

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
**DESVELANDO LAS VÍAS MOLECULARES QUE LLEVAN AL DESARROLLO DE LA
METÁSTASIS CUTÁNEA EN EL CÁNCER DE MAMA**

MEMORIA CIENTÍFICA

1. ANTECEDENTES

La enfermedad metastásica es el último estadio, normalmente fatal, en el desarrollo del cáncer. Es un proceso complejo en el que se propagan las células de un tumor primario focalizado a órganos distales, alterando la angiogénesis y presentando un crecimiento descontrolado en estos tejidos distales. El proceso metastásico se inicia cuando una o más células diseminan a través del sistema sanguíneo y linfático, escapando así del tumor primario. Tras penetrar en el torrente linfático y sanguíneo paralelamente, las células tumorales circulan, se produce éstasis dentro del vaso, extravasación, invasión del nuevo tejido y finalmente las células cancerígenas proliferan en el sitio de la metástasis. [1, 2].

El cáncer de mama, aunque pueda producir metástasis óseas, pulmonares, en el hígado y en el sistema nervioso central, es el tumor más propenso a metástasis a la piel en mujeres [3, 4, 5, 6]. Estas metástasis cutáneas son el resultado de la embolización linfática, diseminación hematógena o contigua [7] y están presentes en torno al 24% de los pacientes con cáncer de mama metastásico [3, 4, 5, 6]. Además, debido a la alta incidencia de carcinoma de mama, estas manifestaciones cutáneas son las metástasis más comunes entre las mujeres vistas por los dermatólogos, concretamente el 69% de estas metástasis proceden de un cáncer de mama [6].

Las metástasis mamarias cutáneas tienden a desarrollarse en la pared torácica, aunque también pueden desarrollarse en abdomen, extremidades, cabeza o cuello [4, 5, 6]. La localización de estas metástasis no es completamente al azar sino que se produce con mayor frecuencia en las proximidades del tumor primario, hecho que puede ocurrir por extensión directa del tumor subyacente o por diseminación linfática [4, 8].

Además de poder desarrollarse en diferentes localizaciones, las metástasis cutáneas mamarias pueden manifestarse en una gran variedad de formas. Los nódulos son la presentación más común (80%), pero hay otros patrones [3, 6].

El resto de presentaciones cutáneas incluyen al carcinoma telangiectásico con una incidencia de 8-11%, carcinoma eretiloide con una incidencia del 3-6.3%, carcinoma en cuirasse con una incidencia del 3-4% y alopecia neoplásica con una incidencia del 2-12% [3, 6, 9].

Tanto el tipo de manifestación de las metástasis cutáneas, como el tipo de metástasis que se producen, varían según cada subtipo molecular de cáncer de mama, ya que cada uno es diferente en cuanto a su capacidad para hacer metástasis a órganos distantes. Kong et al., incluyeron en su estudio 125 mujeres con metástasis en piel y/o tejido blando de cáncer de mama y observaron que el tipo histopatológico principal era el carcinoma ductal invasivo (95.2%) seguido del tipo lobular (2.4%) y otros (2.4%). Compararon las características clínicas y los patrones de infiltración cutánea y/o de tejidos blandos de tres subtipos de cáncer de mama y entre estos pacientes, el hormonal fue el subtipo más frecuente, seguido de HER2 enriquecido y luego el triple negativo (TN) (42.4, 34.4 y 23.2%), respectivamente. El subtipo TN además sobreexpresaba EGFR. Y también observaron que más de la mitad de los pacientes tenían más de una metástasis visceral en el momento del diagnóstico de metástasis cutáneas; pulmón en 45 pacientes (36.0%), hueso en 52 pacientes (41.6%), cerebro en 2 pacientes (1.6%) e hígado en 17 pacientes (13.6%) [10].

