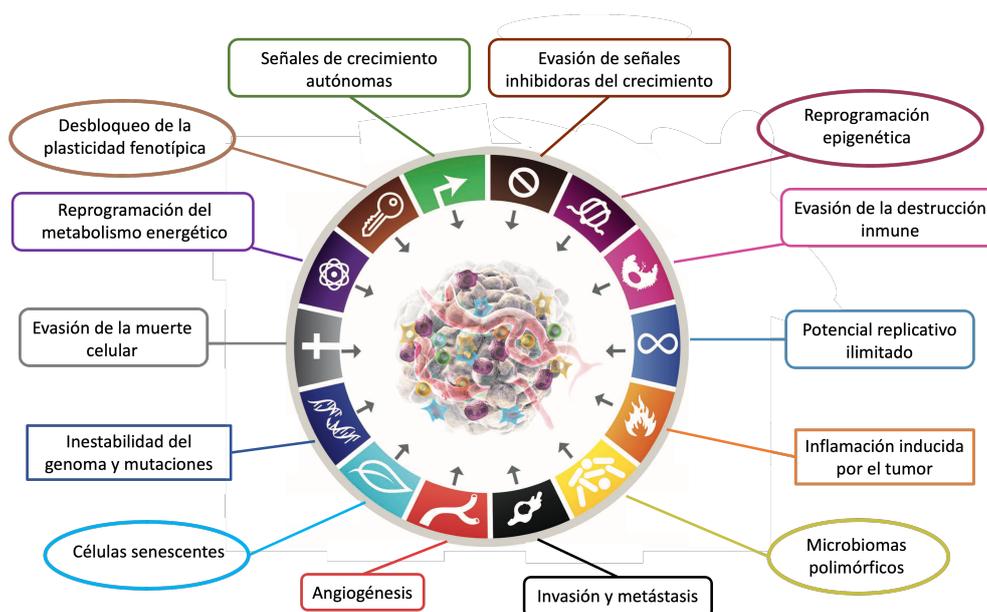


Figura 1. Adaptación ilustrada de las características del cáncer. Modificado de Hanahan (2022).

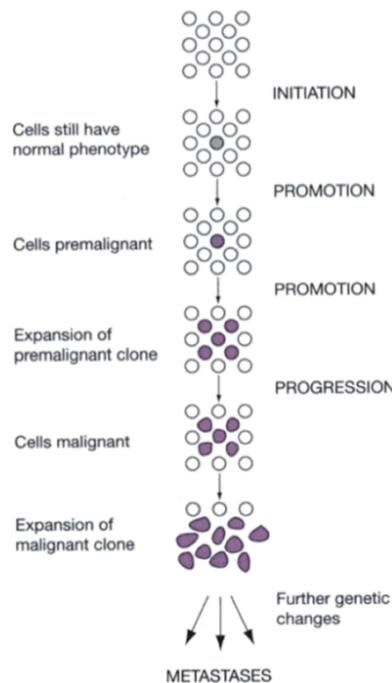
A continuación, la **Tabla 1** presenta la relación de procesos implicados en cada una de las capacidades adquiridas y necesarias para el crecimiento y progresión tumoral.

Autonomía en las señales de crecimiento	Las células tumorales presentan mutaciones que obvian la señalización de los factores de crecimiento.
Evasión de las señales inhibitoras de crecimiento	Acumulan mutaciones que interfieren en las rutas inhibitoras de crecimiento, responsables de mantener la homeostasis de los tejidos y órganos.
Evasión de la apoptosis	Presentan mutaciones en algún regulador clave de la ruta de apoptosis, evadiendo así su activación.
Inestabilidad genómica y mutagénesis	Las células tumorales contienen genomas inestables que acumulan mutaciones y la transmiten a la progenie.
Metabolismo energético desregulado	Las células tumorales reprograman su metabolismo energético produciendo fundamentalmente a través de la glicolisis anaerobia (Efecto Warburg).
Potencial replicativo ilimitado	Las células tumorales carecen del mecanismo regulador de la longitud de los telómeros para garantizar un número finito. Mantienen la longitud de los telómeros y adquieren un potencial replicativo ilimitado.
Angiogénesis	Promueven la formación de vasos sanguíneos para garantizar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor.
Invasión y metástasis	La capacidad de migración e invasión de otros tejidos por las células tumorales es la principal causa de muerte por cáncer.
Entorno inflamatorio alterado	Los tumores están frecuentemente infiltrados por células del sistema inmune, de forma similar a un proceso inflamatorio de células no tumorales.
Evasión de la respuesta inmune	Las células tumorales activan procesos como la tolerancia o la no expresión de antígenos para escapar de la respuesta inmune.
Reprogramación epigenética	La reprogramación epigenética no mutacional tiene un papel importante en el desarrollo tumoral.
Microbiomas polimórficos	Existen indicios de que la variación polimórfica en los microbiomas del intestino y otros órganos constituye una característica habilitadora esencial para la adquisición de capacidades distintivas.
Células senescentes	Se postula que las células senescentes promueven los fenotipos tumorales a través de su fenotipo secretor (SASP). Son capaces de transmitir, de manera paracrina, moléculas de señalización para desencadenar capacidades distintivas.
Desbloqueo de la plasticidad fenotípica	Las células cancerosas que provienen de una célula normal completamente diferenciada pueden revertir su curso y desdiferenciarse hacia estados celulares similares a progenitores.

**Tabla 1.** Procesos que interfieren en cada una de las capacidades adquiridas y necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral. (Elaboración propia)

Tal como se ha mencionado anteriormente, el cáncer se manifiesta como una afección del genoma a nivel celular, siendo precedido por la acumulación progresiva de mutaciones a lo largo del tiempo. Estas mutaciones confieren a una célula ciertas ventajas de crecimiento con respecto a sus vecinas. No obstante, el cáncer no se limita únicamente a ser un proceso celular autónomo, sino que también está influenciado por las interacciones entre las células tumorales, el microambiente tumoral y la señalización sistémica a larga distancia. Además, estos cambios sucesivos generados por estas mutaciones progresivas encuentran similitudes con el proceso de evolución darwiniana. En este contexto, los eventos causales resultan en mutaciones que inducen cambios en el fenotipo de las células afectadas permitiendo así su adaptación al entorno. De hecho, la mutación inicial desencadena la formación de un clon genéticamente homogéneo y las mutaciones adicionales subsiguientes intensifican aún más el potencial de crecimiento de las células, generando subclones con propiedades distintas.

En relación al proceso de carcinogénesis, Armitage y Doll en 1954 concluyen que se compone de al menos de seis o siete etapas, las cuales raramente pueden ser definidas en un tumor individual. Ello indica la naturaleza multietapa del desarrollo del cáncer, pues se van adquiriendo características más agresivas de manera gradual (Armitage & Doll, 1954). Dicha evidencia sugiere que los cánceres surgen de una sola célula que ha adquirido alguna forma hereditaria de ventaja de crecimiento, ya sea por algún agente genotóxico como la radiación o un carcinógeno químico. Las células en esta etapa, aunque alteradas a nivel de ADN, son fenotípicamente normales. Sin embargo, otros eventos mutacionales involucrados en genes responsables del control del crecimiento celular conducen a la aparición de clones con propiedades adicionales asociadas a la progresión de las células tumorales. Por último, los cambios adicionales que se originan proporcionan el crecimiento de los clones con potencial metastásico. En este sentido, es probable que el cúmulo de todos estos eventos sucesivos haga que la célula sea más inestable y que el riesgo de los cambios posteriores aumente. Aunque está claro que los cambios múltiples son necesarios, no lo está tanto si el orden en el que se producen es crítico. No obstante, las evidencias sugieren que es mucho más importante la acumulación de los eventos que el orden en el que ocurren (Macdonald et al., 2004, p.8-11). Véase **Figura 2**.



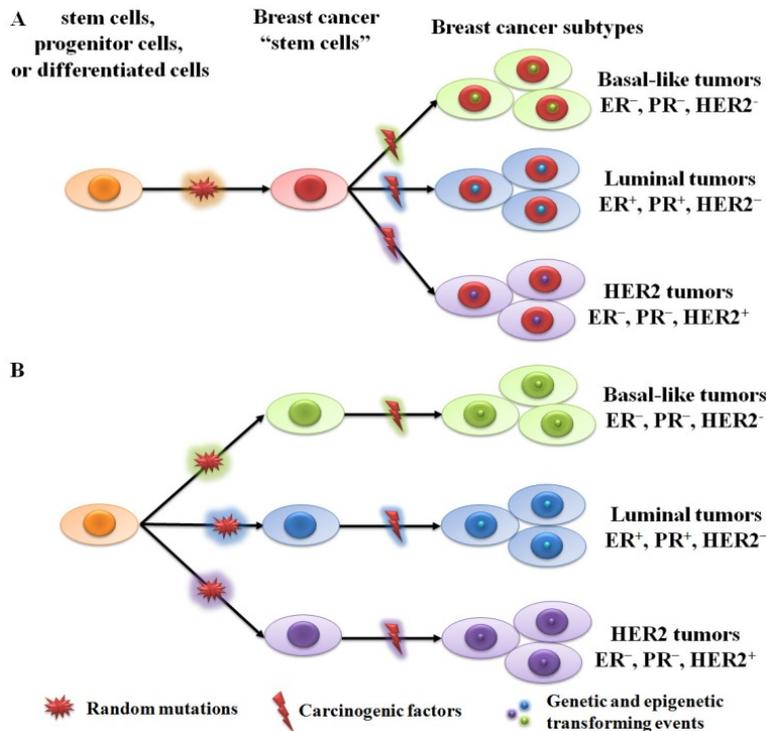
**Figura 2.** Progresión multietapa de la carcinogénesis. (Macdonald et al., 2004, p.9)

Por otro lado, según la naturaleza de las mutaciones y su afectación en las células, los tumores se clasifican en dos grupos: benignos y malignos. Los primeros, suelen estar bien definidos o encapsulados y bien diferenciados, y rara vez representan una amenaza para la vida. Por su parte, los tumores malignos invaden los tejidos circundantes y pueden diseminarse dando lugar a metástasis, un proceso que con frecuencia pone en peligro la vida de los pacientes. Este fenómeno de metástasis implica una serie de pasos determinados genéticamente y sólo algunos clones dentro del tumor poseen las propiedades necesarias para metastatizar.

### 1.1 Cáncer de mama

El CM es, a grandes rasgos, una neoplasia maligna que presenta una naturaleza heterogénea. Abarca diversas entidades patológicas vinculadas a variados patrones histológicos y biológicos distintivos. En esta enfermedad, las células epiteliales de la glándula mamaria experimentan degeneración y se transforman en células neoplásicas, proliferando de manera descontrolada para dar origen a un tumor. Estas células tienen la capacidad de diseminarse a través del sistema sanguíneo y/o los vasos linfáticos, alcanzando otras áreas del organismo donde se adhieren a los tejidos y crecen formando lo que se denomina metástasis (Santaballa, 2022).

En cuanto a las hipótesis que podrían explicar el inicio y la progresión del CM se destaca la de las **células madre tumorales (CMT)** y la **estocástica o tradicional (Figura 3)**. El modelo jerárquico de las CMT sostiene que todos los subtipos de tumores derivan de las mismas células madre o células progenitoras. Las mutaciones genéticas y epigenéticas adquiridas en estas células darán lugar a diferentes fenotipos tumorales. Por otro lado, la teoría estocástica o tradicional postula que cada subtipo de tumor se origina a partir de un solo tipo de célula, ya sea una célula madre, progenitora o diferenciada. (Sun et al., 2017)



**Figura 3.** Teorías sobre las hipótesis del origen y desarrollo del CM. (Sun et al., 2017)

La **Figura 3** presenta dos teorías sobre el origen y desarrollo del CM: (A) Todos los subtipos tumorales podrían surgir de células madre o progenitoras comunes, transformándose luego en diferentes tipos según eventos específicos; (B) Cada subtipo podría iniciar desde un solo tipo de célula mamaria, ya sea célula madre, progenitora o diferenciada, transformándose en células tumorales con la acumulación gradual de mutaciones (Sun et al., 2017). Sin embargo, todavía en la actualidad se desconoce el mecanismo exacto por el cual se inicia esta neoplasia. No obstante, ambos modelos, el de evolución clonal y el de CMT, no son mutuamente excluyentes, ya que las propias CMT están sujetas a la evolución clonal y, por lo tanto, es posible que ambos paradigmas coexistan (Harbeck et al., 2019).

### 1.1.1 Epidemiología del cáncer de mama

El CM es el tumor maligno más frecuente en las mujeres y la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial y en España. Según el Observatorio Global de Cáncer (GCO) en el año 2022 se estimaron 2.310.053 casos (11,5%) para ambos sexos, siendo la segunda mayor en incidencia a nivel global, por detrás del cáncer de pulmón (12,4%). Para ese mismo año y teniendo en cuenta ambos sexos, se contabilizaron 669.846 muertes por CM ocupando el cuarto lugar a nivel mundial, representando así un 6,9% del total de fallecimientos, precedido por el cáncer de hígado (7,8%), colorrectal (9,3%), y pulmón (18,7%). Se estima que para el año 2040 aumenten un 33,8% más los casos de CM (GCO, 2023). En la población mundial de mujeres, este tipo de cáncer representó en 2022 el 23,8% de incidencia con una mortalidad del 15,4%.

En el caso de la población femenina española su incidencia sigue aumentando ligeramente con un total de 34.735 casos en el 2022, 35.001 casos en 2023 y para 2024 se estima la cifra de 36.395 casos, siendo el tipo de cáncer más común (SEOM, 2024). Por otra parte, aunque la mortalidad ha disminuido gracias a la introducción de programas de cribado y a los avances en el tratamiento neoadyuvante, en 2023 se registraron 6.754 muertes, lo que representa casi el 25% de fallecimientos y se espera registrar 6.987 muertes en el 2025 (IARC, 2024). Los varones, por su parte, suponen alrededor del 1% de los nuevos diagnósticos de esta enfermedad y se señala que en el 15-20% de los casos existen antecedentes familiares que permiten un diagnóstico de cáncer hereditario.

### 1.1.2 Factores de riesgo

Generalmente, la determinación precisa de por qué una persona desarrolla cáncer y otra no, aún no ha sido completamente esclarecida. Dicho esto, se han identificado múltiples factores de riesgo asociados a esta patología categorizados como **no modificables** -edad, predisposición genética, antecedentes familiares, patología benigna de la mama o la densidad mamográfica- u otros **modificables** -obesidad en mujeres postmenopáusicas, terapia hormonal, ejercicio físico o lactancia materna (Santaballa y Gómez, 2022).

Entre los **factores no modificables** se encuentran:

- Edad. Considerado el factor de riesgo más importante pues la incidencia de CM aumenta con la edad. Por otra parte, el patrón de incidencia difiere según el subtipo: si bien el riesgo de padecer un CM con receptores hormonales positivos aumenta progresivamente con la edad, en el caso de los tumores con receptores hormonales negativos la incidencia se estabiliza e incluso desciende tras la menopausia. Probablemente esto se deba a que la edad no solo refleja la acumulación de diferentes exposiciones en el tiempo, sino también al propio envejecimiento del tejido mamario, dependiente de los estímulos hormonales a lo largo de la vida, de ahí que los tumores con receptores hormonales positivos también se suelen presentar a una edad más tardía que los otros subtipos.
- Género. El CM puede aparecer tanto en mujeres como en hombres, aunque más del 99% de los casos ocurre en mujeres.
- Historia familiar. Aproximadamente el 10% de los casos de CM son hereditarios y están asociados a la historia familiar. Si el pariente afectado es de primer grado (madre, hermana o hija), el riesgo es aproximadamente 1,5 veces mayor que el de la población general y aumenta progresivamente según el número de familiares que hayan presentado CM, hasta llegar a multiplicarse por 4 en mujeres con tres o más familiares

de primer grado afectados. En caso de que el antecedente familiar sea de segundo grado, el riesgo relativo varía entre 1,2-1,5% (Pollán et al., 2017).

- Predisposición genética. Los genes *BRCA1* y *BRCA2* son los responsables del 5% al 10% de todos los CM y del 15% al 20% de los CM hereditarios (Tung et al., 2016).
- Antecedentes personales. Las mujeres con un diagnóstico de CM tienen un mayor riesgo de desarrollar un nuevo CM primario, aunque este sea bajo, 0,4% por año (Giannakeas et al., 2021).
- Alteraciones histológicas. Las lesiones proliferativas con atipia (hiperplasia lobulillar y ductal atípica) aumentan el riesgo de 4 a 6 veces. La presencia de carcinoma lobular *in situ* (CLIS) y una mamografía con patrón denso, suponen también un factor de riesgo (Arroyo et al., 2017).
- Factores menstruales. Las mujeres con la menarquia antes de los 11 años tienen un 2% más de riesgo que las mujeres que comienzan a menstruar más tarde. Del mismo modo, las mujeres que tienen la menopausia más allá de los 55 años tienen un 12% más de riesgo que las que la presentan entre los 50 y los 54 años. Probablemente esto obedezca a una mayor exposición a las hormonas esteroideas a lo largo de la vida. Además, estas mujeres están más relacionadas con tumores lobulillares con expresión de receptores hormonales (Howell et al., 2014).

En cuanto a los **factores de riesgo modificables**, se señalan:

- Factores reproductivos. Las mujeres nulíparas enfrentan un mayor riesgo de CM que aquellas con hijos, aunque el hecho de la paridad ofrece protección décadas después del parto. El riesgo varía según la edad del primer parto, siendo más alto en embarazos tardíos. Los resultados del *Nurses' Health Study* indican una incidencia acumulada de un 20% más baja en mujeres que dieron a luz a los 20 años, un 10% menor a los 25 años y un 5% más alta en mujeres que dieron a luz a su primer hijo a los 35 años. Este riesgo aumentado se asocia más con tumores hormonales. La lactancia materna reduce el riesgo de CM, con una disminución del 2% por cada 5 meses, especialmente en tumores triple negativos (Fortner et al., 2019).
- Hormonas exógenas. La terapia hormonal sustitutiva aumenta el riesgo de CM, pero no la mortalidad por dicha causa.
- Tabaquismo. En estudios observacionales se ha demostrado un aumento moderado del riesgo de padecer CM en pacientes fumadoras y fumadoras pasivas. Se ha comprobado que este riesgo es mayor si se empieza a fumar antes del nacimiento del primer hijo (Macacu A et al., 2015).
- Actividad física. La práctica regular de ejercicio físico reduce el riesgo entre un 12 % y un 20 %, siendo más efectivo con actividades de mayor intensidad. Aunque la evidencia en mujeres premenopáusicas es limitada, sugiere que actividades intensas ofrecen una mayor reducción de riesgo (Pollán et al., 2020).
- Obesidad. Las mujeres posmenopáusicas con índice de masa corporal (IMC) alto o un aumento de peso durante la perimenopausia tienen un mayor riesgo de padecer CM, especialmente aquellos con receptores hormonales positivos (Munsell et al., 2014). Este incremento del riesgo en mujeres posmenopáusicas con IMC alto puede atribuirse a niveles elevados de estrógeno, derivados de la conversión periférica de tejido adiposo. Por otra parte, en el caso de mujeres premenopáusicas, un IMC alto se asocia con un menor riesgo de CM, especialmente en los primeros años de la edad adulta, posiblemente debido a una menor ovulación y niveles hormonales circulantes (Schoemaker et al., 2018).

