

## Características del fenotipo triple negativo del cáncer de mama y su relación con la propagación de metástasis al sistema nervioso central.

**Katerin Rojas Laimito**<sup>1</sup>, Angelo Gámez-Pozo<sup>2</sup>, Juan Sepúlveda<sup>1</sup>, Luis Manso<sup>1</sup>, Rocío López-Vacas<sup>3</sup>, Tomás Pascual<sup>1</sup>, Juan A. Fresno Vara<sup>3</sup>, Eva Ciruelos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de oncología médica. Hospital 12 de Octubre, España.

<sup>2</sup>Biomedicina molecular, España.

<sup>3</sup>Laboratorio de oncología y patología molecular. Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital La Paz, España.

**Correspondencia a:** [Katerinrojasl@hotmail.com](mailto:Katerinrojasl@hotmail.com)

Hospital 12 de Octubre, Madrid-Spain

Av. de Córdoba, s/n, 28041

### RESUMEN

**Objetivos:** El cáncer de mama es el más común en las mujeres, con una incidencia de entre el 20% y el 30% del total de tumores malignos, y continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres europeas. La agresividad biológica del cáncer de mama triple negativo (TN) está relacionada con elevado índice de propagación, siendo muy habitual el desarrollo de metástasis al sistema nervioso central (SNC). La finalidad del presente estudio es dilucidar la conexión entre los perfiles de expresión génica del PTGS2, el HB-EGF y el ST6GALNAC5 y la propagación de metástasis al SNC en el cáncer de mama TN.

**Metodología:** Estudio de casos y controles retrospectivo que contrasta pacientes (pts) con metástasis en el SNC frente a aquellos sin metástasis tras recibir un tratamiento adyuvante. Se realizó la selección de muestras, adjuntando 30 muestras tanto al grupo de casos como al grupo de control. Se recogieron del biobanco del Hospital 12 de Octubre las muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). Se desparafinaron con xileno y lavaron con etanol cinco cortes de 10 µm de cada una de las muestras FFPE, para posteriormente extraer el ARN con el Kit Recover All (de Ambion). Se cuantificó la expresión génica con ensayos basados en sondas TaqMan.

**Resultados:** El grupo estudiado fue de cincuenta y tres pts. Media de edad de 55 años (grupo de edad entre 25 y 85). Cuarenta y tres pts (88,67%) presentaban carcinoma ductal, con tumores de estadio avanzado (III) en el caso de 40 pts (75,47%). Ocho mujeres del grupo de casos presentaron metástasis a distancia de SNR como manifestación clínica inicial (34,80%); tres, metástasis locales (13,04%); dos, metástasis pulmonar (8,7%), una, ósea (4,34%) y siete de ellas a otras localizaciones (30,38%). En cuanto al grupo de control, la incidencia de metástasis a distancia como manifestación clínica inicial fue del 46,1% (6 pacientes), del 15,4% en el caso de metástasis ósea (2 pacientes), del 15,4% pulmonar (1 paciente) y del 23,1% a otras localizaciones (4 pacientes). Se extrajo ARN con éxito de 53 de 60 muestras. Los valores de expresión génica de los genes PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5 no guardaban relación con la localización de las metástasis.

**Conclusión:** Los tumores triple negativo suelen metastatizar a las vísceras, especialmente a los pulmones y al cerebro y es menos probable que se propaguen al hueso. La literatura indicaba que la expresión génica de los tres genes objeto de estudio (PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5) podría variar en pacientes de cáncer de mama TN con metástasis al SNC al contrastarlas con pacientes sin metástasis. No hemos hallado un patrón de expresión génica diferencial en los genes PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5 en tumores de mama TN con metástasis al SNC. Son necesarios más estudios para aclarar la función de dichos genes en las metástasis al SNC en pacientes de cáncer de mama TN.