Sin embargo, las metástasis cutáneas de cáncer de mama, sin importar el subtipo, suelen producirse en el contexto avanzado de la enfermedad, en las últimas etapas del curso del cáncer. Brownstein et al., analizaron 724 casos de cánceres metastásicos con metástasis cutáneas y observaron que tan solo en el 3% de los casos de cáncer de mama metastásico, la metástasis en la piel fue el signo de presentación de la enfermedad [11] y el objetivo del tratamiento no es curativo [12]. Todo esto confiere un pobre pronóstico, con una media de supervivencia de 3 a 6 meses, con escasas diferencias respecto a si las lesiones son únicas o múltiples, siendo la mortalidad superior al 70% en el primer año tras el diagnóstico [13]. Encontrar marcadores moleculares en el tumor primario que predigan las metástasis cutáneas sería de gran ayuda en la clínica para poder predecir qué pacientes van a sufrir esta enfermedad y cuáles no.

En resumen, el descubrimiento de nuevos marcadores moleculares para la predicción de la metástasis cutánea en cáncer de mama y el conocimiento de los procesos biológicos que llevan al desarrollo de esta metástasis, serían de gran ayuda en la clínica diaria. Se podría predecir a tiempo los pacientes que van a desarrollar una metástasis cutánea, y con el conocimiento de las cascadas de señalización, se podrían valorar tratamientos para inhibir e impedir que el tumor primario de mama invada el tejido cutáneo.

2. EL DESAFÍO

El objetivo de este trabajo es encontrar marcadores predictivos e identificar las cascadas de señalización que median en el desarrollo de la metástasis cutánea en el cáncer de mama. La hipótesis principal de este estudio es la existencia de

alteraciones moleculares específicas en el tumor primario (mutaciones, reordenamientos cromosómicos, etc.) que permiten o condicionan las metástasis cutáneas en ciertos pacientes de cáncer de mama. Por lo tanto, creemos que la identificación de estas alteraciones podría ayudar a desarrollar estrategias de prevención y tratamiento de la metástasis cutánea asociada al cáncer de mama en momentos más precoces. Si identificamos los factores de riesgo y las rutas de señalización que median en la metástasis cutánea, podremos detectar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad y administrarles un tratamiento adyuvante específico, realizarles un seguimiento estricto y aplicar métodos de profilaxis primaria y/o estrategias de tratamiento específicas.

De este modo, la finalidad última de este proyecto es reducir la incidencia de esta enfermedad incapacitante, así como la morbilidad y mortalidad asociadas a la metástasis cutánea en el cáncer de mama.

Este es un trabajo pionero, ya que los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de metástasis cutánea en el cáncer de mama son actualmente desconocidos.

3. OBJETIVOS Y VARIABLES DEL SUBESTUDIO 3.1. Objetivo principal

El objetivo principal de este estudio es identificar las alteraciones moleculares del cáncer de mama que favorecen el desarrollo de metástasis cutáneas, con el fin último de lograr identificar rápidamente a aquellos pacientes que presentan un mayor riesgo de desarrollar estas metástasis. Esto permitirá desarrollar estrategias terapéuticas basadas en las características moleculares de los tumores de mama, con el fin de prevenir y tratar la metástasis cutánea asociada a estos tumores.

3.2. Objetivos secundarios

Identificación de alteraciones génicas (mutaciones, CNV, reordenamientos, etc.) en cáncer de mama primario que se relacionen con el desarrollo de metástasis cutánea en una serie retrospectiva de pacientes.

Validación del conjunto de alteraciones génicas identificadas en el objetivo 1 en una serie independiente retrospectiva de pacientes con cáncer de mama.

Validación del conjunto de alteraciones génicas identificadas en el objetivo 1 en una serie prospectiva de pacientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Identificación de alteraciones génicas (mutaciones, CNV, reordenamientos, etc.) en cáncer de mama primario que se relacionen con el desarrollo de metástasis cutánea.

- En primer lugar, se identificará a los pacientes con metástasis cutánea a través de la base de datos y se recogerán muestras de tejido tumoral primario (de la mama).

- Como grupo control se utilizarán 3 poblaciones:

- a) Pacientes con cáncer de mama y enfermedad metastásica pero sin metástasis cutánea.

- b) Pacientes con cáncer de mama y enfermedad metastásica de varios tipos, incluyendo metástasis cutánea.

- c) Pacientes con cáncer de mama pero sin enfermedad metastásica (con el mismo tiempo de seguimiento desde el diagnóstico de cáncer).