### 1.1.3 Clasificación histológica del cáncer de mama

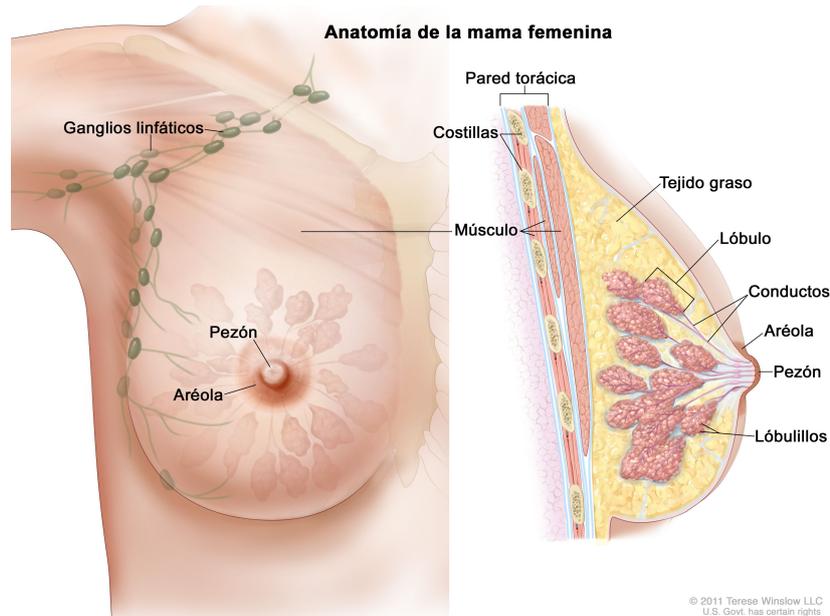
La glándula mamaria es un órgano constituido por tejido adiposo, tejido epitelial y tejido conjuntivo especializado (estroma especializado). El tejido epitelial está formado principalmente por dos tipos celulares derivados de las mismas células madre precursoras que revisten los conductos y lobulillos: 1) las células mioepiteliales, que se apoyan en la membrana basal y 2) las células epiteliales lumbinales subyacentes. El estroma también se clasifica como interlobulillar (entre los lobulillos), constituido por tejido adiposo y conjuntivo fibroso denso, y estroma intralobulillar, constituido por células similares a los fibroblastos con respuesta hormonal, que rodea los acinos de los lobulillos.

La porción glandular de la mama comprende de 12 a 15 sistemas ductales independientes que nacen de un conducto galactóforo principal desde el pezón, con una pequeña dilatación cerca de su nacimiento (seno galactóforo). Cada uno de estos sistemas ductales drena cerca de 40 lóbulos, los cuales contienen de 10 a 100 acinos productores de leche, que desembocan en pequeños conductos terminales (**Figura 4**). Además de la porción glandular, existe un soporte conjuntivo y revestimiento adiposo cuya distribución define la consistencia de las mamas durante la palpación y su caracterización en estudios de imagen radiológicos.

La unidad funcional de la mama, denominada unidad ducto-lobulillar, está formada por el conducto terminal intralobulillar, los acinos conectados a éste y el tejido fibroso del estroma intralobulillar. Las unidades funcionales son muy importantes ya que representan el origen de la mayor parte de la patología mamaria y de aberraciones del desarrollo normal e involución (Howard & Gusterson, 2000).

Otra estructura muy importante en la glándula mamaria es el drenaje linfático. Se trata de una trama de conductos sin válvulas conectado a los sistemas linfáticos dérmico, subdérmico, interlobular y pre-pectoral, los cuales desembocan en uno o dos ganglios linfáticos axilares. Estos ganglios, también llamados “centinela”, al ser los que reciben mayor parte de linfa proveniente de las mamas, son en los que con mayor frecuencia se localizarán las metástasis del CM (Hultborn et al., 1955).

Antes de proseguir con el desarrollo del tema, es necesaria una somera aproximación al caso. En el desarrollo fetal, los botones mamarios se originan a partir de la capa basal de la epidermis. Antes de la pubertad, la mama es un botón rudimentario formado por unos cuantos conductos ramificados cubiertos por yemas alveolares, yemas terminales o lóbulos pequeños. Durante la pubertad (entre 10 y 13 años) los estrógenos y la progesterona ováricos dirigen la comunicación organizada entre las células epiteliales mamarias y las células mesenquimales, con lo que el sistema ductal se ramifica de manera extensa y se forman lóbulos. En la edad fértil, los acinos y los conductos terminales cercanos a ellos son las estructuras más sensibles a las hormonas ováricas y a la prolactina. La mayor parte de las enfermedades tanto benignas como malignas de las mamas se origina en estas regiones (**Figura 4**).



**Figura 4.** Anatomía de la mama femenina. (National Cancer Institute, Terese Winslow, 2011)

Ciñéndonos a la clasificación del tipo histológico, ésta se basa en dos aspectos fundamentales: la localización donde se origina la transformación de la célula de sana a tumoral, y el patrón de crecimiento del tumor. Dependiendo de la localización de las células neoplásicas, los carcinomas pueden clasificarse en ductales (células de los ductos) o lobulillares (células de los lobulillos) y de acuerdo con su patrón de crecimiento podrán ser no infiltrantes (*in situ*) o infiltrantes (Arroyo et al., 2017) (**Figura 5**).

En el caso del **carcinoma *in situ***, las células neoplásicas no sobrepasan la membrana basal quedando limitadas a la luz de los conductos y lobulillos. Por lo tanto, no infiltran ganglios linfáticos y tampoco vasos sanguíneos, ya que no pueden metastatizar. Dentro de este grupo se pueden diferenciar dos subtipos:

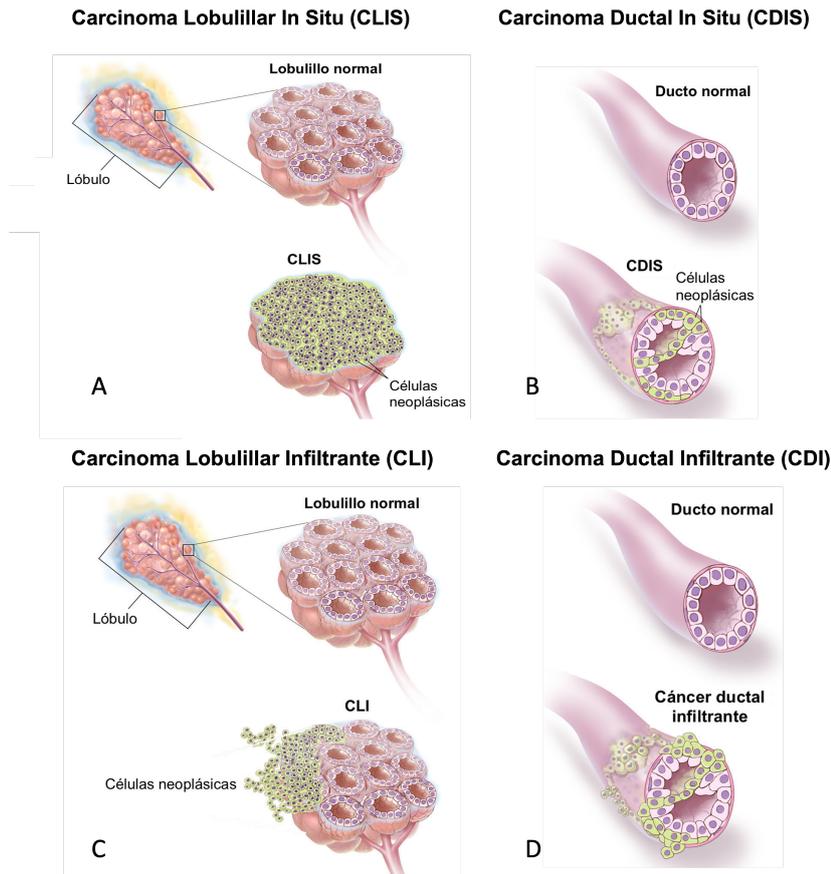
- a) **Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS)**. Se origina por la proliferación de células malignas de los lobulillos y conductos terminales de la mama, sin afectar a la membrana basal. No se considera una lesión premaligna, sino más bien un marcador de riesgo en el desarrollo de CM. Se considera que ambas mamas tienen el mismo riesgo (15%) de desarrollar carcinoma infiltrante en 20-30 años, que en algunos casos puede ser multicéntrico y bilateral.
- b) **Carcinoma ductal *in situ* (CDIS)**. Se caracteriza por la proliferación de células epiteliales malignas dentro del sistema ductal mamario, sin invasión en el estroma circundante. Un tercio de los casos suele ser multicéntricos, es decir, que se producen varios focos tumorales en más de un cuadrante de la mama, mientras que el 20% de los casos es multifocal (varios focos en un solo cuadrante).

Por su parte, el **carcinoma infiltrante** se caracteriza por la destrucción de la membrana basal del ducto por las células neoplásicas y la secundaria invasión del estroma circundante, llegando a metastatizar. Se describen básicamente 2 tipos, y cada uno de los cuales tiene subtipos especiales:

- c) **Carcinoma ductal infiltrante (CDI)**. Proviene de los conductos lácteos y comúnmente suele asociarse a la presencia de un componente de CDIS. Este tipo es el más prevalente, representando entre el 70% y el 80% de los casos. Se manifiesta principalmente como una masa palpable y en ocasiones tiene afectación ganglionar en estadios precoces. Entre los **subtipos especiales de CDI** más frecuentes están:

- c1.- Carcinoma medular.** Subtipo poco común que representa entre el 3% y el 5%, existiendo una gran variabilidad inter-observador en su diagnóstico. Se trata de un tumor infiltrante bien circunscrito, caracterizado por células poco diferenciadas dispuestas en sábanas y nidos, sin formación de glándulas. Además, presenta un escaso estroma, con un infiltrado linfocitario muy prominente. (Piamo Morales et al., 2020)
- c2.- Carcinoma tubular.** Representa el 10% al 20% de los casos y se caracteriza por la presencia de formaciones tubulares o glandulares que infiltran el estroma.
- c3.- Carcinoma mucinoso o coloide, papilar, micropapilar y la enfermedad de Paget.** Representan entre el 1% y 2% de los casos.
- d) Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI).** Se origina en los pequeños conductos terminales o lobulillos, presentándose como una masa o engrosamiento difuso. En ocasiones metastatiza en los ganglios de la axila y tiene un patrón de diseminación sistémica peculiar, metastatizando por vía sanguínea a las leptomeninges, peritoneo, tracto gastrointestinal, aparato ginecológico y huesos. El CLI se clasifica en el subtipo especial clásico caracterizado por la presencia de células pequeñas con núcleos con baja o moderada atipia, redondos e irregulares y citoplasma con vacuolas ocasionales. Entre los subtipos especiales de CLI menos frecuentes están:
- d1.- Pleomórfico:** caracterizado por un mayor pleomorfismo nuclear (grado 3), luces intracitoplásmicas, un patrón de crecimiento más sólido y con índice proliferativo alto, lo que le confiere mayor agresividad y, por tanto, las pacientes tienen peor pronóstico que la variante clásica (Riegé et al., 2020)
- d2.- Túbulo-lobulillar.** Muestra la formación de túbulos que alternan con un patrón en hileras de células neoplásicas, habitualmente de grado bajo o intermedio y se asocia a buen pronóstico (Makki, 2015).
- d3.-Alveolar.** Las células se agrupan en nidos de 20 a 30 células, separados por bandas de tejido estromal, adquiriendo una forma globular en dos dimensiones, son de bajo grado y de buen pronóstico (Kolawole et al., 2024).

Los tumores infiltrantes se clasifican además por el grado de diferenciación, una de las características anatomopatológicas más relevante. El sistema de clasificación más comúnmente empleado es el de Nottingham, modificado por Scarff-Bloom-Richardson, que evalúa la diferenciación según la formación de ductos, el pleomorfismo nuclear y el número de mitosis (Elston & Ellis, 1991). Para poder gradar los tumores, cada uno de estos parámetros recibe una puntuación del 1 al 3, y luego se suman (3 a 9 puntos). De acuerdo con el total obtenido, los tumores se clasifican en tres grados diferentes: Grado I (bien diferenciado), si la suma de las puntuaciones es de 3 a 5. Grado II (moderadamente diferenciado), si la suma alcanza 6 o 7. Grado III (mal diferenciado), si la suma totaliza 8 o 9. Esta clasificación es esencial para la valoración de la agresividad del tumor y guiar las decisiones de tratamiento y prever el pronóstico del paciente.



**Figura 5.** A) Carcinoma lobulillar in situ. B) Carcinoma ductal in situ. C) Carcinoma lobulillar Infiltrante. D) Carcinoma ductal infiltrante. Modificada de National Cancer Institute. (Terese Winslow, 2011)

#### 1.1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama

En el año 2000, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Charles M. Perou (Perou et al., 2000) propuso una redefinición de la clasificación del CM basado en el estado de los receptores hormonales, la amplificación y/o sobreexpresión de HER2 y el marcador de proliferación Ki67. Los biomarcadores que se analizan son los siguientes (Sun et al., 2017):

- Receptor hormonal (RH): Son receptores, como los de estrógeno (RE) y progesterona (RPg), cuya sobreexpresión estimula el crecimiento tumoral.
- Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2). Se trata de un receptor extracelular cuya amplificación o truncamiento genera una señal constante de división, vinculada a tumores de mama más agresivos. La sobreexpresión de HER2 que se detecta en aproximadamente el 15-20% de los CM primarios induce la proliferación y supervivencia de células madre neoplásicas mediante la activación de vías de señalización como PTEN/Akt/mTORC1.
- Ki 67: es un marcador de proliferación celular en el tumor, permitiendo calcular el porcentaje de células que están en proceso de división.

El objetivo final de esta clasificación es discriminar qué pacientes se podrían beneficiar de una terapia u otra y cuáles tenían un comportamiento más agresivo. Siguiendo estos biomarcadores, inicialmente se definieron 4 subtipos según su perfil de expresión génica en Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y "basal like", todos ellos ordenados según modo ascendente de agresividad (Alcaide Lucena et al., 2021). A continuación, una breve presentación de cada uno de ellos.

El subtipo denominado Luminal es el más frecuente, representando alrededor del 75%-80% de los CM. Se caracterizan por expresar RE y una alta expresión de genes asociados a las células epiteliales lumbales del ducto mamario, como la citoqueratina 8 y 18. Dentro de este grupo diferenciamos dos subtipos:

- **Luminal A.** Son positivos para los RE, con niveles mayores del 20 % para el RPg y HER2 negativos. Además, tienen una expresión de Ki67 menor o igual al 20% y constituye el 50%-60% de los tumores lumbales. Es el subtipo de mejor pronóstico, con menos incidencia de recaídas, mayor índice de supervivencia y una alta tasa de respuesta a la hormonoterapia y quimioterapia (QT). La recaída es más frecuente a nivel óseo, aunque también pueden metastatizar, pero menos frecuentemente, en vísceras (p.e. hígado) y sistema nervioso central (SNC).
- **Luminal B.** Son positivos para los RE, presentan una expresión moderada baja de RPg (<20%), pueden ser positivos o negativos para HER2 y tienen una expresión de Ki67 mayor al 14%. Constituye el 10%-20% de los lumbales. Representa el grupo de tumores lumbales de peor pronóstico. En este caso, la recidiva ósea también es frecuente, pero tienen una mayor tasa las viscerales, siendo la supervivencia desde el diagnóstico de la recaída inferior.

En relación al subtipo HER2 positivo-puro, se caracteriza por no expresar RE ni RPg, pero sí HER2. Tiene peor pronóstico con relación a los lumbales y se trata con terapia dirigida anti-HER2 como el trastuzumab e inhibidores de tirosina quinasa (p.e. lapatinib), entre otros. Presenta una alta tasa de respuesta a la QT. Las recaídas localizadas en el hueso y SNC son las más habituales.

El caso del triple negativo (CMTN) expresa menos del 1% de RE y RPg en inmunohistoquímica, y el receptor HER2 no amplificado o negativo con técnicas de hibridación in situ (FISH/SISH) (HER2-). Este subgrupo representa entre el 10% y el 15% de los casos y su comportamiento es agresivo, con altas tasas de metástasis a distancia, especialmente dentro de los tres primeros años. La QT es el único tratamiento disponible, con altas tasas de respuesta. Sin embargo, los resultados iniciales favorables suelen ser cortos por los mecanismos de resistencia que se establecen, lo cual es conocido como la paradoja del CTMN.

Tradicionalmente se ha utilizado el término triple negativo y “*basal like*” indistintamente, pero en estudios recientes se ha concluido que no todos los tumores triples negativos son “*basal like*”, aunque sí en su mayoría, y tampoco todos los “*basal like*” son triples negativos. En el año 2016, el grupo de investigación de Lehmann clasificó el CMTN en 4 subtipos. (Lehmann et al., 2016). Para estos autores, el primero es el denominado (1) “*basal like*” (BL) y presenta expresión de genes característicos de las células mioepiteliales basales del acino mamario y se divide en dos tipos: BL1 caracterizado por una alta expresión de genes del ciclo celular, proliferación y reparación del ADN, BL2 que presenta un aumento de la expresión de genes implicados en la señalización de factores de crecimiento. (2) El segundo es el subtipo inmunomodulador (IM), cuyos tumores presentan una importante infiltración linfocitaria y está compuesto por genes que codifican antígenos inmunitarios y citoquinas. (3) El tercer subtipo es el mesenquimal (M), el cual presenta una alta concentración de células mesenquimales asociadas a tumor. Además, manifiestan una expresión elevada de genes implicados en la transición epitelio-mesenquima. (4) El cuarto subtipo, luminal con receptor de andrógenos (LAR), se caracteriza por tener alteradas las vías de regulación hormonal como la de estrógenos/andrógenos con niveles altos del receptor de andrógenos.

Por último, esta distinción entre los patrones de expresión génica de los CM permite diferenciar subtipos tumorales con evoluciones clínicas diferentes y proporciona un valor significativo en la toma de decisiones clínicas futuras y su alineación con el tratamiento adecuado.

### 1.1.5 Diagnóstico

Para realizar un buen diagnóstico y poder eliminar el mayor número posibles de falsos negativos se realiza, en la actualidad, una triple prueba: la exploración clínica de la mama (propia o por parte del médico), un estudio radiológico y la biopsia para confirmar el diagnóstico. Cada vez son más las mujeres que se benefician de este tipo de pruebas, aunque todavía el alcance no sea el mismo en todos los territorios o países.

La exploración o palpación física es el primer paso para diagnosticar el CM, ya sea por parte de la propia paciente o del médico, aunque no se ha podido demostrar que sea eficaz para disminuir la mortalidad de la enfermedad. Cuando las mujeres realizan la exploración y encuentran alguna anomalía acuden al médico donde se les realiza una inspección y palpación. Para facilitar la exploración se divide la mama en cuatro cuadrantes y la palpación se realiza con la yema de los dedos de forma suave y sistemática desde dos posiciones, colocando a la paciente sentada y en decúbito supino. Una vez confirmada o detectada la anomalía se utilizan técnicas de imagen radiológica, como la mamografía, la ecografía mamaria y/o axilar o la resonancia magnética nuclear. En caso de sospechar de posibles metástasis, el estudio radiológico se puede completar con la tomografía axial computerizada (TAC), la tomografía por emisión de positrones (PET), o la combinación de ambas PET-TAC.

La mamografía es el método diagnóstico por imagen principal. Se utiliza en pacientes asintomáticas como método de *screening* y en sintomáticas. Presenta una sensibilidad diagnóstica del 77% al 95% y una especificidad muy alta, del 94% al 97% favoreciendo así el diagnóstico temprano. Sin embargo, la sensibilidad disminuye en tejidos mamarios densos.

Los datos obtenidos con la mamografía se complementan con la ecografía mamaria, la cual es de mayor utilidad en mujeres jóvenes debido a la alta densidad del tejido mamario y axilar (Espisona Ramírez, 2018). Esta técnica funciona emitiendo ondas de ultrasonidos con el objetivo de diferenciar nódulos quísticos (con líquido en su interior) o sólidos y benignos o malignos. La ecografía permite discernir el tamaño, localización, vascularización, elasticidad del tumor y el estado ganglionar tanto de axila como región supra e infra claviclar y paraesternal (Cárdenas-Sánchez et al., 2019). No obstante, los tumores menores de 5 mm y las microcalcificaciones son indetectables con esta técnica.

La resonancia magnética tiene una mayor sensibilidad (91%) en comparación con la mamografía. Esta técnica no se ve afectada por la densidad de la mama y ello la hace ideal para la detección del CM primario oculto, metástasis ganglionares axilares y tumores residuales. La resonancia magnética proporciona información tanto morfológica como funcional a través de la inyección endovenosa de una sustancia paramagnética (gadolinio) y aplicando un campo electromagnético (Espinosa Ramírez, 2018). A pesar de ser el método más sensible para la estadificación de mama, tiene una especificidad limitada ya que los hallazgos deben confirmarse histológicamente debido a la alta tasa de falsos positivos (Arroyo et al., 2017).