**Declaración de intereses:** Nada que declarar

**PALABRAS CLAVE:** Triple negativo, cáncer de mama, metástasis, sistema nervioso central.

## 1 INTRODUCCION

La incidencia de cáncer de mama (CM) es cada vez mayor <sup>1</sup>, llegando a desplazar a la patología cardiovascular como la primera causa de mortalidad en la población femenina occidental. En España tiene una incidencia, mortalidad y prevalencia anual a 5 años de 29%, 15% y 41% respectivamente (Globocan 2012), y representa la tercera neoplasia más mortal en España<sup>2,3</sup> con una incidencia anual de 61 casos por cada 100.000 mujeres. El CM subtipo Triple Negativo (TN) representa aproximadamente el 10-20% de todos los casos de CM en mujeres caucásicas y se caracteriza por afectar a mujeres jóvenes, asociarse a características patológicas de mal pronóstico, altas tasas de recaída tumoral temprana, alta tasa de metástasis viscerales (20-30%, en especial pulmón y cerebro), supervivencia corta y ausencia de tratamiento biológico dirigido. Además, está relacionado con el grupo basal-like obtenido mediante análisis genético y con tumores asociados a alteraciones de BRCA1<sup>12-13,36</sup>. Las alteraciones genéticas tumorales definen la conducta de este tumor y podrían ser las responsables del mal pronóstico en este tipo de pacientes<sup>7</sup>. Recientes estudios señalan que la menor supervivencia en el grupo de pacientes con CM es debido a dos características: fenotipo triple-negativo (TN) y desarrollo de metástasis al sistema nervioso central (SNC)<sup>6,19</sup>. Un estudio reciente sugiere que la expresión diferencial de algunos genes se relaciona con la aparición de metástasis cerebrales<sup>7</sup>.

Los estudios de expresión genética, basados en estudios de niveles de mRNA como la plataforma PAM50 (RT-PCR)<sup>11</sup>, han identificado al menos 4 subtipos moleculares de CM con comportamiento clínico diferente: Luminal A, Luminal B, HER2 y Basal-like<sup>4</sup>. La aproximación de esta clasificación basada en estudios con mRNA a una clasificación basada en inmunohistoquímica muestra que la mayoría de los tumores que pertenecen al subtipo Basal-like que carecen de la expresión de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona y HER-2, los llamados tumores Triple-Negativos (TN)<sup>5</sup>. A pesar que el grupo TN agrupa tumores

que comparten un curso agresivo, no es del todo homogéneo y existen al menos 6 subgrupos de tumores con diferentes patrones de expresión génica<sup>12</sup>.

El único estudio (BOS y Col.) que ha evaluado marcadores adicionales relacionados con el desarrollo de metástasis a nivel cerebral encuentra que células de CM RE-negativo expresan en forma alterada 3 genes (PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5): estas células tienen una predisposición a diseminarse a nivel del SNC. En condiciones fisiológicas normales, ST6GALNAC5 se expresan sólo a nivel cerebral<sup>38,39</sup>.

En este presente trabajo analizamos la expresión de tres genes de interés (PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5) en el tejido FFPE de tumores primarios de mama fenotipo TN que presentan metástasis a SNC frente a pacientes que no presentan metástasis cerebral.

## **2 MATERIALES AND METODOS**

### **DISEÑO MUESTRAL Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

El diseño de estudio fue Observacional Analítico de Tipo **Caso** (30 muestras con metástasis a SNC) - **Control** (30 muestras sin metástasis a SNC), escogidos con características similares a cada caso. El presente estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético institucional del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

#### **SELECCIÓN DE PACIENTES:**

Pacientes diagnosticados con CM durante el periodo 1/01/1994 - 31/12/2012 con información clínica y seguimiento clínico actualizado disponible en el Servicio de Archivo y Documentación del Hospital 12 de Octubre.

#### **OBTENCION DE LA MUESTRA:**

La selección de las muestras biológicas se realizó a partir del banco de muestras en tejidos parafinados del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre.

Se seleccionaron los casos con fenotipo TN con un adecuado seguimiento y con muestra tumoral fijada en formol y embebida en parafina (FFPE) al menos con un 50% de células tumorales, en el archivo de anatomía patológica. Posteriormente se tomaron 30 casos que desarrollaron posteriormente metástasis a nivel del SNC y 30 casos que no desarrollaron.

#### **ANALISIS DE LA MUESTRA:**

##### **Procesamiento de las muestras:**

Se realizaron cortes a 10 micras de los bloques de tejido FFPE en un microtomo. El RNA se aisló empleando el RecoverAll Kit de la casa Life Technologies siguiendo el protocolo del fabricante. Los ácidos nucleicos así aislados fueron y cuantificados mediante espectrofotometría UV.