- Se tomarán muestras del tumor primario pertinentemente relacionadas de estos tres grupos de control.

- Se utilizarán los siguientes factores para parear los casos y los controles: edad de la paciente, expresión de receptores hormonales, expresión del receptor HER2 y localizaciones de metástasis además de metástasis cutánea.

- Se recogerán los datos demográficos y clínico-patológicos de las pacientes a partir de base de datos de la institución.

- Se examinarán las secciones de los tumores con tinción de hematoxilina-eosina para identificar las regiones que contienen células tumorales. Se extraerá el ADN del tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina (FPET) con el Kit QIAamp ADN FFPE Tissue.

- Se hará un estudio cuantitativo y cualitativo de las muestras de ADN. Esto se hará mediante el Qubit y la TapeStation (Agilent 2200 TapeStation) respectivamente.

- Construcción de librerías y secuenciación masiva de exoma completo. La preparación de librerías para la posterior secuenciación consiste en la creación de una colección de fragmentos de ADN de interés. En este proyecto estos fragmentos incluirán todas las regiones codificantes del genoma.

- Análisis Bioinformático. Haremos un análisis Pipeline desarrollado por el equipo, el cual consta de diferentes etapas. La primera es un control de calidad. Posteriormente, es necesario un alineamiento de las secuencias con un genoma

de referencia. Una vez terminada la alineación, el siguiente paso será la llamada de variante, la haremos a través de VarScan2 obteniendo un archivo VCF. Por otro lado, usaremos el archivo BAM para visualizar datos de alineación y variantes usando la herramienta de visualización interactiva IGV. Además, de esta forma analizaremos la cobertura. Una vez obtengamos el archivo VCF,

utilizaremos la versión del genoma público hg38 frente a Ensembl versión 88 para incluir información relevante y hacer una anotación funcional de las variantes genómicas que detectemos mediante el uso de diferentes bases de datos públicas, como COSMIC, 1000 Genomes, Ensembl, NCBI o CIBERER Spanish Variant Server. Finalmente haremos un filtrado siguiendo estos criterios: Consecuencia, variante de frecuencia y frecuencia alelo menor global (GMAF). También haremos paralelamente un análisis de la variación del número de copias usando el programa Contra, el resultado de este programa es un dato global de cobertura por cromosoma en el cual son nuestros genes de interés.

– Se calculará la correlación existente entre las mutaciones génicas y el desarrollo de metástasis cutánea. Los genes con mayor coeficiente de correlación (coeficiente de Spearman) son los que tienen mayor probabilidad de ser indicadores pronósticos, esto sugerirá el desarrollo o no de metástasis cutánea.

Validación del conjunto de alteraciones génicas identificadas en el objetivo 1 en una serie independiente retrospectiva de pacientes con cáncer de mama.

– Tras identificar las mutaciones génicas asociadas a la metástasis cutánea en el conjunto de datos de entrenamiento, se realizará un estudio de validación en el que se emplearán otras muestras de tumores primarios de pacientes con y sin metástasis cutánea.

– Se confirmará la asociación entre genes mutados con el conjunto de datos de entrenamiento, y se dividirán los genes mutados en supresores tumorales y oncogenes.

Validación del conjunto de alteraciones génicas identificadas en el objetivo 1 en una serie prospectiva de pacientes.

– Se realizará una validación prospectiva de los genes candidatos con una cohorte mayor de pacientes, a los que se hará un seguimiento para comprobar si desarrollan metástasis cutánea.

5. EQUIPO

Investigador Principal y Director del proyecto: Javier Cortés Castán

Resto equipo investigador:

José Palacios Calvo

María Fernández Abad

Silvia González Martínez

6. PRESUPUESTO

FUNGIBLES Y SIMILARES	Para 100 biopsias
Puntas y tubos	769,00 €
Gradilla magnética	500,00 €
Kits de extracción de DNA	640,00 €
Qubit™ dsDNA reactivos	175,10 €
Qubit™ Assay Tubes	85,85 €
D1000 ScreenTape	142,99 €
D1000 Reagents containing Sample Buffer and Ladder	60,83 €
D1000 ScreenTape High Sensitivity D1000 ScreenTape	232,26 €
High Sensitivity D1000 Reagents containing Sample Buffer and Ladder	79,00 €
Genomic DNA ScreenTape y Genomic DNA reagents	313,63 €
Box of 384	91,64 €
Strips of 8 PCR tubes for use in the Mx3000P/Mx3005P system	78,21 €
Limpiador de lentes y Agua M220 AFAGrade water	106,61 €
Microtube 50 AFA COVARIS	696,00 €
Herculase II Fusion DNA Polymerase	193,60 €
SureSelect Human All Exon V6	3.145,00 €
SureSelectXT Reagent kit for 16 samples	2.820,00 €
AMPure XP Beads	1.136,61 €
Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1	1.388,80 €
Total	12.655,13 €

GASTOS DE SERVICIOS	
Servicio de secuenciación	65.000,00 €
Servicio de bioinformática y estadística	3.000,00 €
Total	68.000,00 €

GASTOS DE VIAJES	
Asistencia a congresos	1.500,00 €
Total	1.500,00 €

GASTOS DE PERSONAL	
Total a tiempo parcial (2 años)	38.208,00 €

OVERHEADS	
Total	25.792,00 €

TOTAL DEL PROYECTO	146.155,13 €
---------------------------	---------------------

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Chiang, A., & Massagué, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal Of Medicine*, 359(26), 2814-2823. doi: 10.1056/nejmra0805239
2. Liotta, L. (1990). Cancer invasion and metastases. *JAMA: The Journal Of The American Medical Association*, 263(8), 1123-1126. doi: 10.1001/jama.263.8.1123
3. De Giorgi, V., Grazzini, M., Alfaioli, B., Savarese, I., Corciova, S., Guerriero, G., & Lotti, T. 2010. Cutaneous manifestations of breast carcinoma. *Dermatologic Therapy*, 23(6), 581-589. doi: 10.1111/j.1529-8019.2010.01365.x
4. Guanziroli E, et al. (2017). Cutaneous metastases of internal malignancies: an experience from a single institution. *Eur J Dermatol*, 27(6):609-614. doi: 10.1684/ejd.2017.3142
5. Alcaraz, I., Cerroni, L., Rütten, A., Kutzner, H., & Requena, L. (2012). Cutaneous Metastases From Internal Malignancies. *The American Journal Of Dermatopathology*, 34(4), 347-393. doi: 10.1097/dad.0b013e31823069cf
6. Tan, A. (2016). Cutaneous manifestations of breast cancer. *Seminars In Oncology*, 43(3), 331-334. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.030
7. Bittencourt, M., Carvalho, A., Nascimento, B., Freitas, L., & Parijós, A. (2015). Cutaneous metastasis of a breast cancer diagnosed 13 years before. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 90(3 suppl 1), 134-137. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153842
8. Torres-Aja L. Metástasis cutánea de carcinoma mamario: cáncer de mama en coraza. Revisión de la literatura y presentación de un caso. *Revista Finlay [revista en Internet]*. 2012 [citado 2018 Jul 19]; 2(3): [aprox. 5 p.]. Disponible en: <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/121>
9. Mordenti C, Peris K, Concetta Fagnoli M et al. Cutaneous metastatic breast carcinoma. *Acta Dermatovenerologica* 2000; 9: 143-148
10. Kong, J., Park, Y., Kim, J., Kim, J., Yun, J., & Sun, J. et al. (2011). Patterns of Skin and Soft Tissue Metastases from Breast Cancer according to Subtypes: Relationship between EGFR Overexpression and Skin Manifestations. *Oncology*, 81(1), 55-62. doi: 10.1159/000331417
11. Brownstein, M., & Helwig, E. (1972). Metastatic tumors of the skin. *Cancer*, 29(5), 1298-1307. doi: 10.1002/1097-0142(197205)29:5<1298::aid-cncr2820290526>3.0.co;2-6
12. Moore, S. (2002). Cutaneous Metastatic Breast Cancer. *Clinical Journal Of Oncology Nursing*, 6(5), 255-260. doi: 10.1188/02.cjon.255-260
13. Medigraphic.com. (2018). [online] Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2009/mc093b.pdf> [Accessed 30 Jul. 2018].