Por último, para categorizar adecuadamente las lesiones a partir de las imágenes obtenidas en la mamografía, la ecografía y la resonancia magnética nuclear se sigue la clasificación propuesta por el Colegio de Radiólogos de Estados Unidos conocida por las siglas BIRADS (*Breast Imaging Report and Data System*). Este sistema se considera el idioma universal para el diagnóstico de la patología mamaria, dado que estandariza la terminología y la sistemática del informe mamográfico, categoriza las lesiones estableciendo el grado de sospecha de cáncer y asigna la actitud a tomar en cada caso (Aibar et al., 2011).

Otra herramienta indispensable para el diagnóstico basado en la imagen es el PET. Combinando la tomografía computerizada y la medicina nuclear, se consigue realizar un estudio morfológico

y molecular del tumor de manera simultánea, llegando incluso a obtener la localización precisa de una lesión metastásica (Cárdenas- Sánchez et al., 2019). Aquellos tejidos que requieran mayores necesidades metabólicas, como son las células cancerígenas manifestarán una mayor captación del trazador (Akram et al., 2017).

El TAC es una técnica radiográfica que permite obtener información sobre los órganos internos del cuerpo en cuadros bidimensionales o secciones transversales. Se toman radiografías del cuerpo desde varios ángulos diferentes que posteriormente se unifican y crean imágenes detalladas. Por otro lado, existe el PET-TAC, una exploración no invasiva, que mide la actividad metabólica del cuerpo humano en tiempo real. Combina dos tecnologías: por un lado, la prueba PET, que proporciona información sobre el metabolismo del paciente, y por otro la prueba TAC que proporciona datos sobre su anatomía.

Finalmente, cuando se sospecha de la existencia de un CM en las pruebas de imagen se realiza una confirmación histológica. Para ello se debe realizar una biopsia con aspiración en aguja fina (PAAF), aguja gruesa (BAG) o biopsia quirúrgica en caso de que existan múltiples lesiones. La muestra obtenida se analiza microscópicamente para determinar el tipo y grado del tumor, seguido de técnicas inmunohistoquímicas para clasificar además el tumor dependiendo del fenotipo, conociendo de esta manera su grado de agresividad y los parámetros que influyen en elección del tratamiento y el pronóstico.

#### 1.1.6 Tratamiento

El tratamiento del CM es muy complejo como así lo demuestran numerosos investigadores en las últimas décadas, pero gracias a la identificación de los distintos subtipos biológicos se han logrado realizar terapias individualizadas que se adecuan a la situación patológica de cada paciente. Habitualmente se utiliza la combinación de tratamientos *standard* de los que disponemos actualmente, como son: cirugía, RT, QT, hormonoterapia, terapia dirigida e inmunoterapia (PDQ, 2024). Dentro de los tipos de tratamiento quimioterápico se distingue entre el tratamiento adyuvante, administrado después del tratamiento quirúrgico con el fin de mejorar el pronóstico y reducir el riesgo de recidivas y muerte de las pacientes, y el tratamiento neoadyuvante, que se administra antes de la cirugía en tumores localmente avanzados (estadio III) para disminuir su tamaño y permitir un aumento de la tasa de cirugía conservadora.

El primero de los tratamientos estándar es la cirugía, cuyo objetivo es la exéresis completa del tumor. Este procedimiento puede adoptar dos enfoques principales: uno conservador o tumorectomía incluyendo una porción del tejido sano circundante para obtener márgenes negativos; o bien, una mastectomía total, en la que se extirpa completa de la mama afectada. En el acto de la cirugía, también se suele realizar el estudio del ganglio linfático centinela por métodos moleculares (OSNA) o citología intraoperatoria, con el propósito de determinar el estatus ganglionar. Para ello, se administra una solución que puede contener una sustancia radiactiva y/o un colorante en proximidad al sitio del tumor, permitiendo que esta se desplace a través del sistema linfático hacia los ganglios regionales. De esta manera, se identifica y extrae el primer ganglio linfático en recibir la solución o colorante, conocido como ganglio centinela, el cual es sometido a análisis para detectar la presencia de células tumorales. En función de los hallazgos obtenidos en el ganglio centinela, se evalúa la necesidad de realizar una linfadenectomía axilar, es decir, la extirpación de los ganglios linfáticos axilares.

Otro tipo de tratamiento estándar es la radioterapia (RT), que consiste en la administración de rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar las células neoplásicas o impedir su crecimiento. Existen dos tipos de RT: la externa, que utiliza una máquina ubicada fuera del

cuerpo para dirigir la radiación hacia la zona del cuerpo afectada por el cáncer mientras que la RT interna introduce una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, alambres o catéteres directamente dentro o cerca del cáncer. La forma en que se administra esta modalidad de tratamiento depende del tipo y estadio del cáncer que se esté tratando. Por otra parte, la RT externa se utiliza para tratar el CM, mientras que la interna con estroncio-89 (un radionúclido) se utiliza para aliviar el dolor óseo causado por las metástasis del CM.

La quimioterapia (QT) es otra opción para el tratamiento del CM. Se basa en la utilización de fármacos para frenar el crecimiento tumoral, ya sea eliminando las células neoplásicas o evitando su proliferación. Su administración suele ser sistémica (vía intravenosa o vía oral) para aumentar así el alcance a todas las células neoplásicas del organismo. Habitualmente, el tratamiento se administra tras el tratamiento quirúrgico del tumor (QT adyuvante), aunque en los últimos años la administración previa a la cirugía (QT neoadyuvante) se está aplicando cada vez más debido a que las pacientes que obtienen respuestas completas tienen una mejor supervivencia. No obstante, los tumores requieren la combinación de una serie de características, como que sean de fenotipos agresivos, con alto índice proliferativo, tamaño (>2 cm), ganglios positivos, etc. En un elevado número de casos, esta modalidad de tratamiento va a facilitar una cirugía local más conservadora.

La terapia hormonal o endocrina ralentiza o detiene el crecimiento de tumores sensibles a hormonas, al bloquear su liberación o al interferir con sus efectos en las células neoplásicas. Algunos tipos de terapia hormonal son: los inhibidores de la aromatasa como anastrozol, letrozol o exemestano, los antagonistas del RE a como el Fulvestrant, los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) como goserelina o leuprolida o los moduladores selectivos del RE como el Tamoxifeno.

La terapia dirigida, por su parte, utiliza fármacos u otras sustancias para identificar y atacar específicamente a las células malignas. Un ejemplo de terapia dirigida son los anticuerpos monoclonales que pueden unirse a una diana específica en estas células y bloquear su crecimiento o eliminarlas. Para el CM HER2-positivo existen diversas terapias dirigidas como el anticuerpo monoclonal contra el receptor HER2 (ej.: Trastuzumab, pertuzumab), los inhibidores de la tirosina-quinasa asociada al receptor HER2 (ej.: lapatinib) o los anticuerpos conjugados (ej.: T-DM1 y Trastuzumab-deruxtecan), entre otros.

La inmunoterapia es otra modalidad de tratamiento reciente que se centra en la manipulación del sistema inmunológico del organismo para reconocer y atacar a las células neoplásicas. Uno de los enfoques principales es el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario. Estos puntos de control, presentes en las células del sistema inmunológico, desempeñan un papel crucial en la regulación de las respuestas inmunitarias, garantizando un equilibrio adecuado para evitar reacciones autoinmunes excesivas. Actualmente se está empleando Atezolizumab (anti-PD-L1) o Pembrolizumab, (anti-PD1) en combinación con QT para el tratamiento del CMTN localmente avanzado o metastásico. No obstante, para la aplicación de este tratamiento, al igual que el de la terapia dirigida, se requiere estudio previo de marcadores, como el PDL-1 por inmunohistoquímica.

## 1.2 Sistema inmunitario

El sistema inmunitario (SI) constituye una intrincada red de moléculas y células que trabajan en conjunto para mantener y restablecer la homeostasis en los distintos tejidos del cuerpo. En la actualidad se reconoce su valor e importancia no solo por su capacidad para distinguir entre componentes propios y extraños al organismo, sino también por su habilidad para detectar señales de peligro, sin importar su origen. Por tanto, cumple las siguientes funciones:

- Defensa ante microorganismos patógenos, parásitos y células neoplásicas.
- Vigilancia del funcionamiento normal celular.
- Autorregulación del propio sistema.

El SI se divide en dos grupos principales: el sistema innato y el adaptativo. El **sistema innato (SII)**, como su nombre indica, está presente desde el nacimiento y responde inicialmente a los antígenos. Su respuesta es menos específica, más lenta, y la mayoría de sus componentes carecen de memoria inmunológica. En cambio, el **sistema adaptativo (SIA)** requiere maduración y selección previa, y aunque su activación es más lenta, una vez activado, lo hace de manera más rápida y eficiente. Además, presenta memoria inmunológica (Copioi, 2018).

El SII constituye la primera barrera de defensa del organismo. Este sistema cuenta con mecanismos preexistentes que se activan de manera rápida, precediendo a la respuesta defensiva del SIA. El SII reacciona de manera uniforme ante diversos estímulos infecciosos y muestra una especificidad limitada, es decir, reconoce patrones comunes a grupos de microorganismos sin distinguir diferencias sutiles entre ellos. Se trata de un sistema ancestral que se encuentra presente en todos los organismos multicelulares, incluyendo plantas e insectos. Sus principales componentes son los neutrófilos y macrófagos, encargados de destruir y degradar los patógenos mediante la fagocitosis, las células *natural killer* (NK), que reconocen aquellas células que han perdido el MHC I y las destruyen, y diversos factores solubles como el sistema del complemento y las citoquinas. Por último, otro elemento importante de la inmunidad innata son los receptores tipo Toll que se expresan en células del SI (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T y B). Son los encargados de reconocer estructuras de los patógenos altamente conservadas, llamadas patrones moleculares de agentes microbianos (PMM) para estimular la respuesta inmunitaria.

En relación con el SIA hay que señalar que es específico, reconoce varios tipos de antígenos y responde a una amplia variedad de éstos. Se caracteriza por mejorar la capacidad defensiva frente a exposiciones sucesivas y generar una respuesta especializada para cada tipo de microorganismo. Posee dos tipos de respuestas inmunitarias: la inmunidad celular y la inmunidad humoral:

- La inmunidad celular es el mecanismo principal de defensa contra microorganismos intracelulares y está mediada por los linfocitos T los cuales se dividen en dos subpoblaciones: linfocitos T CD4+, cuya principal función es secretar citoquinas y los linfocitos T CD8+ que eliminan células infectadas y tumorales. Los linfocitos T CD4+ reciben el nombre de “*helper*” o colaboradores y son los responsables de activar y regular la respuesta adaptativa. Su activación se produce cuando reconoce su antígeno presentado a través del MHC II en el ganglio y lo reconoce a través de su receptor TCR. Tras su activación, se produce una cascada de citoquinas que estimula a los macrófagos para eliminar los microorganismos fagocitados y a los linfocitos B para secretar anticuerpos. Por otra parte, los linfocitos T CD8+ se activarán tras reconocer con su receptor TCR el antígeno presentado a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-I y liberarán gránulos preformados con sustancias citotóxicas para eliminar las células infectadas o tumorales.

- La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a patógenos extracelulares. Está mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas, las cuales son secretadas por los linfocitos B que residen y circulan en el bazo y los ganglios. Tras el primer contacto del linfocito B (receptor BCR) con su antígeno específico se produce la activación y diferenciación de éste a un clon de células plasmáticas que fabrican y excretan grandes cantidades de anticuerpos específicos contra el antígeno presentado previamente. Este proceso recibe el nombre de selección y expansión clonal. Así, la respuesta provocada tras el primer contacto de cada antígeno con el linfocito B (respuesta primaria) confiere memoria inmunológica específica. En una segunda infección por el mismo agente, habrá células B de memoria que se crearon paralelamente al clon de células plasmáticas en la primera exposición. De modo, que la respuesta secundaria será más rápida e intensa.

### 1.3 Relación entre el sistema inmunitario y el cáncer

El SI desempeña un papel esencial al proteger nuestro organismo contra sustancias nocivas o extrañas, lo que incluye la defensa contra el desarrollo y la propagación del cáncer. Como ya se ha mencionado al inicio, el cáncer se caracteriza por la acumulación de un número variable de alteraciones genéticas, las cuales resultan en la formación de neoantígenos, que provocarán la activación del SI al ser presentados en la superficie de las células neoplásicas. De este modo, la generación de una respuesta antitumoral efectiva, que consiga erradicar las células malignas, es un proceso cíclico que puede autopropagarse y provocar una acumulación de factores inmunoestimulantes que amplifiquen las respuestas de las células T (Chen & Mellman, 2013).

#### 1.3.1 Teoría de la inmunovigilancia

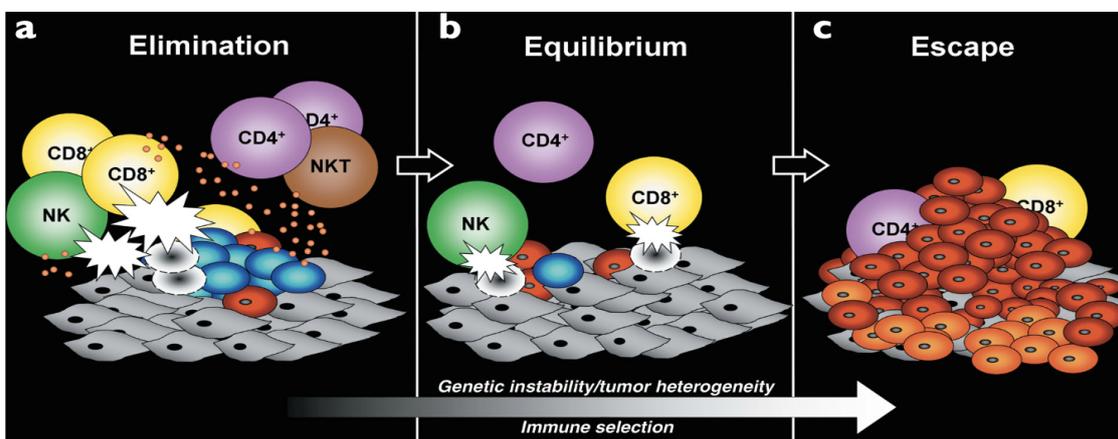
A principios del siglo XX, Paul Erlich planteó la idea de que el SI podía reprimir el crecimiento tumoral, pero no fue hasta mediados del siglo XX cuando Mc Farlane Burnet y Lewis Thomas retomaron su idea y postularon que el SI tenía la capacidad de reconocer las células neoplásicas o pre-neoplásicas y eliminarlas antes de su transformación completa mediante un proceso denominado inmunovigilancia o ciclo cáncer-inmunidad (Dunn et al., 2002; Chen & Mellman, 2013).

Los estudios pioneros describen que durante el proceso de inmunovigilancia se manifiestan las siguientes etapas: en primer lugar, los neoantígenos generados durante la oncogénesis son liberados y capturados por las células presentadoras de antígenos (CPA), como las células dendríticas, las cuales los procesan y los presentan en su superficie acoplados en sus MHC I y II. Posteriormente, los linfocitos T los reconocen (en presencia de señales que impidan la tolerancia periférica de los neoantígenos), se activan y se desplazan a través del torrente sanguíneo hacia el lecho tumoral. Es allí donde identifican específicamente los neoantígenos unidos al MHC I /MHC II en las células cancerosas mediante su receptor TCR. Finalmente, los linfocitos T inducen la muerte de las células malignas, las cuales, a su vez, liberan más antígenos asociados al tumor, amplificando la respuesta inmunitaria en las etapas posteriores del ciclo. Sin embargo, esta teoría de la inmunovigilancia no conseguía explicar todos los casos y se reformuló posteriormente, de manera que quedó incluida dentro de la teoría de la inmunoedición (Teoría de las tres "Es") (Dunn et al., 2002).

### 1.3.2 Teoría de la Inmunoedición

La teoría de la inmunoedición puede considerarse como un refinamiento de la anterior, pues tiene una visión más amplia de las interacciones entre el SI y el tumor al reconocer su papel protector del huésped y remodelador del tumor. El mecanismo de inmunoedición comprende tres fases (Dunn et al., 2002) (**Figura 6**):

- **Fase de eliminación.** Corresponde a la inmunovigilancia. Los componentes del SII y SIA actúan de forma simultánea para detectar los neoantígenos y destruir las células tumorales.
- **Fase de equilibrio.** En el caso de que esta eliminación sea parcial, como ocurre en la mayoría de los casos, se genera un estado de equilibrio dónde las células neoplásicas permanecen quiescentes o acumulando alteraciones génicas para modular la expresión de los antígenos específicos de tumor. De este modo el SI ejerce una presión selectiva que provoca la destrucción de los clones más susceptibles.
- **Fase de escape.** En esta fase, la presión de selección que ha ejercido el SI sobre las células inestables lleva a la generación de variantes tumorales que no son reconocidas, de modo que estas escapan de sus mecanismos efectores.



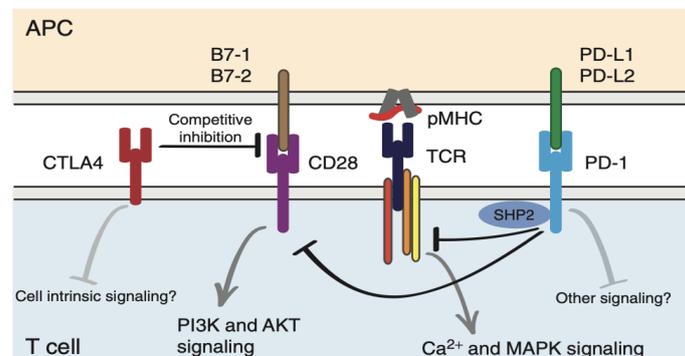
**Figura 6.** Esquema representativo de las fases de la teoría de la inmunoedición. A) Fase de eliminación. (B) Fase de equilibrio y (C) Fase de escape tumoral. En la imagen se representan las células tumorales en desarrollo (azul), las variantes de células tumorales (rojo) y el estroma subyacente junto a células no transformadas (gris). Asimismo, se observan variantes adicionales del tumor (naranja). Los pequeños círculos naranjas representan diversas citoquinas y factores solubles liberados al microambiente tumoral. Los destellos blancos representan la actividad citotóxica de los linfocitos contra las células tumorales. (Dunn et al., 2002)

### 1.3.3 Puntos de control inmunológico

Los puntos de control inmunitario son proteínas que se encuentran expresadas especialmente en las células del SI. La función de estas proteínas es regular la respuesta inmunitaria, garantizando la tolerancia a los antígenos propios y evitando la autoinmunidad excesiva. En el contexto del cáncer, estas proteínas son aprovechadas por las células tumorales para evadir la detección y el ataque del SI. De modo que, la manipulación y bloqueo de estos puntos de control se ha posicionado como una estrategia prometedora para potenciar la respuesta inmunitaria contra el cáncer. Entre los puntos de control más estudiados destacan: CTLA-4 y PD-1, así como sus ligandos PD-L1 y PD-L2. No obstante, dentro de este grupo destacan otras proteínas menos conocidas como HHLA2 (B7H7/B7-H5/B7), KIR3DL3 y TMIGD2 (IGPR-1/CD28H) (Wei et al., 2018)

En primer lugar, **CTLA-4** es una proteína transmembrana de la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en la superficie de los linfocitos T. Alcanza su máxima expresión entre 2 y 3 días después de la activación. Este receptor atenúa la señalización del TCR y, por ende, la respuesta inmunitaria, compitiendo con la molécula coestimuladora CD28 por los ligandos B7-2 (CD86) y B7-1 (CD80), para los cuales CTLA-4 tiene una mayor avidéz y afinidad. La unión de estos ligandos al receptor CD28 desencadena señales coestimuladoras positivas, de modo que la inhibición competitiva de ambas moléculas por parte del receptor CTLA-4 es necesaria para atenuar eficazmente la reacción inmunitaria (activación de linfocitos T). La regulación al alza de la expresión de CTLA-4 durante la activación de los linfocitos T, junto con la liberación del CTLA-4 contenido en vesículas intracelulares al sincitio inmunológico y la mayor afinidad/avidéz por los ligandos elimina la señal de coestimulación positiva de CD28 (**Figura 7**). Este hecho permite una regulación robusta de la amplitud de la señal del TCR, y, por lo tanto, de la actividad de los linfocitos T.