##### **Análisis de la Expresión Génica mediante RT-qPCR:**

Se analizó la expresión, mediante PCR cuantitativa, de tres genes de interés (PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5) y dos genes de referencia (IPO8 y POLR2A) validados para su uso como genes de referencia en cáncer de mama empleando tejido parafinado (Sánchez-Navarro et al. *Biotechniques*. 2010;48(5):389-97), utilizando sondas TaqMan (ThermoFisher Scientific). A partir de 50-100 ng del RNA extraído de las muestras FFPE se llevó a cabo una transcripción reversa de 1ug de RNA total con el “High Capacity cDNA Reverse Transcription kit” de Life Technologies, todo ello siguiendo el “TaqManGene Expression Assays Products Protocol” de la mencionada compañía.

<b>Gen</b>	<b>Assay ID</b>
IPO8	Hs00183533_m1
POLR2A	Hs00172187_m1
PTGS2	Hs00153133_m1
HBEGF	Hs00181813_m1
ST6GALNAC5	Hs00229612_m1

#### **Análisis Estadístico:**

Estos datos de expresión (valores Ct) se obtuvieron por triplicado para cada muestra, y se calculó el  $Ct_{\text{medio}}$ . Los valores ausentes se sustituyeron por un valor máximo de Ct, que se fijó en 40. Posteriormente, los valores de expresión de los genes de interés se normalizaron empleando el método  $\Delta Ct$ , que consiste en calcular valores de expresión relativa como diferencias entre un factor de normalización, que en este caso es la media geométrica de la expresión de los dos genes de referencia, y los valores de  $Ct_{\text{medio}}$  de cada gen. Posteriormente se sumó una constante y se obtuvo un valor de expresión relativo para cada gen en cada muestra, en el que un incremento de 1 supone el doble de expresión (. Para evaluar si hay una expresión diferencial de los genes de interés en pacientes de cáncer de mama TN que presentan metástasis en SNC frente al grupo que no las presentan, se aplicó el test de Mann Whitney.

## **RESULTADOS**

### **CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES**

La mediana de edad de las pacientes del estudio era 55 años (rango 25-85). En este grupo de pts, 47 (88.67%) eran de tipo histológico Ductal y 40 pts (75.47%) presentaban grado

histológico III. En cuanto al tamaño tumoral y compromiso ganglionar, se resume en la Tabla 1.

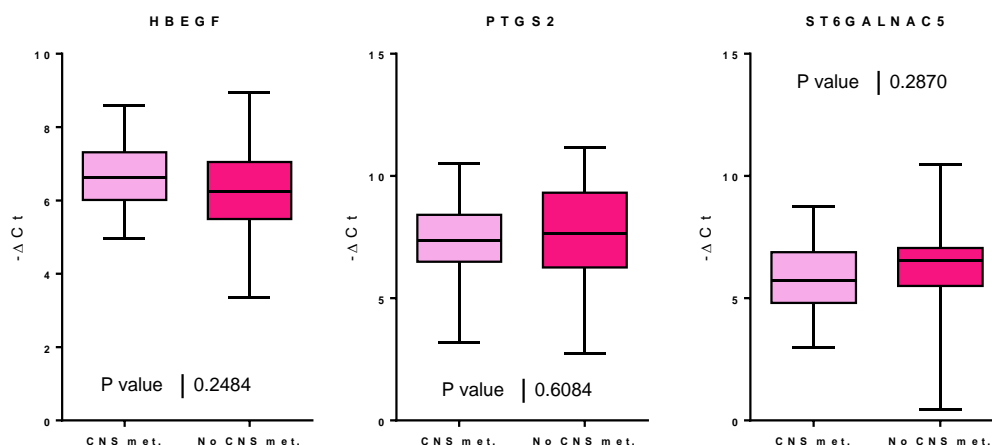
En el grupo **Caso** presentaron metástasis cerebral como primer lugar de recurrencia 8 pts(34.80%) ,recurrencia local 3 pts(13.04%), pulmón 2 pts(8.7%), óseo 1 pts(4.34%) y otras localizaciones 7pts(30.08%). En el grupo **Control**, presentaron recaída local como primer lugar de recurrencia a distancia 6pts(46.1%), óseo 2pts(15.4%), pulmón 1 pts(7.7%) y otros lugares 4 pts(23.1%).