Otro punto de control inmunitario es el receptor **PD-1**, que se encuentra distribuido en la superficie de los linfocitos T, B y células dendríticas. Sus funciones principales son mantener la tolerancia periférica y regular las respuestas de los linfocitos T dentro de un rango fisiológico deseado. PD-1 se expresa tras la activación de los linfocitos T con el objetivo de regular su activación a través de la interacción con sus ligandos, PD-L1 y PD-L2. La expresión de PD-L1 y, en menor medida, de PD-L2 se induce en respuesta a citoquinas inflamatorias como el IFN $\gamma$ . Así pues, la regulación de la actividad de los linfocitos T por PD-1 ocurre en respuesta a la función citotóxica y efectora de los linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos CD8 y células T colaboradoras tipo 1 (Th1) de manera inducible. Tras la interacción con PD-L1 y PD-L2 se cree que PD-1 transmite principalmente una señal inhibitoria a través de la fosfatasa de tirosina SHP2 para atenuar la activación de los linfocitos T (**Figura 7**).



**Figura 7.** Esquema de los mecanismos moleculares de acción de CTLA-4 y PD-1. Se esboza la progresión paso a paso de la activación de los linfocitos T y la atenuación por los mecanismos reguladores normales. (Wei et al., 2018)

Otra opción para el control inmunitario es el gen humano **HHLA2** (*B7H7/B7-H5/B7*), el cual se encuentra en la región q13.13 del cromosoma 3 y está cerca de los genes B7-1 y B7-2 (q13.3-q21). El ligando HHLA2 (retrovirus endógenos humanos – proteína 2 de asociación de repetición de terminal largo), también llamada B7H7/B7-H5/B7, ha sido designada como un nuevo miembro de la familia B7 de ligandos inmunoreguladores, compartiendo del 23% al 33% de la secuencia aminoacídica con otras moléculas de dicha familia. Este ligando es el único de la familia que se encuentra únicamente en humanos y no está presente en ratones (Janakiram et al., 2015). HHLA2 está compuesto por un ectodominio IgV-IgC-IgV en tándem, seis sitios potenciales para la glicosilación ligada a N, una región transmembrana y una cola citoplasmática de 49 aminoácidos (**Figura 8**).



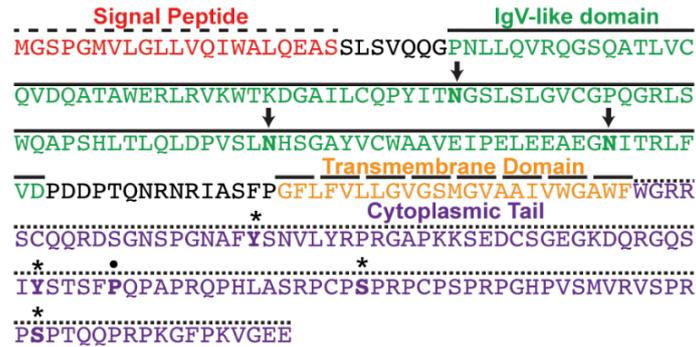
**Figura 8.** Secuencia aminoacídica del ligando HHLA2. Se identifica el péptido señal previsto, los dominios de tipo IgV y tipo IgC, la región transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína HHLA2 humana. Se destacan los sitios potenciales de N-glicosilación con flechas. (Zhao et al., 2013)

En condiciones fisiológicas se expresa únicamente en las células trofoblásticas de la placenta y en el epitelio bronquial, pancreático, del riñón (epitelio tubular), del intestino, de la vesícula biliar y de la glándula mamaria (epitelio ductal), pero no en los demás órganos. En la mayoría de los tejidos sanos, el ligando HHLA2 no se expresa endógenamente. Asimismo, esta proteína se encuentra expresada de manera constitutiva en la superficie de las CPA, como los monocitos, y se induce en los linfocitos B en respuesta a estímulos como el lipopolisacárido (LPS) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Janakiram et al., 2015; Zhao et al., 2013). También se ha observado su expresión en linfocitos T CD4+ y CD8+ exhaustos, particularmente en linfocitos Th1 y en células tumorales (Luu et al., 2021).

Estudios recientes han demostrado tanto su capacidad coestimuladora como la coinhibidora de la respuesta inmunitaria. De este modo, dependiendo del receptor al que se una causará un efecto u otro. El efecto coestimulador de HHLA2 sobre las células T y las células NK está mediado a través del receptor transmembrana TMIGD2; también conocido como CD28H e IGPR1. Por otro lado, el efecto coinhibidor parece ser producido a través de la interacción del ligando con el receptor KIR3DL3.

Además de actuar como punto de control inmunitario, se les ha adjudicado roles no inmunológicos fundamentales en la regulación de la adhesión, proliferación, migración e invasión celular (Rieder et al., 2021). Como molécula de adhesión, participa en la regulación de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y en la interacción de los linfocitos T primarios con la matriz extracelular.

El gen **TMIGD2** (IGPR-1/CD28H) codifica un receptor que consta de un dominio extracelular de inmunoglobulina con tres posibles sitios de glicosilación dependiente de N, una región transmembrana y una cola citoplasmática con cuatro sitios potenciales para la fosforilación, así como un posible sitio de reconocimiento del dominio SH3 (**Figura 9**).

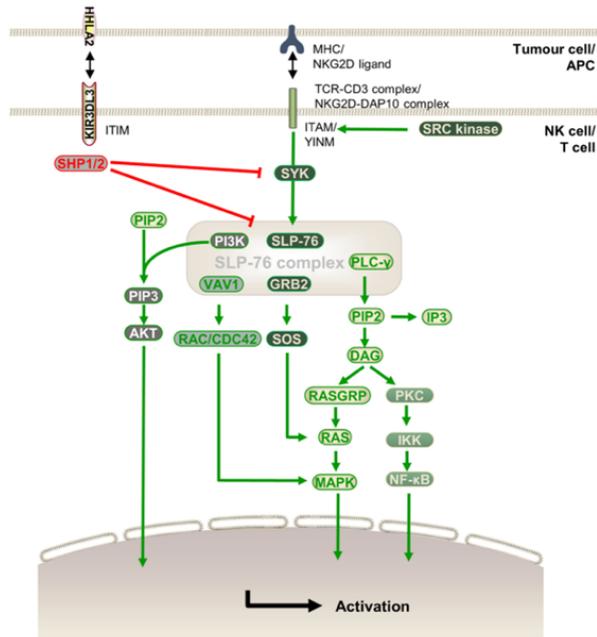


**Figura 9.** Secuencia aminoacídica de *TMIGD2*. Se compone de un péptido señal, un único dominio de inmunoglobulina extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Los tres sitios predichos de glicosilación ligada a N dentro del dominio de inmunoglobulina indican en flechas y cuatro sitios de fosforilación predichos indicados con un asterisco y un posible dominio de unión a SH3 dentro de la cola citoplasmática señalado con un punto. (Janakiram et al., 2015)

Al analizar la secuencia del receptor *TMIGD2* se observó que tanto el receptor 1 rico en prolina que contiene inmunoglobulinas (*IGPR-1*) y el homólogo de *CD28* (*CD28H*), eran la misma molécula. Inicialmente, *IGPR-1* se identificó como una molécula de adhesión implicada en la angiogénesis; sin embargo, posteriormente se descubrió el papel de *CD28H* como receptor. Por lo tanto, *TMIGD2/IGPR-1/CD28H* constituye uno de los receptores de *HHLA2* con una amplia expresión en los órganos linfoides, timo bazo, linfocitos de sangre periférica e hígado. Se expresa en células T *naïve* *CD4+* y *CD8+* simples y dobles, pero no en células *CD4+* y *CD8-* doblemente negativas inmaduras. También se expresa en células mononucleares de sangre periférica y en células NK vírgenes (Zhu et al., 2013). Asimismo, *TMIGD2*, a través de la interacción con *HHLA2*, coestimula las células T en el contexto de la activación mediada por TCR mejorando la proliferación de estas células y la producción de citoquinas a través de una cascada de señalización dependiente de *AKT* (Wei et al., 2021). Tras la activación el receptor se modula negativamente.

Por último, el punto de control denominado **KIR3DL3** es un miembro en gran medida no caracterizado de la familia *KIR* que contienen un motivo inhibitor basado en dominios de tirosina (*ITIM*). Se expresa en células T *CD8+* de memoria efectoras terminalmente diferenciadas y en la subpoblación de células *NK CD56<sup>bright</sup>*. *KIR3DL3* mostró actividades inmunosupresoras al reclutar el dominio 2 de homología *Src* que contiene fosfatasa-1 (*SHP-1*) y *SHP-2* para atenuar el factor de intercambio de nucleótidos de guanina *Vav 1* (*Vav1*), la quinasa regulada por señales extracelulares (*ERK1/2*), la proteína quinasa B (*PKB*, también conocida como *AKT*) y señalización del factor nuclear  $\kappa$ B (*NF- $\kappa$ B*) en las células *NK* (**Figura 10**) (Li et al., 2023).

Se considera, además, un receptor de punto de control inmunitario, ya que al reconocer al ligando *HHLA2*, éste desencadena una respuesta coinhibidora. Inhibe la activación de las células *NK* y la proliferación de los linfocitos T en presencia del receptor TCR, así como la producción de las citoquinas, *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , *IL-5*, *IL-10*, *IL-13*, *IL-17a* e *IL-22* (Zhao et al., 2013).



**Figura 10.** Vía de señalización de KIR2DL3. La flecha bidireccional simboliza la interacción entre el receptor y el ligando, siendo el grosor de la flecha indicativo de la intensidad de la acción. Aquí se detallan las cascadas de señalización intrínseca del TCR o NKG2D, responsables de activar los linfocitos T y células NK, respectivamente. Asimismo, se detalla el mecanismo de acción mediante el cual HHLA2 es capaz de inhibir a las células inmunitarias a través de KIR3DL3. (Li et al., 2023)

## 2. ANTECEDENTES

En los últimos años, la inmunoterapia ha demostrado ser beneficiosa en varios tipos de tumores malignos, como el melanoma, los carcinomas renales y de vejiga, entre otros. Esta terapia, también conocida como terapia biológica, se enfoca en reactivar los procesos inmunológicos antitumorales del huésped utilizando inmunomoduladores, como interferones e interleuquinas, desarrollando vacunas y realizando transferencia de células T, entre otras técnicas. Aunque históricamente el CM no se consideraba tradicionalmente inmunogénico, el subtipo CMTN muestra una mayor inmunogenicidad ya que suele presentar un mayor porcentaje de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), lo que sugiere que la administración de inmunoterapia podría ser una estrategia óptima.

Hasta hace poco, el tratamiento sistémico del CMTN metastásico consistía únicamente en QT o, en algunos países en combinación con bevacizumab, y en inhibidores de la [poli (ADP-ribosa) polimerasa] (PARP) en pacientes con mutaciones germinales en los genes *BRCA1/2*. No obstante, debido a la mayor activación del SI en CMTN se han desarrollado diferentes ensayos clínicos que han evaluado la eficacia y la seguridad de anticuerpos contra PD-L1 y su receptor PD-1.

En el CM, la expresión de PD-L1 tanto en las células tumorales como en células inmunitarias infiltradas en el tumor, puede contribuir a la evasión de la respuesta inmunitaria, convirtiéndola en una diana terapéutica atractiva. Por esta razón se han desarrollado diversos ensayos clínicos (fase III) con anticuerpos monoclonales en combinación con QT para bloquear este ligando: Atezolizumab (IMpassion 130) y Pembrolizumab (Keynote-355).

En el estudio IMpassion 130 se evaluó la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global en pacientes tratadas con atezolizumab combinación con QT frente a pacientes tratadas únicamente QT. De los 902 pacientes en el estudio, 451 recibieron atezolizumab + nab-paclitaxel y 451 recibieron placebo + nab-paclitaxel. Se incluyeron un total de 185 pacientes que recibieron atezolizumab + nab-paclitaxel con tumores que contenían células inmunitarias que expresaban PD-L1, y 184 pacientes que recibieron placebo + nab-paclitaxel, cuyos tumores tenían expresión de PD-L1. El tratamiento con atezolizumab se asoció a una mejoría en SLP tanto en la población total tratada con atezolizumab (7,2 frente a 5,5 meses; HR: 0,8,  $p < 0,001$ ) como en la subpoblación que expresaba PD-L1+ (7,5 frente a 5 meses; HR: 0,62,  $p < 0,001$ ) (Schmid et al., 2018).

En el ensayo clínico KEYNOTE-355, también se evaluó la SLP al combinar el anticuerpo Pembrolizumab con QT. Un total de 847 pacientes fueron aleatorizadas: 566 fueron asignadas al grupo de Pembrolizumab-QT y 281 al grupo de placebo-QT. La combinación de Pembrolizumab y QT mejoró significativamente la SLP en pacientes con un alto grado de expresión de PD-L1 (9,7 frente a 5,6 meses; HR: 0,65,  $p = 0,0012$ ) (Cortes et al., 2020).

Como se ha descrito anteriormente, y teniendo en cuenta sus funciones en la activación e inhibición del SI, la vía *HHLA2-TMIGD2/KIR3DL3* ha surgido como un objetivo terapéutico relevante en el tratamiento de diferentes tumores. En este sentido se ha desarrollado el fármaco NPX267, un anticuerpo monoclonal de primera clase que bloquea el receptor *KIR3DL3* con alta afinidad revirtiendo la supresión de las células T y mejorando la citotoxicidad mediada por células NK contra células tumorales *HHLA2+*. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de la señalización de *KIR3DL3-HHLA2* puede potenciar la respuesta inmunitaria contra ciertos tipos de cáncer, destacando el potencial de NPX267 como un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer (Lamb et al., 2022).

Recientemente, se evaluó una posible terapia con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) optimizado para ser potente y persistente (TOP). Esta terapia incorporó el dominio coestimulador de TMIGD2, activador de células T y NK, junto con anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio IgV de B7-H3, un punto de control inmunitario presente en tumores sólidos y en su vascularización. Mecánicamente, la estimulación de TMIGD2 mantenía el metabolismo mitocondrial, producía menos citoquinas y establecía menos células agotadas, más células de memoria central y una mayor proporción de células T CD8/CD4 (Nishimura et al., 2024).

A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos inmunológicos y la identificación de nuevos objetivos terapéuticos, aún quedan muchos aspectos por descubrir en relación con los subtipos moleculares del CM, así como con las características clínico-patológicas del tumor y el pronóstico de las pacientes. La interacción compleja entre el sistema inmunológico y las células neoplásicas plantea desafíos continuos en la identificación de factores relevantes para el desarrollo del tumor. Por lo tanto, es esencial seguir investigando para expandir nuestro conocimiento y mejorar la precisión en el abordaje de cada subtipo molecular de CM.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

Basándose en el papel coestimulador de *HHLA2* y *TMIGD2* en el microambiente tumoral, se espera obtener un perfil génico de estos puntos de control inmunitarios y poder correlacionarlos con los diferentes subtipos de CM y sus características clinicopatológicas. El trabajo pretende explorar cómo la expresión diferencial de estos genes influye en la biología del tumor y su evolución clínica. En concreto, es esperable observar una asociación entre la sobreexpresión de *HHLA2* y *TMIGD2* y la posibilidad de que puedan ejercer un papel como marcadores pronósticos en la supervivencia de las pacientes diagnosticadas con CM.

#### 3.2 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es cuantificar la expresión génica relativa de diferentes puntos de control inmunitario en una serie clínica de pacientes diagnosticadas con carcinoma infiltrante de mama.

Para llevar a cabo este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la expresión relativa de *HHLA2* y *TMIGD2* en una serie clínica de 151 pacientes con CM, abarcando diversos fenotipos.
- Investigar la asociación de los resultados de expresión génica con diversos factores clinicopatológicos.
- Analizar la correlación entre los datos de expresión génica y el pronóstico de las pacientes, mediante el estudio de la supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE)

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Diseño del estudio

El presente estudio es un proyecto observacional retrospectivo realizado en el Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL). Los experimentos se realizaron siguiendo las normas establecidas en la Declaración de Helsinki, garantizando la protección y el bienestar de las pacientes participantes. Además, para la elaboración del presente trabajo se han tenido en cuenta las guías REMARK (Recomendaciones para la presentación de estudios de biomarcadores tumorales pronósticos) para estudios de biomarcadores tumorales pronósticos (Hayes et al., 2023) y MIQE (Información Mínima para la Publicación de Experimentos de PCR Cuantitativa en Tiempo Real) para asegurar la precisión y reproducibilidad de los datos de expresión génica obtenidos (Bustin et al., 2009).

### 4.2 Número de sujetos

En el estudio se incluyeron un total de 151 pacientes diagnosticadas con CM infiltrante, las cuales fueron tratadas en el Hospital General Universitario Dr. Balmis de Alicante (HGUDrB) entre los años 1994 y 2021. Se seleccionaron pacientes con un seguimiento clínico de al menos 1 año para garantizar la disponibilidad de datos de seguimiento para el análisis pronóstico.

El material de análisis fue cedido por el biobanco de tumores sólidos del HGUDrB en secciones y cilindros representativos de tejido tumoral fijados en formol y embebidos en parafina. Estas muestras fueron previamente clasificadas según el fenotipo CM, mediante la revisión histológica e inmunohistoquímica llevada a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica del HGUDrB .

Los correspondientes consentimientos informados de las pacientes incluidas en este estudio, así como los informes de seguimiento clínico, fueron recogidos por los especialistas de los Servicios de Ginecología y Obstetricia y Oncología Médica del HGUDrB. La recogida, tratamiento y uso de los datos requeridos por el estudio se hicieron de acuerdo con lo estipulado en Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, así como a lo estipulado en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). En este sentido, todas las pacientes fueron identificadas mediante códigos anonimizados e incluidas en una base de datos, a la cual sólo tenía acceso el personal directamente relacionado con el proyecto de investigación. Además, en ningún caso se utilizó la información recogida en el estudio para modificar la planificación terapéutica de las pacientes.

#### 4.2.1 Criterios de inclusión

Las pacientes incluidas en el estudio fueron pacientes diagnosticadas de CM infiltrante operable, de al menos 10 mm de tamaño, estadios I-III y con un seguimiento clínico mínimo de un año. Además, estas pacientes no podían haber recibido QT, RT, u hormonoterapia previa a la intervención quirúrgica.

#### 4.2.2 Criterios de exclusión

Las pacientes con estadios avanzados (IV), diagnosticadas de carcinoma *in situ* o que recibieron tratamiento sistémico primario (neoadyuvancia), fueron excluidas del estudio. Del mismo modo, fueron excluidas las muestras de tejido tumoral inadecuadas o insuficientes para los estudios moleculares.

#### 4.2.3 Variables de estudio

Todas las variables del estudio se recopilaron de los informes de seguimiento clínico realizados por los/las profesionales del Servicio de Ginecología y Obstetricia, Oncología Médica y Anatomía Patológica del HGUDrB. Las variables analizadas pueden clasificarse en cuatro grupos: variables clínicas, patológicas, inmunohistoquímicas y moleculares.

##### Variables Clínicas:

- **Edad:** Se documentó la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico (Variable cuantitativa discreta).
- **Sexo:** Se registró el sexo de los pacientes, aunque en la mayoría de los casos se trata de mujeres, dada la prevalencia de CM en este grupo (Variable cualitativa dicotómica).
- **Fecha de diagnóstico:** Fecha en la que se diagnosticó el CM (Variable cuantitativa discreta).
- **Fecha de la Intervención Quirúrgica:** Fecha en la que se realizó la intervención quirúrgica (Variable cuantitativa discreta).
- **Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE):** Periodo transcurrido (en meses) desde la fecha de diagnóstico hasta la aparición de recidiva local y/o metástasis a distancia (Variable cuantitativa discreta).
- **Supervivencia Global (SG):** Periodo transcurrido (en meses) desde la fecha de diagnóstico hasta el fallecimiento de la paciente (Variable cuantitativa discreta).

##### Variables Patológicas:

- **Tamaño del tumor:** Se midió el tamaño del tumor primario en centímetros (cm) (Cuantitativa continua).
- **Grado de diferenciación:** Grado de diferenciación celular del tumor I, II y III (Variable cualitativa ordinal).
- **Tipo Histológico:** Clasificación del tumor en CDI, CLI, CI mixto y subtipos especiales (Variable cualitativa nominal).
- **Invasión linfo-vascular:** Ausencia o presencia de infiltración tumoral en los vasos sanguíneos o en el sistema linfático (Variable cualitativa dicotómica).
- **Necrosis:** Presencia o ausencia de necrosis en el tumor (Variable cualitativa dicotómica).
- **Afectación ganglionar:** Presencia o ausencia de afectación de los ganglios linfáticos (Variable cualitativa dicotómica).
- **Porcentaje de linfocitos infiltrados en el tumor (TILs):** Evaluación de la infiltración linfocítica en el tumor (Variable cuantitativa continua).

##### Variables Inmunohistoquímicas:

- **Fenotipo:** Clasificaron del tumor en Luminal A (Lum A), Luminal B (Lum B) HER2 positivo (HER2+), HER2 puro y CMTN (Variable cualitativa nominal).
- **Ki67:** Expresión del marcador de proliferación celular Ki 67 en bajo (<15%), intermedio (15-19%) y alto (>19%) (Variable cualitativa ordinal).

#### VARIABLES MOLECULARES:

- **Expresión génica:** Cuantificación de la expresión génica de *HHLA2* y *TMIGD2* mediante qPCR (Variable cuantitativa continua).

#### 4.3 Aislamiento de ARN

Para llevar a cabo la extracción de ARN a partir del tejido tumoral embebido en parafina, primero se fragmentaron los cilindros y se disolvieron en 600 µl de aceite mineral (Sigma-Aldrich) durante 2 minutos a 95 °C. De este modo, la parafina se derritió y pudo ser eliminada como un sobrenadante junto con el aceite tras una centrifugación a 1200 rpm durante 3 minutos. A continuación, se repitió el procedimiento con un segundo lavado de 350 µl de aceite.

Tras la eliminación completa del aceite y la parafina, el tejido se sometió a un proceso de lisis enzimática mediante la adición de 140 µl de buffer PKD y 20-40 µl de Proteinasa K, según la cantidad de tejido desparafinado, siguiendo el protocolo del kit RNeasy FFPE (Qiagen, Hilden, Alemania). Para una disgregación completa del tejido, las muestras se incubaron en un termobloque a 56°C durante toda la noche en agitación a 300 rpm. Al día siguiente, se comprobó que todas las muestras estaban disgregadas y se incubaron durante 15 minutos a 80°C para inhibir la acción de la Proteinasa K. Transcurrido este tiempo, las muestras se incubaron en hielo durante tres minutos y se centrifugaron a 13500 rpm durante 15 minutos. A continuación, se recogió el sobrenadante y se le añadió una solución previamente preparada con DNasa I (10 µl de DNasa y 16 µl de Booster buffer). Posteriormente, se homogenizó y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar todo el DNA presente en la muestra.

Seguidamente, se añadieron 320 µl de solución RBC y 720 µl de etanol al 100%, se homogenizó y se transfirieron 700 µl de la muestra mezclada con los disolventes a la columna. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 segundos, se descartó el líquido del tubo colector y se repitió el proceso hasta finalizar todo el volumen de muestra. Se añadieron 500 µl de solución RPE y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 segundos. Este proceso se repitió, pero esta vez centrifugando durante 2 minutos. Finalmente, se descartó el tubo colector y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Una vez realizado todo este procedimiento, se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

#### 4.4 Cuantificación y control de calidad del ARN

La cuantificación del material genético extraído se realizó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), utilizando la absorbancia UV en tres longitudes de onda clave: 230 nm, 260 nm y 280 nm. La absorbancia a 260 nm es utilizada para cuantificar la concentración de ácidos nucleicos, ya que el ADN y ARN tienen un máximo de absorción en esta longitud de onda. La absorbancia a 280 nm mide la presencia de proteínas, mientras que la absorbancia a 230 nm detecta contaminantes como sales y compuestos orgánicos. Este método permite determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos. Además, se llevó a cabo un segundo control de calidad utilizando el sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Este instrumento permite conocer la concentración y la integridad de las muestras de ARN a partir de la combinación de técnicas de electroforesis capilar y fluorescencia. El resultado final del análisis se representa en un electroferograma en el que la cantidad de fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de ARN de un tamaño determinado. El equipo además nos proporciona dos valores para evaluar la calidad las muestras: el RINe, que permite medir la integridad del ARN en base a un rango

numérico del 1 (ARN totalmente degradado) al 10 (ARN intacto), y el DV200, definido como el porcentaje de fragmentos de ARN por encima de 200 nucleótidos respecto al total de fragmentos. Dado que se ha demostrado que los valores RINe de muestras de tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina no son una medida sensible de la calidad del ARN (455), en este estudio sólo se han utilizado los valores de DV200 como criterio de calidad. De esta forma, y siguiendo las recomendaciones de Illumina (455), se seleccionaron todas aquellas muestras que obtuvieron un valor de DV200 igual o superior al 30%. Las muestras que no cumplieron este criterio de calidad fueron descartadas del estudio.

#### 4.5 Reacción de retrotranscripción

Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit comercial *Hight Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific). El kit está compuesto por *random primers 10X*, un cocktail de oligonucleótidos (generalmente de 6 nucleótidos) de secuencia variada que se unen de manera aleatoria a lo largo de la secuencia de ARN con el objetivo de aumentar la protección del ARN mensajero y otorgar mayor estabilidad. A continuación, se añadió 2 µl de los *primers* y se incubaron las muestras a 60 °C durante 10 minutos para eliminar las estructuras secundarias del ARN y aquellos micro ARNs no reconocidos por los cebadores. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron el resto de los componentes de la reacción: 2 µl de RT- Buffer 10X, 0,8 µl de dNTPs 25X, 4,2 µl de agua libre de ARNasas y 1 µl de la enzima MultiScribe 50 U/µl. Se homogenizó y se introdujo en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Una vez finalizada la reacción, las muestras de ADNc fueron diluidas a 20ng/µl y se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación por qPCR.

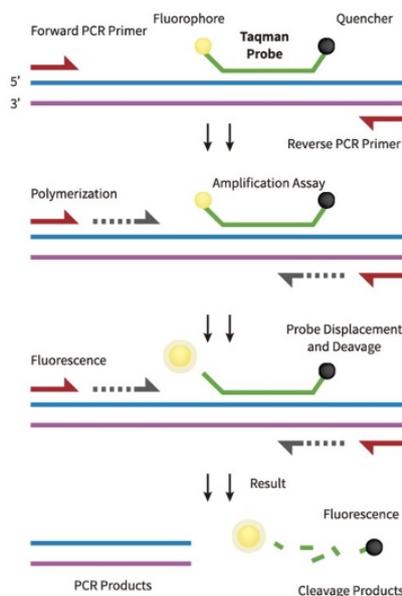
#### 4.6 Reacción de amplificación a tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real es una modificación de la PCR convencional, en la que los procesos de amplificación y detección se producen simultáneamente en el mismo vial cerrado, sin necesidad de acciones posteriores. Mediante la detección por fluorescencia, se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento durante la amplificación, ya que la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores utilizados para la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas de manera especial para este propósito.

En este estudio, se emplearon sondas TaqMan® (Thermo Fisher Scientific) de longitud corta y hibridación interexónica (**Tabla 2**). Esta elección se debió a la procedencia del material genético, cuyas muestras han sido sometidas a procesos de parafinación y desparafinado, lo cual incrementa la susceptibilidad de fragmentación. De este modo, al hibridar en la región interexónica, se logra aumentar la efectividad y precisión en la detección del gen (exón).

Gen a estudiar	Ensayo TaqMan	Tamaño del amplicón (pares de bases)
<i>HHLA2</i>	Hs00978112_m1	91
<i>TMIGD2</i>	Hs00758270_m1	69
<i>PUM1</i>	Hs00472881_m1	77
<i>ACT-β</i>	Hs99999903_m1	171

**Tabla 2.** Ensayos TaqMan utilizados para la amplificación de cada gen y su respectiva longitud en tamaño de pares de bases (Elaboración propia).



**Figura 11.** Mecanismo de una sonda TaqMan. La polimerasa Taq escinde la sonda marcada, liberando el fluoróforo del quencher y emitiendo fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN amplificado (Yoder, 2023).

Estas sondas emiten fluorescencia mediante la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa Taq, que escinde la sonda por el extremo 5', permitiendo así que el fluoróforo se separe del *quencher* y se detecte la fluorescencia. El fluoróforo, unido covalentemente al extremo 5', actúa como donador de fluorescencia. Una vez escindida la sonda, el *quencher* ya no puede absorber la emisión del donador debido al aumento de la distancia entre ambos. De este modo, el detector de la PCR puede captar la fluorescencia emitida por el donador (**Figura 11**).

Para la reacción de amplificación en tiempo real se utilizaron placas de 96 pocillos de Thermo Fisher Scientific. A cada pocillo se le añadieron 5 µl de master mix (TaqMan® *Fast Advanced Master Mix*, Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl de la sonda correspondiente, 2 µl de agua molecular y 2,5 µl de cDNA de la muestra a analizar. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Quant Studio™ 12K Flex de Applied Biosystem siguiendo los siguientes pasos:

- **Paso 1:** 2 minutos a 50°C para llevar a cabo de manera óptima la degradación de productos inespecíficos o contaminaciones de productos de PCRs previas mediante la activación de la enzima Uracil-N-Glicosilasa, la cual se encuentra presente en la *Master Mix*.
- **Paso 2:** 2 minutos a 95°C para activar la AmpliTaq™ Fast ADN Polimerasa.
- **Paso 3:** 40 ciclos con las siguientes condiciones:

- 3 segundos a 95°C para producir la desnaturalización del ADNc, dando lugar a 2 cadenas que van a poder interactuar con los *primers* y las sondas correspondientes.
- 30 segundos a 60°C para la síntesis de ADN a partir de la elongación de los *primers* presentes en las cadenas anteriormente desnaturalizadas, que actúan como molde.

Los resultados de la amplificación se expresan en términos del valor umbral o Ct (*Threshold Cycle*), que representa el ciclo en el cual el termociclador detecta la fluorescencia producida por la sonda TaqMan®. Este valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADNc presente en la muestra. En otras palabras, el Ct indica el número de ciclos de amplificación necesarios para que la fluorescencia emitida alcance el umbral de detección establecido por el termociclador. A partir de este valor, es posible calcular la cantidad de ARNm presente en la muestra inicial, proporcionando así una medida cuantitativa de la expresión génica.

La cuantificación de la expresión de estos genes se realizó mediante el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Este método compara la expresión de un gen de interés en diferentes condiciones experimentales en relación con un gen de referencia constante. Primero, se calculó el  $\Delta\text{Ct}$  restando el Ct del gen de referencia (*PUM1* y *ACT-β*) del Ct del gen de interés. Luego, se comparó el  $\Delta\text{Ct}$  de las condiciones experimentales con el  $\Delta\text{Ct}$  de la condición control (tejido mamario sano) para obtener el  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Finalmente, se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para determinar el cambio relativo en la expresión del gen:

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct (muestra)} - \text{Ct (normalizador)} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct (muestra)} - \Delta\text{Ct (calibrador)} \\ \text{Expresión relativa} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}\end{aligned}$$

#### 4.7 Análisis estadístico

Las variables clínicas, patológicas, inmunohistoquímicas y moleculares se integraron en una base de datos anonimizada y posteriormente se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS (IBM, SPSS V23, Chicago IL).

Inicialmente, se llevó a cabo un análisis descriptivo de la distribución de las variables en la población. Para las variables cuantitativas con distribución paramétrica (normal), se calcularon la media y la desviación estándar; mientras que, para aquellas con una distribución no paramétrica, se utilizaron la mediana y el rango intercuartílico (25-75). La distribución de cada variable se verificó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las variables cualitativas se representaron mediante frecuencias relativas.

Para determinar el grado de asociación entre la media de expresión génica y el fenotipo tumoral se empleó el test estadístico Kruskal-Wallis, adecuado para variables no paramétricas.

Con el fin de mejorar el análisis estadístico y la interpretación de los resultados algunas variables cuantitativas como edad, tamaño tumoral, porcentaje de TILs y los resultados de expresión génica relativa de *HHLA2* y *TMIGD2* fueron recodificadas en variables cualitativas dicotómicas. En el caso de los resultados de expresión génica de los pacientes, se tomó en cuenta el valor 1.5 de la cuantificación relativa como punto de corte para diferenciar entre sobreexpresión y normo/infraexpresión, siguiendo el criterio descrito en Din et al. 2022, donde se aplica este umbral para un grupo de genes, incluyendo *HHLA2* en el carcinoma hepatocelular.

A continuación, se realizó una prueba chi-cuadrado y/o test de Fisher para buscar asociaciones entre las variables cualitativas. Para evaluar la magnitud de asociación se calculó el Odd Ratio (OD) con un intervalo de confianza del 95%. En el caso de las variables con más de dos categorías se realizaron regresiones logísticas para completar el análisis bivalente.

Por otro lado, para analizar el valor pronóstico de las variables cualitativas frente a la SG y SLE de las pacientes se utilizó el método de Kaplan-Meier, comparando las curvas de supervivencia mediante el test log-rank. Además, aquellas variables que obtuvieron un p-valor  $\leq 0.100$  en el análisis univariante, se incluyeron en un análisis multivariante utilizando la regresión de Cox para identificar variables independientes relacionadas con la SG y/o SLE. Asimismo, se calculó la magnitud de asociación mediante el Hazard Ratio y un intervalo de confianza del 95%.

En todos los casos, se tuvo en cuenta un  $p < 0.05$  para considerar que las diferencias entre el conjunto de variables fueron estadísticamente significativas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas

Para este estudio, se analizó una población compuesta por 147 mujeres (97,4%) y 4 hombres (2,6%) con una media de edad de 58 años, abarcando un rango de 32 a 94 años, donde el 66,9% de los pacientes son mayores de 50 años (66.9%).

En cuanto al tipo histológico del tumor, la mayoría de los pacientes poseían CDI (91,4%), seguidos de CLI (7,3%) y mixtos (1,3%). Tras el estudio inmunohistoquímico, los tumores se pudieron clasificar en los siguientes fenotipos: 13,2% luminales A, 23,2% luminales B HER-, 21,2% luminales B HER+, 21,9% HER2 puro, y 20,5% CMTN, lo que muestra una distribución bastante equilibrada entre los diferentes fenotipos incluidos. El tamaño de los tumores descritos tiene una media de 28,27 mm, distribuyéndose en un rango de 10 mm a 180 mm, con el 57,6% de los tumores siendo mayores de 20 mm y en relación con el grado de diferenciación, el 64,2% de presenta un grado histológico III. Sin embargo, únicamente el 26,5% de los tumores mostraron la presencia de necrosis, mientras que el 41,1% presentaron invasión vascular.

Adicionalmente, los valores del marcador de proliferación celular Ki-67 superan el 19% en la mayoría de los tumores, alcanzando un 56,3%. Por otro lado, el porcentaje de linfocitos infiltrantes en el tumor estromales (TILs) es menor del 30% en el 93,4% de los casos, indicando una baja infiltración en la mayoría de los tumores analizados.

En cuanto a la afectación ganglionar, el 57,6% de los pacientes no presenta metástasis, mientras que en el 42,4% son positivos.

Estos datos permiten obtener una visión detallada de las características clinicopatológicas de los pacientes estudiados, proporcionando una base sólida para el análisis de la expresión de *HHLA2*, *TMIGD2* y su impacto en el pronóstico del cáncer en las pacientes (**Tabla 3**).

	<b>n (Total %)</b>
<b>Total</b>	151 (100)
<b>Edad (años) *</b>	
< 50	50 (33.1)
≥ 50	101 (66.9)
<b>Sexo*</b>	
Hombre	4 (2.6)
Mujer	147 (97.4)
<b>Tipo histológico</b>	
Ductal	138 (91.4)
Lobulillar	11 (7.3)
Mixto	2 (1,3)
Atención Primaria	51,7 (34387)
<b>Fenotipo</b>	
Luminal A	20 (13.2)
Luminal B	35 (23.2)
Luminal B HER2+	32 (21.2)
HER2 puro	33 (21.9)
CMTN	31 (20.5)
<b>Tamaño</b>	
<= 20mm	64 (42.4)
> 20mm	87 (57.6)
<b>Grado histológico</b>	
I	10 (6.6)
II	44 (29.1)
III	97 (64.2)
<b>Necrosis</b>	
Ausencia	111 (73.5)
Presencia	40 (26.5)
<b>Invasión linfo-vascular</b>	
Ausencia	89 (58.9)
Presencia	62 (41.1)
<b>Ki67</b>	
< 15%	30 (19.9)
15% - 19%	36 (23.8)
>19%	85 (56.3)
<b>TILs (%)</b>	
<= 30%	141 (93.4)
> 30%	10 (6.6)
<b>Status ganglionar</b>	
Positivos	87 (57.6)
Negativos	64 (42.4)

**Tabla 3.** Análisis descriptivo de las variables clínicopatológicas

## 5.2 Análisis descriptivo de las variables moleculares

La distribución de la variable cuantitativa de la expresión génica se determinó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. En el análisis de la expresión génica de *HHLA2* y *TMIGD2*, se empleó la mediana, ya que se trataban de variables no paramétricas, junto con el percentil y el rango intercuartílico para proporcionar una descripción más precisa de la dispersión de los datos.

### 5.2.1 Datos de expresión génica relativa.

En el análisis realizado, se observó una sobreexpresión de *TMIGD2* de manera general en los tumores, con una mediana de 2,25 (ver **Tabla 4**). Este gen presentó un percentil 25 de 0,251 y un percentil 75 de 10,9, con un rango de 0 a 192,25, sugiriendo que algunas neoplasias tienen niveles de expresión significativamente altos. Por el contrario, el gen *HHLA2* se infraexpresó en la mayoría de las muestras, mostrando una mediana de 0. Los percentiles 25 y 75 son ambos 0, y el rango de expresión varía desde 0 hasta 3,93. Además, se repitió el análisis utilizando un valor de cuantificación relativa (*fold change*) de 1,5 (ver **Tabla 5**), convirtiendo así la expresión génica en una variable cualitativa dicotómica. De este modo los niveles de expresión relativa que fueran iguales o menores de 1,5 se consideraron normo/infraexpresión y los valores mayores de 1,5 sobreexpresión. En este contexto, se destaca que un 57,6% de los tumores sobreexpresaron *TMIGD2*, lo que sugiere una tendencia en la expresión de este gen entre los casos analizados. Sin embargo, el 95% de los tumores infraexpresaron *HHLA2*.

Gen	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Rango Min.	Rango Máx.
<b><i>HHLA2</i></b>	0	0	0	0	3,93
<b><i>TMIGD2</i></b>	2,25	0,251	10,9	0	192,25

Tabla 4. Análisis descriptivo de los valores de expresión génica relativa.

Gen	Pacientes (n=151)	Porcentaje (%)
<b><i>HHLA2</i></b>		
≤1.50	144	95,4
>1.50	7	4,6
<b><i>TMIGD2</i></b>		
≤1.50	64	42,4
>1.50	87	57,6

Tabla 5. Expresión génica relativa de *TMIGD2* y *HHLA2* en base de 1,5 como cambio relativo (CR).

### 5.2.2 Datos de expresión génica según fenotipo

Para determinar el grado de asociación entre la media de expresión génica y el fenotipo tumoral, se empleó el test estadístico Kruskal-Wallis, adecuado para variables no paramétricas, representando la mediana, el percentil y el rango.

En el análisis de la expresión de *HHLA2*, se observó una mayor expresión en los subtipos luminales A con una media de expresión de 0,55. Aunque se trata de una variable no paramétrica cuya descripción se realiza con la mediana, utilizamos la media en este caso para mostrar la diferencia de expresión entre los grupos. Esta mayor expresión sugiere una tendencia hacia la significación estadística ( $p=0,059$ ) en comparación con la media de expresión de este gen en los demás subtipos moleculares de CM, como Luminal B (0,02), Luminal B HER2+ (0,14), HER2 puro (0,03), y CMTN (0,25) (**Tabla 6**).

Respecto a la expresión de *TMIGD2*, la cual se encuentra aumentada en todos los fenotipos, no se observó ninguna posible asociación con un fenotipo tumoral concreto, obteniéndose un valor de  $p=0,357$ . Esto sugiere que su sobreexpresión es común entre los diversos subtipos moleculares de CM, pero no se asocia específicamente con alguno de ellos.