**Table 1.**

	<b>Patients(pts)</b>	<b>%</b>
<b>T<sub>1</sub></b>	9	16.98
<b>T<sub>2</sub></b>	34	64.15
<b>T<sub>3</sub></b>	6	11.32
<b>T<sub>4</sub></b>	4	7.54
<b>N<sub>0</sub></b>	20	37.73
<b>N<sub>1</sub></b>	13	24.52
<b>N<sub>2</sub></b>	6	11.32
<b>N<sub>3</sub></b>	14	26.41

#### **EVALUACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES (PTGS2, HBEGF, ST6GALNAC5)**

De las 60 muestras seleccionadas, se extrajo RNA en cantidad suficiente para llevar a cabo los experimentos de 53 muestras. Se evaluó la expresión de los genes PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5 en los 2 grupos de interés. No se hallaron diferencias significativas en la expresión de estos 3 genes entre ambos grupos de pacientes.



## DISCUSION

El CM, como se ha mencionado previamente, es una enfermedad genéticamente heterogénea y su incidencia, características clínicas y pronóstico difieren en forma importante de acuerdo a la etnicidad y la raza<sup>21</sup>. Estudios realizados en Norte América encuentran que las pacientes Latinas tienen una incidencia menor y presentan mayor mortalidad por CM que las pacientes de raza caucásica. Así mismo, la tasa de tumores TN es significativamente mayor en este grupo de pacientes<sup>22-34</sup>.

El proceso de metástasis es complejo e incluye intravasación celular, sobrevivida en la circulación, extravasación en un órgano distante, angiogénesis y crecimiento sin inhibición en el tejido huésped<sup>8</sup>. Estudios de expresión genética tumoral encuentran que la expresión de algunos genes habilita a las células tumorales y las predisponen a la diseminación en forma específica a órganos como los pulmones<sup>9-10</sup>

La exploración de esta patología ha empezado a dar resultados y encontramos diversos estudios que encuentran respuestas, aunque aún modestas, a drogas como anti- EGFR (cetuximab y erlotinib), inhibidores de Scr (dasatinib) y anti- angiogénicos (bevacizumab)<sup>14</sup>. Adicionalmente, en la actualidad se encuentran en estudio drogas dirigidas contra blancos que incluyen la vía de PI3K/ PTEN/AKT y Notch- Survivin<sup>14,16,17</sup>.

La evaluación epidemiológica de las pacientes con CM atendidas en el Hospital Universitario 12 de Octubre realizada por nuestro grupo encuentra que el fenotipo TN, coincidentemente con los reportes Norte-Americanos, representa a alrededor del 20% de los tumores de mama<sup>22</sup>.

El desarrollo de metástasis cerebral difiere de aquellas en otras localizaciones debido a particularidades como la especial composición y densidad del parénquima cerebral y su alta impermeabilidad de la barrera hemato-encefálica(BHE) producida por la complejidad de las estructuras que la forman que incluyen uniones estrechas, ausencia de fenestraciones y una actividad pinocítica muy baja, así como una matriz extracelular, pericitos y procesos pódicos de astrocitos. Los capilares cerebrales tienen también una gran resistencia eléctrica que aumenta la impermeabilidad de esta membrana a los substratos polares e iónicos. A esto se suma un conjunto de transportadores de extracción que incluyen p-glicoproteína, MRP-1 a 6, BCRP(Breast cancer resistant protein), y transportadores de aniones y cationes orgánicos<sup>20</sup>. Todo ello hace que el paso de las terapias sistémicas a través de la BHE y por tanto su acceso a los lugares del cerebro donde existen metástasis sea bajo e insuficiente para garantizar la eficacia de la mayoría de los tratamientos disponibles.

**Bos et al** seleccionó células de CM RE-negativo con gran predisposición a infiltrar el cerebro y evaluó la expresión de más de 240 genes en ellas. El proceso incluyó la inoculación de estas células en modelos murinos, y la selección de aquellas células con gran capacidad de desarrollar metástasis cerebrales. Luego de identificar genes en modelo in vivo se evaluó el rol de estos en base a los datos de tumores de mama y así se seleccionaron un grupo de genes relacionados con el desarrollo de metástasis cerebral en tumores de mama RE-negativos. Ellos encontraron que la expresión alterada de 17 genes se asociaba al desarrollo de metástasis cerebrales. Tres de estos genes presentaron alta expresión: Gen de la ciclooxigenasa COX2, un ligando de EGFR y el gen de  $\alpha 2, 6$ - sialiltransferasa ST6GALNAC5. La identificación del gen COX2 en este grupo demuestra la importancia del proceso de inflamación en el desarrollo de metástasis a cerebro, mientras que genes relacionados al factor de crecimiento epitelial (EGF) se relacionan con la capacidad de replicación de la célula tumoral. Finalmente, sialiltransferasas están relacionadas con las interacciones célula- célula y la alteración en esta capacidad podría estar relacionada con la capacidad de producir metástasis a distancia<sup>7</sup>.