GEN	MEDIANA	PERCENTIL 25	PERCENTIL 75	RANGO Min.	RANGO Máx.	P valor
<b>HHLA2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	3,93	
Luminal A	0,00	0,00	0,95	0,00	3,93	<b>0,059</b>
Luminal B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	
Luminal B HER2+	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	
HER2-puro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	
CMTN	0,00	0,00	0,00	0,00	2,90	
<b>TMIGD2</b>	2,25	0,25	10,90	0,00	192,25	
Luminal A	1,58	0,51	5,06	0,00	16,12	0,357
Luminal B	3,07	0,19	10,92	0,00	192,25	
Luminal B HER2+	3,09	1,11	17,05	0,00	124,67	
HER2-puro	1,37	0,00	11,89	0,00	66,62	
CMTN	2,72	0,27	12,78	0,00	94,59	

**Tabla 6.** Análisis de la expresión génica relativa según los diferentes fenotipos de CM.

A continuación, se llevó a cabo una regresión logística bivalente con el fin de determinar la asociación específica de cada fenotipo con una sobreexpresión o normo/infraexpresión, utilizando el punto de corte de 1,5 para cada gen analizado. Este análisis permitió concretar la relación precisa entre los fenotipos tumorales y los niveles de expresión génica, proporcionando una comprensión más detallada de las variaciones en la expresión de los genes *HHLA2* y *TMIGD2* entre los distintos subtipos moleculares de CM (**Tabla 7**).

GEN	Pacientes	≤1.50	>1.50	OR (IC95%)	p-Valor
Fenotipo	(n=151)				
<b><i>HHLA2</i></b>					
Luminal A	20	11,1% (16)	57,1% (4)	3,6 (0,6-22)	0,162
Luminal B	35	24,3% (35)	0% (0)	0 (0-0)	0,998
Luminal B HER2+	32	21,5% (31)	14,3% (1)	0,47 (0,4-5,4)	0,544
HER2-puro	33	22,9% (33)	0% (0)	0 (0-0)	0,998
CMTN	31	20,1% (29)	28,6% (2)	1	
<b><i>TMIGD2</i></b>					
Luminal A	20	15,6% (10)	11,5% (10)	0,72 (0,2-2,2)	0,573
Luminal B	35	25,0% (16)	21,8% (19)	0,9 (0,3-2,3)	0,758
Luminal B HER2+	32	12,5% (8)	27,6% (24)	2,2 (0,7-6,3)	0,157
HER2-puro	33	26,6% (17)	18,4% (16)	0,7 (0,3-1,8)	0,444
CMTN	31	20,3% (13)	20,7% (18)	1,00	

Tabla 7. Resultados de la regresión logística binaria para determinar el P valor de cada subtipo molecular en comparación con el subtipo CMTN como referencia.

Tras el análisis, no se identificaron diferencias significativas con suficiente robustez estadística que permitieran asociar la expresión de los genes con algún fenotipo tumoral específico. No obstante, se observó una posible correlación entre la sobreexpresión de *HHLA2* y el subtipo Luminal A, dado que el 57,1% de ellos presentaban sobreexpresión de *HHLA2*. Sin embargo, esta asociación no alcanzó el umbral de significación estadística ( $p=0.162$ ).

### 5.3 Correlación entre variables clínico-patológicas y moleculares

El estudio de la correlación de las variables clínico-patológicas con las moleculares se realizó mediante una prueba chi-cuadrado y/o test de Fisher, evaluando la magnitud de asociación con Odd Ratio (OD) en un intervalo de confianza del 95%.

#### 5.3.1 Asociación entre *HHLA2* y variables clínico-patológicas

Al realizar las respectivas pruebas chi-cuadrado y/o test exacto de Fisher, se obtuvieron los resultados representados en la **Tabla 8**, donde se indica el porcentaje de tumores con una normo/infraexpresión de *HHLA2* y una sobreexpresión, junto con el intervalo de confianza del 95% y su respectivo P valor.

Los resultados muestran una asociación significativa entre la sobreexpresión de *HHLA2* ( $>1,5$ ) y tumores con un tamaño  $\leq 20$ mm ( $p= 0,023$ ). En contraste, no se hallaron asociaciones significativas entre la expresión de *HHLA2* y otras variables analizadas, incluyendo edad, sexo, tipo histológico del tumor, fenotipo tumoral, grado de diferenciación histológica, presencia de necrosis, invasión vascular, marcador Ki67, porcentaje de TILs y afectación ganglionar (todos con  $p > 0.05$ ).

	HHLA2 ≤1,50 %(n)	HHLA2 > 1,50 %(n)	OR (IC95%)	p-Valor
<b>Edad (años) *</b>				
≤ 50	33,3 (48)	28,6 (2)	135 (0,2-6,7)	0.576
> 50	66,7 (96)	71,4 (5)		
<b>Sexo*</b>				
Hombre	2,8 (4)	0 (0)	1 (0,9-1)	0.825
Mujer	97,2 (140)	100 (7)		
<b>Tipo histológico</b>				
Ductal	91 (131)	100 (7)	1	
Lobulillar	7,6 (11)	0 (0)	0 (0-0)	0.999
Mixto	1,4 (2)	0 (0)	0 (0-0)	0.999
<b>Fenotipo</b>				
Luminal A	11,1 (16)	57,1 (4)	3,6 (0,6-22)	0,162
Luminal B	24,3 (35)	0 (0)	0 (0-0)	0,998
Luminal B HER2+	21,5 (31)	14,3 (1)	0,47 (0,4-5,4)	0,544
HER2 puro	2,9 (33)	0 (0)	0 (0-0)	0,998
CMTN	20,1 (29)	28,6 (2)	1	
<b>Tamaño</b>				
≤ 20mm	40,3 (58)	85,7 (6)	0,1 (0,01-1,0)	<b>0.023</b>
> 20mm	59,7 (86)	14,3 (1)		
<b>Grado histológico</b>				
I	6,3 (9)	14,3 (1)	1	
II	28,5 (41)	42,9 (3)	0,7 (0,1-7,1)	0,730
III	65,3 (94)	42,9 (3)	0,3 (0-3,1)	0,301
<b>Necrosis</b>				
Ausencia	72,9 (105)	85,6 (6)	0,4 (0,5-3,8)	0,404
Presencia	27,1 (144)	14,3 (1)		
<b>Invasión linfo-vascular</b>				
Ausencia	59 (85)	57,1 (4)	1,1 (0,2-5)	0,606
Presencia	41 (59)	42,9 (3)		
<b>Ki67</b>				
< 15%	18,8 (27)	42,9 (3)	4,6 (0,7-29,1)	0,104
15% - 19%	23,6 (34)	28,6 (2)	2,4 (0,3-18)	0,382
>19%	57,6 (83)	28,6 (2)	1	
<b>TILs (%)</b>				
≤30%	93,1 (134)	100 (7)	0,9 (0,9-1)	0,613
> 30%	6,9 (10)	0 (0)		
<b>Status ganglionar</b>				
Positivos	41 (59)	71,4 (5)	3,6 (0,7-19,2)	0,116
Negativos	59 (85)	28,6 (2)		

**Tabla 8.** Análisis de la asociación entre los valores de expresión génica de HHLA2 y cada una de las variables clínicas y patológicas (chi-cuadrado; test de Fisher).

### 5.3.2 Asociación entre *TMIGD2* y variables clínico-patológicas

En el estudio sobre la asociación de la expresión de *TMIGD2* no se encontraron asociaciones significativas ( $p > 0.05$ ) con las variables analizadas, incluyendo edad, sexo, tipo histológico del tumor, fenotipo tumoral, grado de diferenciación histológica, presencia de necrosis, invasión

vascular, marcador Ki67, porcentaje de TILs y afectación ganglionar. Sin embargo, se observó cierta tendencia hacia la significación entre los tumores que sobreexpresaban *TMIGD2* y la ausencia de necrosis tumoral ( $p=0.06$ ) (Tabla 9).

	<i>TMIGD2</i> ≤1,50 %(n)	<i>TMIGD2</i> >1,50 %(n)	OR (IC95%)	p-Valor
<b>Edad (años) *</b>				
≤ 50	31,3 (20)	34,5 (30)	0,9 (0,4-1,7)	0,677
> 50	68,8 (44)	65,5 (57)		
<b>Sexo*</b>				
Hombre	4,7 (3)	1,1 (1)	0,2 (0-2,3)	0,205
Mujer	95,3 (61)	98,9 (86)		
<b>Tipo histológico</b>				
Ductal	96,9 (62)	87,4 (76)	0 (0-0)	
Lobulillar	3,1 (2)	10,3 (9)	0 (0-0)	0,999
Mixto	0 (0)	2,3 (2)	1	0,999
<b>Fenotipo</b>				
Luminal A	15,6 (10)	11,5 (10)	0,72 (0,2-2,2)	0,573
Luminal B	25,0 (16)	21,8 (19)	0,9 (0,3-2,3)	0,758
Luminal B HER2+	12,5 (8)	27,6 (24)	2,2 (0,7-6,3)	0,157
HER2-puro	26,6 (17)	18,4 (16)	0,7 (0,3-1,8)	0,444
CMTN	20,3 (13)	20,7 (18)	1	
<b>Tamaño</b>				
≤ 20mm	40,6 (26)	43,7 (38)	0,9 (0,5-1,7)	0,708
> 20mm	59,4 (38)	56,3 (49)		
<b>Grado histológico</b>				
I	7,8 (5)	5,7 (5)	1	
II	32,8 (21)	26,4 (23)	1,1 (0,3-4,3)	0,897
III	59,4 (38)	67,8 (59)	1,6 (0,4-5,7)	0,509
<b>Necrosis</b>				
Ausencia	65,6 (42)	79,3 (69)	0,5 (0,2-1)	<b>0,06</b>
Presencia	34,4 (22)	20,7 (18)		
<b>Invasión linfo-vascular</b>				
Ausencia	54,7 (35)	62,1 (54)	0,7 (0,4-1,4)	0,362
Presencia	45,3 (29)	37,9 (33)		
<b>Ki67</b>				
< 15%	21,9 (14)	18,4 (16)	0,7 (0,3-1,7)	0,453
15% - 19%	26,6 (17)	21,8 (19)	0,7 (0,3-1,6)	0,392
>19%	51,6 (33)	59,8 (52)	1	
<b>TILs (%)</b>				
≤30%	96,9 (62)	90,8 (79)	3,1 (0,6-15,3)	0,123
> 30%	3,1 (2)	9,2 (8)		
<b>Status ganglionar</b>				
Positivos	43,8 (28)	41,4 (36)	0,9 (0,5-1,7)	0,771
Negativos	56,3 (36)	58,6 (51)		

**Tabla 9.** Análisis de la asociación entre los valores de expresión génica de *TMIGD2* y cada una de las variables clínicas y patológicas (chi-cuadrado; test de Fisher).

## 5.4 Análisis de supervivencia

La evaluación del valor pronóstico de las diferentes variables clínico-patológicas y moleculares con respecto a la SG y la SLE, se llevó a cabo con los análisis estadísticos univariantes y multivariantes.

### 5.4.1 Análisis univariante

El método de Kaplan-Meier se empleó para el análisis univariante con el objetivo de comparar las curvas de supervivencia y comprobar la existencia de diferencias significativas. Para determinar si las diferencias observadas entre las curvas de supervivencia eran estadísticamente significativas, se utilizó el test log-rank. Además, el análisis se completó calculando los valores de Hazard Ratio (HR) mediante la regresión de Cox.

#### 5.4.1.1 Supervivencia global

En cuanto a la SG, se observó que el 23.2% (35/151) de los pacientes fallecieron durante el período de estudio, siendo la media de SG de 92 meses (rango 1-308 meses).

Al comparar cada una de las variables clínicopatológicas, se determinó que las pacientes >50 años (29.7%; 30/101), con tumores >20mm (34,5%; 30/87), de grado histológico III (29,9 %; 29/97), con presencia de invasión linfo-vascular (32,3%; 20/62), y necrosis (50%; 20/40), y alto índice proliferativo (31,8%; 27/85), presentaron una menor SG (en todos los casos  $p \leq 0,042$ ; test log-rank). Esta disminución también se observó en las pacientes con tumores con receptores hormonales negativos (35,9%; 23/64): fenotipos HER2-puro (30,3%; 10/33) y Triple-Negativo (41,9%; 13/31) ( $p=0,007$ ; test log-rank) (**Tabla 10 y Figura 12**).

Por otro lado, se encontró una tendencia de disminución de la SG en las pacientes con afectación ganglionar (31,3%; 20/64) ( $p=0.095$ ; test log-rank). No obstante, en el resto de las variables como el tipo histológico del tumor, el sexo y el porcentaje de TILs no se encontraron diferencias (todos los casos  $p > 0.05$ ; test log-rank).

En cuanto al análisis de la supervivencia global con las variables moleculares (expresión génica relativa de *HHLA2* y *TMIGD2*) no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas (en ambos casos  $p > 0.05$ ; test log-rank) (**Tabla 11**). A pesar de este hecho, los resultados sugieren que las pacientes que sobreexpresan ambos genes presentan una mayor SG.

	<b>Pacientes (n=151)</b>	<b>Fallecimientos n= 35 (%)</b>	<b>SG (%)</b>	<b>P-Valor</b>
<b>Edad (años) *</b>				
≤ 50	50	5 (14,3)	90	<b>0,004</b>
> 50	101	30 (29,7)	70,3	
<b>Sexo*</b>				
Hombre	147	35 (23,8)	76,2	0,331
Mujer	4	0 (0)	100	
<b>Tipo histológico</b>				
Ductal	138	32 (23,2)	76,8	0,733
Lobulillar	11	3 (27,3)	72,7	
Mixto	2	0 (0)	100	
<b>Fenotipo</b>				
Luminal A	20	2 (10)	90	<b>0,007</b>
Luminal B	35	5 (14,3)	85,7	
Luminal B HER2+	32	5 (14,3)	84,4	
HER2-puro	33	10 (30,3)	69,7	
CMTN	31	13 (41,9)	58,1	
<b>Tamaño</b>				
≤ 20mm	64	5 (7,8)	92,2	<b>&lt;0,001</b>
> 20mm	87	30 (34,5)	65,5	
<b>Grado histológico</b>				
I	10	0 (0)	100	<b>0,027</b>
II	44	6 (13,6)	86,4	
III	97	29 (29,9)	70,1	
<b>Necrosis</b>				
Ausencia	111	15 (13,51)	86,5	<b>&lt;0,001</b>
Presencia	40	20 (50)	50	
<b>Invasión linfo-vascular</b>				
Ausencia	89	15 (16,9)	83,1	<b>0,042</b>
Presencia	62	20 (32,3)	67,7	
<b>Ki67</b>				
< 15%	30	3 (10)	90	<b>0,017</b>
15% - 19%	36	5 (13,9)	86,1	
>19%	85	27 (31,8)	68,2	
<b>TILs (%)</b>				
≤30%	141	32 (22,7)	77,3	0,675
>30%	10	3 (30)	70	
<b>Status ganglionar</b>				
Positivos	64	20 (31,3)	68,8	<b>0,095</b>
Negativos	87	15 (17,2)	82,8	

Tabla 10. Análisis de la asociación entre la SG y cada una de las variables clínicas y patológicas (Kaplan-Meyer; test de log-rank).

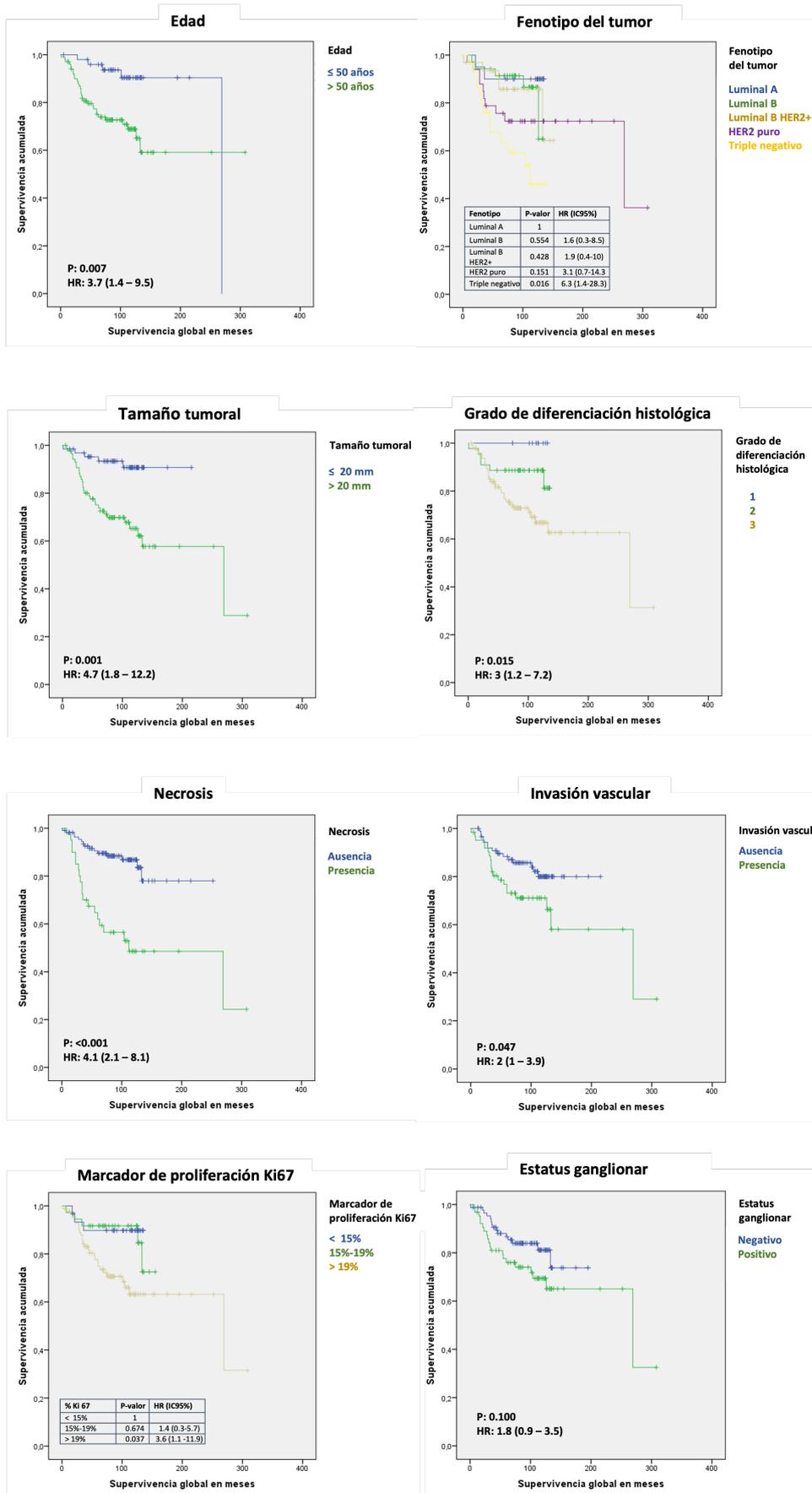


Figura 12. Gráficas de Kaplan-Meier para la SG en función de las variables clínicas y patológicas (método de Kaplan-Meier; Regresión de Cox).

	Pacientes (n=151)	Fallecimientos n= 35 (%)	SG (%)	P-Valor
<b>HHLA2</b>				
≤1.50	144	34 (23,6)	76,4	0,599
>1.50	7	1 (143,3)	85,7	
<b>TMIGD2</b>				
≤1.50	64	17 (26,6)	73,4	0,796
>1.50	87	18 (20,7)	79,3	

**Tabla 11.** Asociación entre los datos de expresión génica relativa con la SG (método Kaplan-Meyer; test log-rank).

#### 5.4.1.2 Supervivencia libre de enfermedad.

En cuanto a la SLE se observó que 14.6% (22/151) presentaban recidivas (local y/o a distancia), siendo la media de SLE de 89 meses (rango 1-308 meses).

En el análisis se encontraron asociaciones significativas entre varios factores clínicos y patológicos: las pacientes con tumores >20 mm (20.7%; 18/87), presencia de necrosis (30%; 12/40) y afectación ganglionar (20.7%; 18/87) presentaban una disminución significativa en la SLE (en todos los casos  $p \leq 0,013$ ; test log-rank). Asimismo, también se observaron que los tumores de grado histológico III (19.6%; 19/97) y alto índice proliferativo (20%; 17/85) presentaban una menor SLE, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo ( $p = \text{valor} \leq 0,062$ ; test log-rank). Sin embargo, en el resto de las variables, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas (en todos los casos  $p > 0.05$ , según la prueba log-rank) (**Tabla 12** y **Figura 13**).

Al comparar las variables moleculares, sólo observamos que las pacientes con alta expresión tumoral de *TMIGD2* (8%; 7/87) tenían una mayor SLE ( $p = 0,036$ ; test log-rank) (**Tabla 13**). En este caso, los resultados también sugieren que las pacientes con tumores que sobreexpresan ambos genes presentan una mayor SLE.

	Pacientes (n=151)	Recidiva n=22 (%)	SLE (%)	P-Valor
<b>Edad (años) *</b>				
≤ 50	50	6 (12)	88	0,322
> 50	101	16 (15,8)	84,2	
<b>Sexo*</b>				
Hombre	147	22 (15)	85	0,418
Mujer	4	0 (0)	100	
<b>Tipo histológico</b>				
Ductal	138	20 (14,5)	85,8	0,8
Lobulillar	11	2 (18,2)	81,8	
Mixto	2	0 (0)	100	
<b>Fenotipo</b>				
Luminal A	20	0 (0)	100	0,176
Luminal B	35	4 (11,4)	88,6	
Luminal B HER2+	32	5 (15,6)	84,4	
HER2 puro	33	9 (27,3)	72,7	
CMTN	31	4 (13)	87,1	
<b>Tamaño</b>				
≤ 20mm	64	4 (6,3)	93,8	0,013
> 20mm	87	18 (20,7)	79,3	
<b>Grado histológico</b>				
1	10	0 (0)	100	0,055
2	44	3 (6,8)	93,2	
3	97	19 (19,6)	80,4	
<b>Necrosis</b>				
Ausencia	111	10 (9)	91	0,001
Presencia	40	12 (30)	70	
<b>Invasión linfo-vascular</b>				
Ausencia	89	10 (11,2)	88,8	0,157
Presencia	62	12 (19,4)	80,6	
<b>Marcador Ki67</b>				
< 15%	30	2 (6,7)	93,3	0,062
15% - 19%	36	3 (8,3)	91,7	
>19%	85	17 (20)	80	
<b>Porcentaje TILs</b>				
≤30%	141	21 (14,9)	85,1	0,677
> 30%	10	1 (10)	90	
<b>Status ganglionar</b>				
Positivos	64	15 (23,4)	76,6	0,011
Negativos	87	7 (8)	92	

Tabla 12. Análisis de la asociación SLE y cada una de las variables clínicas y patológicas (Kaplan-Meyer; test de log-rank).

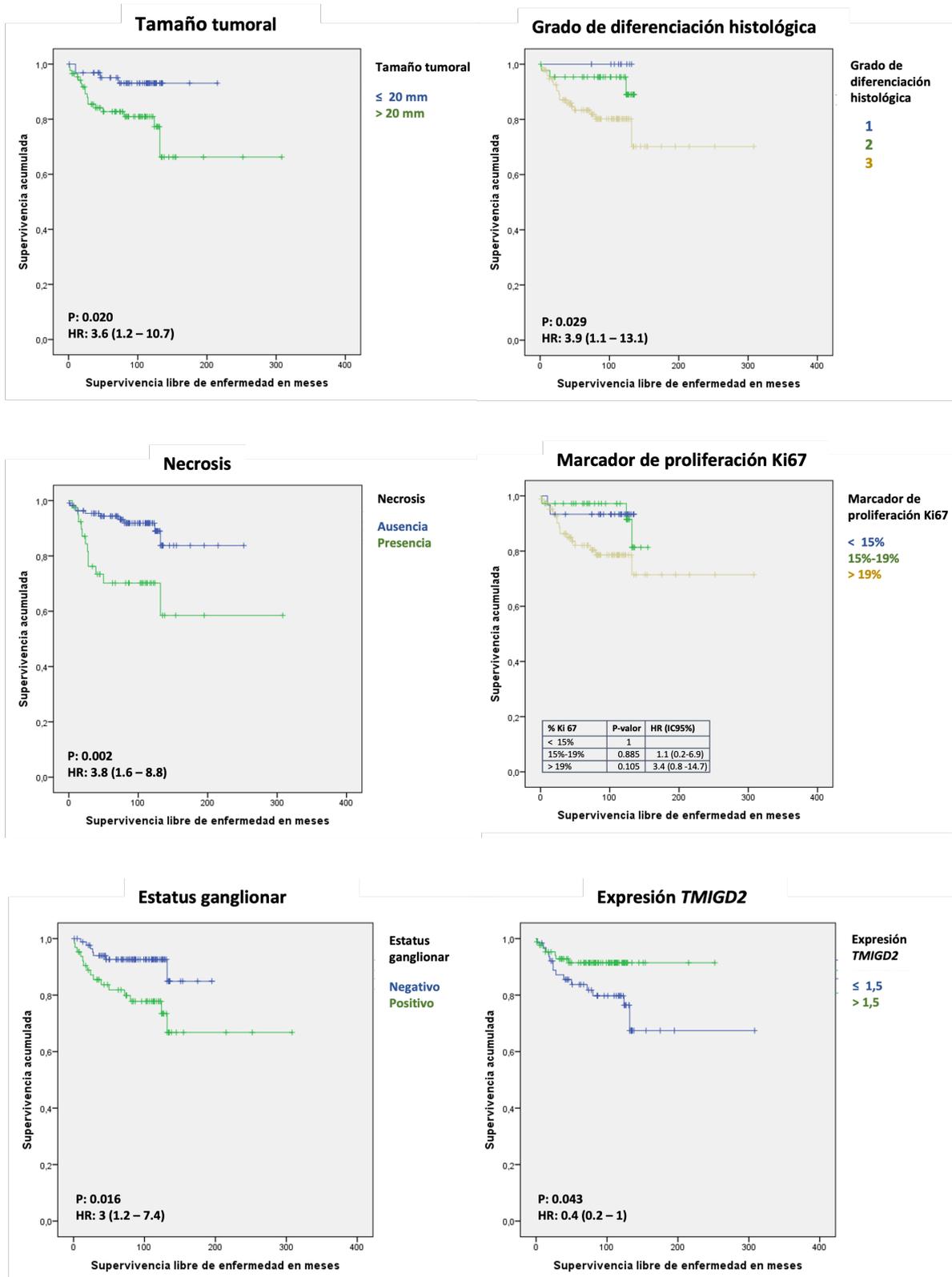


Figura 13. Gráficas de Kaplan-Meier para la SLE en función de las variables clínicas y patológicas (método de Kaplan-Meier; Regresión de Cox).

	Pacientes (n=151)	Recaídas n= 22 (%)	SLE (%)	P-Valor
<b>HHLA2</b>				
≤1.50	144	22 (15,3)	84,7	0,308
>1.50	7	0 (0)	100	
<b>TMIGD2</b>				
≤1.50	64	15 (23,4)	76,6	<b>0,036</b>
>1.50	87	7 (8)	92	

Tabla 13. Asociación entre los datos de expresión génica relativa con la SG (método Kaplan-Meyer; test log-rank).

#### 5.4.2 Análisis multivariante

Para realizar un análisis exhaustivo de la SG y SLE en este estudio, se aplicó un enfoque multivariante utilizando la regresión de Cox. Se seleccionaron todas las variables que mostraron un valor de  $p \leq 0.100$  en el análisis univariante, para determinar su impacto independiente en la SG y la SLE. Este método permitió identificar las que más influyen en los resultados de supervivencia, evaluando el Hazard Ratio y su intervalo de confianza al 95%.

##### 5.4.2.1. Supervivencia Global

En el análisis multivariante, la edad presentó una asociación significativa con la variable dependiente, la SG (HR=3; IC95%: 1,1-7,9;  $p=0,029$ ; regresión de Cox). Asimismo, las pacientes con presencia de necrosis en el tumor también mostraron una disminución significativa de la SG (HR=2,7; IC95%: 1,1-6,8;  $p=0,031$ ; regresión de Cox). No obstante, el resto de las variables analizadas no alcanzaron significancia estadística (en todos los casos  $p \leq 0,999$ ; regresión de Cox) (Tabla 14).

	HR (IC95%)	P-Valor
<b>Edad (años) *</b>	3 (1,1-7,9)	<b>0,029</b>
<b>Fenotipo</b>		
Luminal A	1	
Luminal B	1 (0,2-6,5)	0,999
Luminal B HER2+	0,9 (0,1-6,6)	0,911
HER2-puro	1,1 (0,1-7,7)	0,993
CMTN	2,2 (0,3-15,2)	0,449
<b>Tamaño</b>	2,5 (0,9-7)	0,083
<b>Grado histológico</b>	0,8 (0,2-3,3)	0,715
<b>Necrosis</b>	2,7 (1,1-6,8)	<b>0,031</b>
<b>Invasión linfo-vascular</b>	2,1 (0,9-4,8)	0,074
<b>Marcador Ki67</b>		
< 15%	1	
15% - 19%	1,3 (0,3-6,5)	0,750
>19%	1,6 (0,3-9,2)	0,617
<b>Status ganglionar</b>	1,2 (0,5-2,6)	0,649

Tabla 14. Asociación las variables con un  $p \leq 0.100$  en el análisis univariante con la SG (regresión de Cox).

#### 5.4.2.2 Supervivencia libre de enfermedad

En el estudio multivariante de la SLE la presencia ganglios afectados mostró una tendencia de asociación con una menor SLE (HR=2,4; IC95%: 1-6,1;  $p=0,059$ ). Por otro lado, la asociación de una mayor expresión de *TMIGD2* con una menor SLE tampoco alcanzó la significancia estadística, pero si mostro una tendencia (HR=0,465; IC95%: 0,2-1,2;  $p=0,118$ ). Por lo tanto, en nuestra serie clínica la sobreexpresión de *TMIGD2* no se puede considerar como un factor independiente de buen pronóstico para la SLE.

En cambio, en el resto de las variables analizadas no se observa ninguna asociación significativa destacable (en todos los casos  $p \leq 0,903$ ; regresión de Cox) (Tabla 15).

	HR (IC95%)	P-Valor
<b>Tamaño</b>	1,7 (0,5-6,1)	0,378
<b>Grado histológico</b>	2,3 (0,3-15,1)	0,399
<b>Necrosis</b>	1,9 (0,7-5,5)	0,242
<b>Marcador Ki67</b>		
< 15%	1	
15% - 19%	0,6 (0,1-5,3)	0,685
>19%	0,9 (0,1-8)	0,903
<b>Status Ganglionar</b>	2,4 (1-6,1)	<b>0,059</b>
<b>Expresión <i>TMIGD2</i></b>	0,465 (0,2-1,2)	<b>0,118</b>

Tabla 15. Asociación las variables con un  $p \leq 0.100$  en el análisis univariante con la SLE (regresión de Cox).

## 6. DISCUSIÓN

La expresión de *HHLA2* y su valor como marcador pronóstico en el cáncer no solo varían en función del tipo específico de tumor, sino que también están influenciados por el microambiente tumoral en el que se encuentra el ligando. En ciertos tumores, como el cáncer ovárico, el hepatocarcinoma y el osteosarcoma, la sobreexpresión de *HHLA2* se asocia con metástasis y se correlaciona con un pronóstico desfavorable (Xu et al., 2021; Luo et al., 2021; Dong et al., 2015). Contrariamente, en otros tipos de cáncer, como el adenocarcinoma ductal pancreático y el glioma, la presencia de *HHLA2* se relaciona con un pronóstico más favorable (Yan et al., 2019; Qi et al., 2019). En cuanto al microambiente tumoral, se ha identificado una población específica de pacientes con hepatocarcinoma en los cuales la alta densidad de células CD8+ convierte a *HHLA2* en un factor de buen pronóstico (Liao et al., 2022). De manera análoga, en el adenocarcinoma ductal pancreático, aunque la expresión se asocia generalmente con un mejor pronóstico, se observa un efecto contrario en aquellos pacientes cuyos tumores contienen macrófagos CD68+ asociados (TAMs) (Zhu et al., 2022).

En el contexto del CM, la expresión de *HHLA2* es un aspecto que resulta controvertido. En el estudio de Janakiram et al. (Janakiram et al. 2015) se indica un aumento de expresión en el tejido neoplásico mamario con respecto al sano, mientras que en el de Fang et al. (Fang et al. 2020) no se encontraron diferencias significativas. En nuestro estudio, *HHLA2* se encuentra infraexpresado en el 95% de los tumores, aunque los fenotipos tumorales luminal A y CMTN mostraron una mayor expresión, con medias de 0,55 y 0,25, respectivamente. Estos hallazgos son parcialmente consistentes con los resultados de Janakiram et al., donde el 56% de los tumores CMTN presentaban una expresión elevada. Adicionalmente, aunque en este estudio no encontraron asociación de los niveles de expresión con el tamaño tumoral, nuestros resultados demuestran una asociación entre una mayor expresión de *HHLA2* y un menor tamaño tumoral (<20mm). No obstante, debemos tener en cuenta que estos resultados parcialmente consistentes pueden deberse a las diferencias en el tamaño poblacional estudiado (n=51 vs 151 pacientes) y al diseño del estudio (expresión proteica por inmunohistoquímica frente a expresión génica por qPCR).

Para interpretar coherentemente nuestros hallazgos, es importante recordar que la expresión de *HHLA2* y su valor pronóstico varían según el tipo de tumor y su microambiente. Así, nuestros resultados podrían explicarse a través de las funciones inmunomoduladoras y de adhesión que posee este ligando. En primer lugar, dado que se trata de un ligando que puede ser reconocido por los receptores TMIGD2 y KIR3DL3, ya descritos previamente y con funciones totalmente antagonistas, el papel de *HHLA2* podría variar según los niveles de expresión de sus receptores en las células inmunitarias asociadas al tumor que conforman este microambiente. Por tanto, en aquellos tumores donde predomine una mayor expresión del receptor coestimulador TMIGD2, la sobreexpresión de *HHLA2* podrá actuar como un factor de buen pronóstico.

Otro aspecto crucial de *HHLA2* es su función como molécula de adhesión. Se sugirió que esta molécula podía regular la adhesión célula-célula y la interacción de linfocitos T primarios con la matriz extracelular (Rieder et al., 2021). De este modo, una mayor sobreexpresión podría fortalecer la adhesión célula-célula, reduciendo así la migración celular y el crecimiento tumoral, lo que resultaría en tumores de menor tamaño.

En nuestro microambiente tumoral, parece que *HHLA2* no está interactuando positivamente con el sistema inmunitario a través del receptor TMIGD2. Por lo tanto, la asociación entre una mayor expresión de *HHLA2* y factores de buen pronóstico, como el menor tamaño tumoral, podría estar más relacionada con la función de adhesión de este ligando que con su capacidad de activar el sistema inmunológico.

La expresión de *TMIGD2* en el cáncer es un área de investigación que aún no ha sido ampliamente explorada. Sin embargo, al igual que *HHLA2*, parece estar vinculada a los tipos histológicos. Se ha observado que este punto de control inmunológico muestra una expresión significativamente alterada en diversos tejidos tumorales. En el cáncer gástrico, en el carcinoma adenoide quístico y el mucoepidermoide, *TMIGD2* está sobreexpresado en comparación con los tejidos adyacentes, lo que sugiere una posible implicación en la progresión del tumor (Hu et al., 2019; Zhang et al., 2022). En contraste, en el carcinoma escamoso de la cavidad oral y en la displasia se expresa a niveles bajos, lo que podría reflejar diferencias en el papel funcional de esta molécula en distintos contextos tumorales (Xiao et al., 2019).

Nuestros resultados muestran una asociación directa entre un aumento en la expresión de *TMIGD2* y una mayor SLE, así como con la ausencia de necrosis, ambos factores indicativos de un buen pronóstico. En una línea similar, el estudio realizado por Boulhen et al. (Boulhen et al. 2023), en el que evaluó la expresión de mRNA de *TMIGD2* en una serie clínica de 25 pacientes con glioma, reveló una estrecha relación entre la expresión de este receptor y una mayor supervivencia global (SG). En este estudio también se identificó como un factor independiente de buen pronóstico en pacientes con glioma (Boulhen et al., 2023).

A pesar de su papel inmunomodulador, *TMIGD2* ha sido identificado y considerado como una nueva molécula de adhesión celular. Este receptor, expresado en células de origen epitelial y endotelial, desempeña un papel significativo en la promoción de la adhesión celular, la interacción célula-célula, la inhibición de la migración celular y en la mejora del desarrollo de capilares durante la angiogénesis. Además, está implicado en la regulación de la morfología celular y en el incremento de la adhesión focal. Estas funciones sugieren que *TMIGD2* es una molécula clave en la dinámica de las células en tejidos y órganos, contribuyendo a la organización y estabilidad del microambiente celular (Rahimi et al., 2011).

En definitiva, se puede inferir que el valor pronóstico de *TMIGD2*, al igual que el de *HHLA2*, varía en función del tipo de tumor y del microambiente tumoral en el que se encuentren. La interacción entre los niveles de expresión de *HHLA2* y del receptor inhibidor KIRD3L podría influir significativamente en su poder pronóstico. En nuestra serie clínica, se asoció la sobreexpresión de *TMIGD2* con la ausencia de necrosis, la cual generalmente se considera un indicador de mal pronóstico debido a su relación con un crecimiento tumoral rápido. Esta ausencia de necrosis podría estar vinculada a una mayor adhesión célula-célula, lo que resulta en un crecimiento más lento del tumor y una reducción en la formación de áreas necróticas.

Además, al analizar los niveles de expresión de estas moléculas en nuestra serie clínica, se observó que mientras *HHLA2* estaba mayoritariamente disminuido, un 57,6% de los tumores sobreexpresaban *TMIGD2*. Esto sugiere que el pronóstico favorable no se debe necesariamente a una mayor activación del sistema inmunitario, dado que tampoco se observaron niveles considerables de TILs. En su lugar, parece estar más relacionado con el papel de adhesión que ejerce esta molécula, de manera similar a lo que ocurre con el ligando *HHLA2*. Sin embargo, se requieren de futuros estudios en los que se pueda profundizar en esta función no inmunitaria de *HHLA2* y *TMIGD2* para poder confirmar esta afirmación.

## 7. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

### Limitaciones:

- Origen de la expresión génica: La expresión génica relativa analizada no se limita exclusivamente a las células tumorales, sino que también incluye las poblaciones celulares que componen el microambiente tumoral, que abarca el sistema inmunitario, células tumorales, células sanas y células estromales. Esta diversidad en las fuentes de expresión génica puede influir en la interpretación de los resultados.
- Distribución de la muestra: La selección de los casos incluidos en la serie clínica no sigue una proporción normal en cuanto a frecuencias de fenotipos. Esta selección se hizo teniendo en cuenta la inclusión de grupos relativamente homogéneos de tumores para su comparación.
- Heterogeneidad en la concentración de ARNm: La extracción del ARNm se hizo a partir de un mínimo de 3 cilindros de tejido tumoral con una celularidad de al menos 30%, asumiendo que los tumores son muy heterogéneos. Sin embargo, hubo caso con mayor celularidad, lo que influyó de forma directa en la concentración del ARNm extraído.

### Fortalezas:

- Pionero en su campo: Este estudio es el primero en analizar la expresión génica en pacientes con CM infiltrante y relacionarla con características clinicopatológicas y el pronóstico en una amplia serie clínica de pacientes (n= 151). Los resultados obtenidos pueden servir como punto de partida para futuras investigaciones en este campo, y existe el potencial para que sean publicados en revistas de alto impacto científico.
- Control de calidad exhaustivo: Se ha realizado un control de calidad riguroso para garantizar la integridad del ARN extraído de muestras de parafina. Este proceso ha asegurado una alta concentración, integridad y pureza del ARN, lo cual es crucial para la precisión, confiabilidad y reproducibilidad de los análisis genéticos posteriores.

## 8. CONCLUSIONES

El presente estudio tuvo como propósito central cuantificar la expresión génica relativa de *HHLA2* y *TMIGD2* en pacientes diagnosticadas con CM infiltrante. Para cumplir con este propósito, se desarrollaron varias líneas de investigación. En primer lugar, se analizó la expresión en una cohorte de 151 pacientes con CM, abarcando una variedad de fenotipos tumorales. Posteriormente, se exploró la posible relación entre los niveles de expresión de estos genes y diversos factores clínicos y patológicos, con el fin de identificar patrones que pudieran estar vinculados al comportamiento clínico del tumor. Finalmente, se investigó cómo la expresión de estos genes se correlaciona con el pronóstico de las pacientes, particularmente en términos de SG y SLE, proporcionando así una visión integral de su impacto en la evolución del CM.