Los tumores TN frecuentemente metastatizan a órganos viscerales, particularmente pulmón y cerebro, y menos frecuente a nivel óseo. La literatura sugiere que la expresión de los 3 genes de interés (PTGS2, HBEGF y ST6GALNAC5) deberá ser diferente en pacientes con CMTN que desarrollaron metástasis a nivel cerebral cuando se compara con pacientes que no desarrollan metástasis al SNC.

Nosotros no hallamos un patrón de expresión diferencial en estos genes (PTGS2, HBEGF, ST6GALNAC5) en el tumor primario de mama que desarrolla metástasis cerebral. Esto puede deberse a que las metástasis cerebrales albergan alteraciones genéticas distintas a los observados en los tumores primarios que aún es desconocido. Priscilla K. Brastianos y Col. (Cancer Discov. 2015 Sep 26) realizaron la secuenciación del exoma de 86 metástasis cerebrales emparejados con el tejido tumoral primario y tejido normal; encontrando en el 53% de los casos alteraciones clínicamente informativas en las metástasis cerebrales que no se hallaron en la muestra del tejido tumoral primario. Los genes involucrados en el desarrollo de las metástasis cerebrales con más frecuencia fueron TP53, PIK3CA, GATA3 y otros genes mutados en menor frecuencia incluían AKT1, CDH1, MAP3K1, PTEN, CDH1, RB1 y CDKN1B. Concluyendo que la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR y CDK; estarían involucradas con el desarrollo de metástasis a nivel de SNC<sup>40</sup>.

El análisis de pacientes con CMTN portadoras de la mutación BRCA-1 y BRCA-2; es un camino por analizar, ya que estos tumores son sensibles a inhibidores PARP (Poly adenosine diphosphate ribose polymerase-1) como Olaparib el cual penetra la BHE<sup>15,44</sup>.

Otros autores han sugerido que los propios andrógenos, activando directamente astrocitos en el microambiente cerebral, pueden facilitar el asentamiento de células neoplásicas provenientes de tumores de mama TN. Esto explicaría por qué las pacientes TN más jóvenes, con mayores niveles de estrógenos, tienen mayor riesgo de metástasis cerebral (Sartorius CA et al. Oncogene 2015)<sup>41</sup>. Estos hallazgos podrían justificar la ausencia de diferencias en la expresión de genes entre los casos con presencia de metástasis cerebrales y los que no desarrollan; pues el desarrollo de dichas metástasis dependerán más del perfil hormonal de la paciente que de factores intrínsecos de la célula tumoral.

Otros investigadores también apuntan a elementos ajenos al propio tumor pues demuestran que el nivel de metilación no está alterado en las células tumorales mamarias TN en comparación con otros fenotipos de CM cuando metastatizan al cerebro (Salhia B, et al. Plos One 2014)<sup>42</sup>. Stirzaker C. y Col. (Nature Commun 2015;6:5899) señala que la caracterización de los patrones de metilación podrían ayudarnos a identificar biomarcadores predictivos en el futuro<sup>43</sup>.

En conclusión, nuestros hallazgos podrían poner de relieve que no sólo las diferencias en la expresión génica son importantes a la hora de predecir el riesgo de metástasis cerebrales sino que también podrían jugar un papel importante otros aspectos como el nivel de estrógenos.



Futuros estudios son necesarios para clarificar el rol de estos genes en tumores primarios de mama en pacientes con CMTN que desarrollan metástasis cerebral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Smigal C, Jemal A, Ward E, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:168-83.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Incidencia y mortalidad para todas las edades. Prevalencia a 5 años sólo en población adulta. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.
3. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1; 132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012 Jul 26.
4. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
5. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295:2492-502.
6. Niwinska A, Murawska M, Pogoda K. Breast cancer brain metastases: differences in survival depending on biological subtype, RPA RTOG prognostic class and systemic treatment after whole-brain radiotherapy (WBRT). *Ann Oncol* 2010;21:942-8.
7. Bos PD, Zhang XH, Nadal C, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 2009;459:1005-9.
8. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-72.
9. Castaneda CA, Agullo-Ortuno MT, Fresno Vara JA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos E. Implication of miRNA in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;11:1265-75.
10. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436:518-24.
11. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-7.
12. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-67.
13. Lachapelle J, Foulkes WD. Triple-negative and basal-like breast cancer: implications for oncologists. *Curr Oncol* 2011;18:161-4.
14. Reddy KB. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol* 2011;18:e173-9.

15. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2011;364:205-14.
16. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:751-9.
17. National Cancer Institute. (Accessed at
18. Lin NU, Bellon JR, Winer EP. CNS metastases in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3608-17.
19. Nam BH, Kim SY, Han HS, et al. Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases. *Breast Cancer Res* 2008;10:R20.
20. Deeken JF, Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res* 2007;13:1663-74.
21. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* 2010;16:6100-10.
22. Vallejos CS, Gomez HL, Cruz WR, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer* 2010;10:294-300.
23. Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, et al. Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:439-48.
24. Gapstur SM, Dupuis J, Gann P, Collila S, Winchester DP. Hormone receptor status of breast tumors in black, Hispanic, and non-Hispanic white women. An analysis of 13,239 cases. *Cancer* 1996;77:1465-71.
25. Li CI, Malone KE, Daling JR. Differences in breast cancer stage, treatment, and survival by race and ethnicity. *Arch Intern Med* 2003;163:49-56.
26. Hausauer AK, Keegan TH, Chang ET, Clarke CA. Recent breast cancer trends among Asian/Pacific Islander, Hispanic, and African-American women in the US: changes by tumor subtype. *Breast Cancer Res* 2007;9:R90.
27. Parise CA, Bauer KR, Caggiano V. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;76:44-52.
28. Shavers VL, Harlan LC, Stevens JL. Racial/ethnic variation in clinical presentation, treatment, and survival among breast cancer patients under age 35. *Cancer* 2003;97:134-47.
29. Gonzalez Burchard E, Borrell LN, Choudhry S, et al. Latino populations: a unique opportunity for the study of race, genetics, and social environment in epidemiological research. *Am J Public Health* 2005;95:2161-8.
30. Millikan RC, Newman B, Tse CK, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:123-39.
31. Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, et al. Breast cancer in a multiethnic cohort in Hawaii and Los Angeles: risk factor-adjusted incidence in Japanese equals and in Hawaiians exceeds that in whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:795-800.

32. Probst-Hensch NM, Pike MC, McKean-Cowdin R, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. Ethnic differences in post-menopausal plasma oestrogen levels: high oestrone levels in Japanese-American women despite low weight. *Br J Cancer* 2000;82:1867-70.
33. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone* 2002;30:771-7.
34. Hsieh MM, Everhart JE, Byrd-Holt DD, Tisdale JF, Rodgers GP. Prevalence of neutropenia in the U.S. population: age, sex, smoking status, and ethnic differences. *Ann Intern Med* 2007;146:486-92.
35. Castaneda CA GH, Vallejos C, Cortes-Funes, Castellano D, Ciruelos E. Comparison between Spanish and Peruvian Patients with Early Breast Cancer. In: San Antonio Breast Cancer Meeting; 2011.
36. Heitz F, Harter P, Lueck HJ, Fissler-Eckhoff A, et al. Triple-negative and HER2-Overexpressing breast cancer exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer* 2009;45:2792-98.
37. William D. Foulkes, M.B.,B.S.,Ph.D, Ian E. Smith, et al. Triple-Negative Breast Cancer. *N. England* 2010;363:1938-48.
38. Don X. Nguyen, Paula D. Bos & Joan Massagué. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer* 9, April 2009; 274-284.
39. A Bollig-Fischer, SK Michelhaugh, R Ali-Fehmi, S Mittal. The molecular genomics of metastatic brain tumours. *OA Molecular Oncology* 2013 Apr 01; 1(1):6.
40. Priscilla K. Brastianos, Scott L. Carter, Sandro Santagata, Daniel P. Cahill, et al. Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discov.* 2015 Sep 26;5(11);1-14.
41. Sartorius CA, Hanna CT, Grill B, Cruz H, et al. Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism. *Oncogene.* 2015 Sep 28.doi:10.1038/onc.2015.353.
42. Salhia B, Kiefer J, Ross JT, et al. Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis. *PLoS One* 2014;9:e85448.
43. Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nature Communications* 2015;6:5899.
44. Chalmers AJ. Overcoming resistance of Glioblastoma to conventional cytotoxic therapies by the addition of PARP inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10:520-33.