Teniendo todo esto en cuenta, el análisis realizado en el presente TFM ha permitido obtener importantes hallazgos en relación con estos puntos de control inmunitario:

- 1) *HHLA2* presenta, en general, una infraexpresión en la mayoría de los tumores de la serie clínica estudiada.
- 2) En los fenotipos luminal A y CMTN se observó una tendencia hacia la sobreexpresión de *HHLA2* con respecto al resto de subtipos moleculares.
- 3) *TMIGD2* se sobreexpresó en el 57,6% de los tumores analizados, destacando así su relevancia en el CM infiltrante.
- 4) Los tumores con un tamaño inferior a 20 mm presentaban una sobreexpresión de *HHLA2*.
- 5) Los tumores con una sobreexpresión de *TMIGD2* se asociaban con la ausencia de necrosis.
- 6) Finalmente, respecto al valor pronóstico, encontramos una asociación entre la sobreexpresión de *TMIGD2* y una mayor SLE de las pacientes con CM.

A pesar de la infraexpresión general de *HHLA2*, resultado que no suscribe completamente la hipótesis inicial, los datos sugieren que esta molécula podría tener un papel dual en el desarrollo del CM. Es posible que, en las etapas iniciales de la enfermedad, actúe reclutando y activando el sistema inmunológico a través de su interacción con el receptor *TMIGD2*. Sin embargo, conforme la enfermedad progresa, su rol podría cambiar, contribuyendo a la evasión inmunitaria y la progresión tumoral.

Por otro lado, el papel de adhesión que desempeñan tanto *HHLA2* como *TMIGD2* podría ser un factor crucial en la progresión del cáncer y en su impacto como indicadores pronósticos. Estas moléculas no solo parecen modular el microambiente tumoral, sino que también desempeñan un papel crucial en la estabilidad y organización celular, factores fundamentales en la dinámica del crecimiento tumoral y en la capacidad de las células neoplásicas para invadir y metastatizar. La capacidad de estas moléculas para fortalecer la adhesión célula-célula podría, por tanto, influir significativamente en la progresión del cáncer y en su valor como indicadores pronósticos en pacientes con CM.

En definitiva, nuestros hallazgos, en línea con la literatura actual, subrayan que la expresión y el valor pronóstico de *HHLA2* y *TMIGD2* varían significativamente según el tipo de tumor y el microambiente tumoral. Así, *HHLA2* y *TMIGD2* emergen como moléculas con un notable potencial pronóstico, no solo debido a su papel inmunomodulador, sino también por su función en la adhesión celular. No obstante, se requieren posteriores estudios que incluyan series clínicas más amplias para corroborar nuestros resultados.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alcaide Lucena, M., Rodríguez González, C. J., de Reyes Lartategui, S., Gallart Aragón, R., Sánchez Barrón, M. T., García Rubio, J., & Torné Poyatos, P. (2021). Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications. *Cirugía Andaluza*, 32(2), 155–159. <https://doi.org/10.37351/2021322.9>

Aibar, L., Santalla, A., Criado, M. S. L., González-Pérez, I., Calderón, M. A., Gallo, J. L., & -Parra, J. F. (2011). Clasificación radiológica y manejo de las lesiones mamarias. *Clinica e investigacion en ginecologia y obstetricia*, 38(4), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.gine.2010.10.016>

Armitage, P., & Doll, R. (1954). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/bjc.1954.1>

Arroyo Yustos, M., Martín Angulo, M., & Álvarez-Mon Soto, M. (2017). Cáncer de mama. *Medicine*, 12(34), 2011–2023. <https://doi.org/10.1016/j.med.2017.05.001>

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>

Bardia, A., Punie, K., Barrios, C. H., Schneeweiss, A., Zhai, X., D.H. Huynh, Vaksman, N., Lai, C., & Tolaney, S. M. (2022). 275TiP ASCENT-03: Phase III study of sacituzumab govitecan (SG) vs treatment of physician's choice (TPC) in first-line (1L) metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *Annals of Oncology*, 33, S663–S664. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.1859>

Boulhen, C., Ait Ssi, S., Benthami, H., Razzouki, I., Lakhdar, A., Karkouri, M., & Badou, A. (2023). TMIGD2 as a potential therapeutic target in glioma patients. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1173518>

Cárdenas-Sánchez, J., Valle-Solís, A. A., Arce-Salinas, C., Bargalló-Rocha, J. E., Bautista-Piña, V., Cervantes-Sánchez, G., & col., (2019). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. *Gaceta Mexicana de Oncología* 18, 141-231.

Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>

Copioli, J. C. (2018). Inmunología e inmunopatología : Desde la complejidad biomolecular hacia la simplificación conceptual.

Cortes, J., Cescon, D. W., Rugo, H. S., Nowecki, Z., Im, S.-A., Yusof, M. M., Gallardo, C., Lipatov, O., Barrios, C. H., Holgado, E., Iwata, H., Masuda, N., Otero, M. T., Gokmen, E., Loi, S., Guo, Z., Zhao, J., Aktan, G., Karantza, V., ... Frances, V.-A. (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet*, 396(10265), 1817–1828. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32531-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32531-9)

Ding, L., Yu, Q., Yang, S., Yang, W.-J., Liu, T., Xian, J.-R., Tian, T.-T., Li, T., Chen, W., Wang, B.-L., Pan, B.-S., Zhou, J., Fan, J., Yang, X.-R., & Guo, W. (2022). Comprehensive analysis of HHLA2 as a prognostic biomarker and its association with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 13, 831101. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.831101>

Dong, Q., & Ma, X. (2015). B7-H4 expression is associated with tumor progression and prognosis in patients with osteosarcoma. *BioMed Research International*, 2015, 156432. <https://doi.org/10.1155/2015/156432>

Dunn, Gavin P.; Bruce, Allen T.; Ikeda, Hiroaki; Old, Lloyd J.; Schreiber, Robert D. (2002). *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*, 3(11), 991–998. doi:10.1038/ni1102-991

Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

Espinosa Ramírez, M. (2018). Cáncer de mama. *Revista Médica Sinergia*, 2(1), 8–12.

Fortner, R. T., Sisti, J., Chai, B., Collins, L. C., Rosner, B., Hankinson, S. E., Tamimi, R. M., & Eliassen, A. H. (2019). Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Research: BCR*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1119-y>

Giannakeas, V., Lim, D. W., & Narod, S. A. (2021). The risk of contralateral breast cancer: a SEER-based analysis. *Br J Cancer*, 125(4), 601–610.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

Hoffman B.L., & Schorge J.O., & Bradshaw K.D., & Halvorson L.M., & Schaffer J.I., & Corton (2014). *Williams Ginecología*, (2ed.) McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=2162&sectionid=165573570>

Howard B.A. & Gusterson B. A. (2000). Human breast development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 5(2), 119–137. <https://doi.org/10.1023/a:1026487120779>

Howell, A., Anderson, A. S., Clarke, R. B., Duffy, S. W., Evans, D. G., Garcia-Closas, M., Gescher, A. J., Key, T. J., Saxton, J. M., & Harvie, M. N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(5), 446. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0446-2>

Hu, C., Xu, Z., Chen, S., Lv, H., Wang, Y., Wang, X., Mo, S., Shi, C., Wei, S., Hu, L., Chen, W., & Cheng, X. (2020). Overexpression of B7H5/CD28H is associated with worse survival in human gastric cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(2), 1360–1369. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14812>

Hultborn, K. A., Larsson, L.-G., & Ragnhult, I. (1955). The lymph drainage from the breast to the axillary and parasternal lymph nodes, studied with the aid of colloidal Au<sup>198</sup>. *Acta Radiologica*, 43(1), 52–64. <https://doi.org/10.3109/00016925509172744>

Illumina, R., (2016) Evaluating RNA Quality from FFPE Samples. Technical Note: Library Preparation.

Janakiram, M., Chinai, J. M., Fineberg, S., Fiser, A., Montagna, C., Medavarapu, R., Castano, E., Jeon, H., Ohaegbulam, K. C., Zhao, R., Zhao, A., Almo, S. C., Sparano, J. A., & Zang, X. (2015). Expression, clinical significance, and receptor identification of the newest B7 family member HHLA2 protein. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(10), 2359–2366. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1495>

Kolawole, H. F., Rai, H., Lovrics, P., & Vasudev, P. (2024). The alveolar variant of lobular carcinoma and its mimickers: A case series. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.63909>

Lamb, M., Wei, Y., Ren, X., O'Connor, R., Dulak, A., Rausch, M., Strand, J., Etemad-Gilbertson, B., Gilligan, R., Chappel, S., Shigemura, T., McDermott, D., Freeman, G., & Zang, X. (2022). 489 NPX267, a first-in-class monoclonal antibody targeting KIR3DL3, blocks HHLA2-mediated immunosuppression and potentiates T and NK cell-mediated antitumor immunity. *Regular and Young Investigator Award Abstracts*.

Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One*, 11(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>

Luo, M., Lin, Y., Liang, R., Li, Y., & Ge, L. (2021). Clinical significance of the HHLA2 protein in hepatocellular carcinoma and the tumor microenvironment. *Journal of Inflammation Research*, 14, 4217–4228. <https://doi.org/10.2147/jir.s324336>

Luu, K., Schwarz, H., & Lundqvist, A. (2021). B7-H7 is inducible on T cells to regulate their immune response and serves as a marker for exhaustion. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682627>

Liao, X., & Zhang, D. (2022). HHLA2 immune checkpoint is a novel prognostic predictor in hepatocellular carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 158(1), 62–69. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab221>

Li, Y., Lv, C., Yu, Y., Wu, B., Zhang, Y., Lang, Q., Liang, Z., Zhong, C., Shi, Y., Han, S., Xu, F., & Tian, Y. (2023). KIR3DL3-HHLA2 and TMIGD2-HHLA2 pathways: The dual role of HHLA2 in immune responses and its potential therapeutic approach for cancer immunotherapy. *Journal of Advanced Research*, 47, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.07.013>

Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. (2015). Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 154(2), 213-24.

Macdonald, F., Ford, C., & Casson, A. (2004). *Molecular biology of cancer* (2a ed.). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9780203503447>

Makki, J. (2015). Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8, CPath.S31563. <https://doi.org/10.4137/cpath.s31563>

Munsell, M. F., Sprague, B. L., Berry, D. A., Chisholm, G., & Trentham-Dietz, A. (2014). Body mass index and breast cancer risk according to postmenopausal estrogen-progestin use and hormone

receptor status. *Epidemiologic Reviews*, 36(1), 114–136. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxt010>

Nishimura, C. D., Corrigan, D., Zheng, X. Y., Galbo, P. M., Jr, Wang, S., Liu, Y., Wei, Y., Suo, L., Cui, W., Mercado, N., Zheng, D., Zhang, C. C., & Zang, X. (2024). TOP CAR with TMIGD2 as a safe and effective costimulatory domain in CAR cells treating human solid tumors. *Science Advances*, 10(19). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adk1857>

PDQ Adult Treatment Editorial Board. Breast Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2024 Feb 26. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389406/>

Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Piamo Morales, A. J., Palma Machado, L., Arzuaga Anderson, I., Ferrer Marrero, D., Chávez Jiménez, D., García Rojas, M. A., & Sierra Rosales, J. (2020). Carcinoma medular de mama. Caracterización de una serie de casos, 2010-2019. *Revista de senología y patología mamaria*, 33(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.senol.2019.12.001>

Pollán, M., Casla-Barrio, S., Alfaro, J., Esteban, C., Seguí-Palmer, M. A., Lucía, A., & Martín, M. (2020). Exercise and cancer: a position statement from the Spanish Society of Medical Oncology. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 22(10), 1710–1729. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02312-y>

Pollán M, Salas D, Asuncion N. Prevención del Cáncer de Mama. En: *Manual SEOM de Prevención y Diagnóstico Precoz del Cáncer*. Sociedad Española de Oncología Médica 2017 ISBN 978-84-697-4630-1.

Qi, Y., Deng, G., Xu, P., Zhang, H., Yuan, F., Geng, R., Jiang, H., Liu, B., & Chen, Q. (2019). HHLA2 is a novel prognostic predictor and potential therapeutic target in malignant glioma. *Oncology Reports*, 42(6), 2309–2322. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7343>

Rahimi, N., Rezazadeh, K., Mahoney, J. E., Hartsough, E., & Meyer, R. D. (2012). Identification of IGPR-1 as a novel adhesion molecule involved in angiogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 23(9), 1646–1656. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0934>

Rieder, S. A., Wang, J., White, N., Qadri, A., Menard, C., Stephens, G., Karnell, J. L., Rudd, C. E., & Kolbeck, R. (2021). B7-H7 (HHLA2) inhibits T-cell activation and proliferation in the presence of TCR and CD28 signaling. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(6), 1503–1511. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0361-7>

Riegé, M., López Breccia, P., Santillán, G., & Sylvestre Begnis, M. (2020). Carcinoma Mamaria Lobulillar Pleomórfico vs Carcinoma Lobulillar Clásico. Estudio comparativo descriptivo de características clínicopatológicas y evolución. *Revista Argentina de Mastología*, 39(142), 48–62.

Santaballa Bertrán, A., & Gómez Sepúlveda, N. (2022). Epidemiology of breast cancer. *Revisiones en cáncer*. <https://doi.org/10.20960/revcancer.00004>

Schoemaker, M. J., Nichols, H. B., & Wright, L. B. (2018). Premenopausal Breast Cancer Collaborative Group. Association of body mass index and age with subsequent breast cancer risk in premeno- pausal women. *JAMA Oncol*, 4(11).

Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., & Emens, L. A. (2018). Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(22), 2108–2121. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1809615>

Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.P., & Zhu, H.P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387-1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

Tung, N., Lin, N. U., Kidd, J., Allen, B. A., Singh, N., Wenstrup, R. J., Hartman, A.-R., Winer, E. P., & Garber, J. E. (2016). Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(13), 1460–1468. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.0747>

Wei, S. C., Duffy, C. R., & Allison, J. P. (2018). Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discovery*, 8(9), 1069–1086. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-18-0367>

Xiao, Y., Li, H., Yang, L.-L., Mao, L., Wu, C.-C., Zhang, W.-F., & Sun, Z.-J. (2019). The expression patterns and associated clinical parameters of human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2 and transmembrane and immunoglobulin domain containing 2 in oral squamous cell carcinoma. *Disease Markers*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/5421985>

Xu, G., Shi, Y., Ling, X., Wang, D., Liu, Y., Lu, H., Peng, Y., & Zhang, B. (2021). HHLA2 predicts better survival and exhibits inhibited proliferation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell International*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01930-y>

Yan, H., Qiu, W., & De Gonzalez, K. (2019). HHLA2 is a novel immune checkpoint protein in pancreatic ductal adenocarci- noma and predicts post-surgical survival. *Cancer Lett*, 442, 333- e340.

Yoder, L. (2023). *Precision and accuracy with TaqMan probes - synbio technologies*. Synbio Technologies --. <https://synbio-tech.com/precision-and-accuracy-with-taqman-probes/>

Zhang, M.-J., Wang, S., Wu, C.-C., Wu, L., & Sun, Z.-J. (2022). Expression of HHLA2, TMIGD2, and GTR in salivary gland adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 51(4), 379–387. <https://doi.org/10.1111/jop.13289>

Zhao, R., Chinai, J. M., Buhl, S., Scandiuizzi, L., Ray, A., Jeon, H., Ohaegbulam, K. C., Ghosh, K., Zhao, A., Scharff, M. D., & Zang, X. (2013). HHLA2 is a member of the B7 family and inhibits human CD4 and CD8 T-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9879–9884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303524110>

Zhu, Y., Chen, J., Liu, Y., Zheng, X., Feng, J., Chen, X., Jiang, T., Li, Y., & Chen, L. (2022). Prognostic values of B7-H3, B7-H4, and HHLA2 expression in human pancreatic cancer tissues based on mIHC and spatial distribution analysis. *Pathology, Research and Practice*, 234(153911), 153911. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153911>

Zhu, Y., Yao, S., Iliopoulou, B. P., Han, X., Augustine, M. M., Xu, H., Phennicie, R. T., Flies, S. J., Broadwater, M., Ruff, W., Taube, J. M., Zheng, L., Luo, L., Zhu, G., Chen, J., & Chen, L. (2013). B7-H5 costimulates human T cells via CD28H. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms3043>

## 10. ANEXOS

### 10.1 Informe del comité de ética del departamento de Salud de Alicante – Hospital General Universitario Dr. Balmis



#### **COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE – HOSPITAL GENERAL**

C/. Pintor Baeza, 12 – 03010

Alicante

<http://www.dep19.san.gva.es>

es Teléfono: 965-913-921

Correo electrónico: [ceim\\_hgua@gva.es](mailto:ceim_hgua@gva.es)

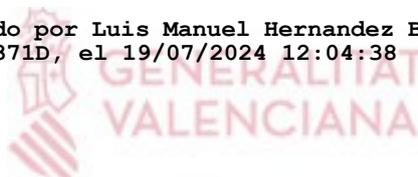
Ref. CEIm: PI2024-082 -Ref. ISABIAL: 2024-0203

#### **INFORME DEL COMITE DE ETICA PARA LA INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS**

Reunidos los miembros del Comité de Ética para la Investigación con medicamentos del Departamento de Salud de Alicante – Hospital General, en su sesión del día 29 de mayo de 2024 (Acta 2024-05), y una vez estudiada la documentación presentada por **D. José Juan Ponce Lorenzo** del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario Dr. Balmis, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado **"Estudio molecular de HHLA-2, TMIGD2 y KIR3DL3 e implicación clínico-patológica en cáncer de mama" V.1.1 del 17 de junio de 2024**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos. Se informa a su vez de que este estudio ha solicitado la exención del Consentimiento Informado.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Alicante

Firmado por Luis Manuel Hernandez Blasco -  
21424371D, el 19/07/2024 12:04:38



Fdo. Dr. Luis Manuel Hernández Blasco  
Secretario Técnico CEIm Departamento  
de Salud de Alicante – Hospital General

## 10.2 Presentación del trabajo al congreso *36th European Congress of Pathology*

Dear Montoyo Pujol,

On behalf of the European Society of Pathology, we thank you for your abstract submission for the **36th European Congress of Pathology** to be held in Florence, Italy from 7 to 11 September 2024.

We are pleased to inform you that your abstract **HHLA2 and TMIGD2 gene expression in breast carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognostic value** has been accepted as a **Poster (physical)** and will be part of the Scientific Programme during the congress.

Your poster presentation is scheduled for the following session:

Session: **Poster Session Breast Pathology**

Date: **08/09/2024**

Time: **09:30 - 10:30**

Poster number: **022**

Your full poster number displayed at the poster board on-site is based on the session code and your individual 3-digit poster number (e.g. PS-01-001).

## 10.3 Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030



**ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030**

**Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.**

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>				X
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>				X
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>	X			
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>				X
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>				X
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>				X
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				X
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>				X
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>				X
ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>				X
ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				X
ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>				X
ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>				X
ODS 14. <b>Vida submarina.</b>				X
ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>				X
ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				X
ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				X

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

\*\*\*Utilice tantas páginas como sea necesario.

El Trabajo de Fin de Máster (TFM) se alinea estrechamente con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 3: "Salud y Bienestar", el cual abarca tanto la prevención y el tratamiento de enfermedades como la investigación para mejorar la calidad de vida y la salud global.

El TFM investiga la expresión génica de las proteínas HHLA2 y TMIGD2 en el cáncer de mama (CM) y su asociación con factores clínico-patológicos y el pronóstico de las pacientes. Este trabajo no solo contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en el CM, sino que también abre nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas, como la inmunoterapia, que está emergiendo como un enfoque prometedor en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluido el CM.

Por otro lado, el estudio subraya la importancia de la investigación básica en la identificación de biomarcadores de pronóstico, como TMIGD2, que podrían ayudar a personalizar los tratamientos y a identificar de manera más precisa a aquellas pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de estrategias terapéuticas específicas. Esta alineación con el ODS 3 es crucial, ya que la personalización de los tratamientos no solo mejora los resultados clínicos, sino que también reduce la carga de tratamientos innecesarios, contribuyendo así a un sistema de salud más eficiente y equitativo.

En resumen, este TFM contribuye a los objetivos de "Salud y Bienestar" del ODS 3 al avanzar en el conocimiento sobre el CM y las posibles terapias inmunológicas, lo que podría llevar a mejoras significativas en la prevención, el diagnóstico y tratamiento.