



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**TESIS DOCTORAL**

**FACTORES DE PRONÓSTICO EN**  
**CÁNCER DE MAMA**  
**DESPUÉS DE HORMONOTERAPIA**  
**NEOADYUVANTE**

**Autor: Juan Miguel Gil Gil**

**Director: Dr. Agustí Barnadas i Molins**

**Tutor Académico: Prof. Montserrat Estorch i Cabrera**

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina  
Programa de Doctorado en Medicina

Año de depósito: 2019





*Dr. Agustí Barnadas Molins Doctor en Medicina, Oncólogo Médico, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona*

**CERTIFICA QUE:**

*Juan Miguel Gil Gil, ha realizado bajo su dirección, la presente tesis doctoral que lleva por título: “**Factores de pronóstico en cáncer de mama después de hormonoterapia neoadyuvante**” y que es apta para su presentación y defensa delante de un tribunal para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.*

*Que este Trabajo ha sido llevado a cabo en el Servicio de Oncología Médica del Instituto Catalán de Oncología (ICO) de Hospitalet; en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge, en el Departamento de Investigaciones Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) y en el Departamento de Genómica Traslacional y Terapias Dirigidas y Tumores Sólidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS) del Hospital Clínic de Barcelona*

Y para que conste y en cumplimiento con la legislación vigente, firma el presente certificado en Barcelona, a dieciséis de Julio de 2019

**D. Agustí Barnadas i Molins,**



**Dedicado a**

A María, Víctor y Andrea, mi mujer e hijos, por todas las horas que les he  
robado.

A mis hermanos Roser y José Luis por su apoyo.

A la memoria de mis padres, a quienes les debo todo.



## **Agradecimientos:**

Agustí Barnadas Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital de Sant Pau de Barcelona, Profesor del Departamento de Medicina de la UAB y Vicepresidente del Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) por su dirección y apoyo.

A Gabriela Rivas, Robert Montal e Idoia Morilla, oncólogos médicos que dedicaron muchas horas en la recogida de datos.

A Anna Petit y Teresa Soler, doctoras del Servicio de Anatomía Patológica de Bellvitge por todas las horas dedicadas en la selección y valoración de las muestras.

A Xavi Pérez, estadístico del ICO por su paciencia e imprescindible soporte en todo el análisis estadístico.

A Miquel Ángel Pujana, doctor en biología y Jefe de Grupo del IDIBELL, por su consejo y a su equipo por las tinciones realizadas.

A Aleix Prat, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, Profesor asociado del Departamento de Medicina de la UB y Director del Grupo de Investigación SOLTI por su inestimable colaboración en todo el análisis de PAM50 y secuenciación genética por nCounter®

A todos los miembros de la Unidad Funcional de Mama del ICO-Bellvitge, cuyo buen trabajo en equipo y atención multidisciplinar ha sido imprescindible para obtener estos resultados.

A los compañeros del Área de Cáncer de Mama del Servicio de Oncología Médica del ICO-Hospitalet, por su apoyo, comprensión y paciencia en momentos de crisis.

Al resto de compañeros del Servicio de Oncología Médica.

A todo ellos porque dedicaron tiempo y esfuerzo de forma desinteresada y porque, sin su inestimable colaboración, no habría sido posible llevar a cabo este trabajo.

A todas las pacientes y sus familiares, que a lo largo de tantos años, confiaron en mí y en el buen hacer de todo mi equipo.

## Listado de Abreviaturas

ANA: Anastrozol  
ASCO: American Society of Clinical Oncology  
BAG: Biopsia con Aguja Gruesa  
CCM: Cirugía conservadora de la mama  
CD1: Ciclina D1  
CD4: Cúmulo de Diferenciación 4  
CDK: Quinasas dependientes de ciclina  
EBCTCG: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group  
ERE: Elementos sensibles al estrógeno  
ESR1: Gen del Receptor de Estrógeno  
EGFR: Factor del crecimiento epidérmico  
EXE: Exemestano  
FDG: Fluorodesoxiglucosa  
FGFR: Factor de crecimiento de los fibroblastos  
FUL: Fulvestrant  
GH: Grado Histológico  
HDAC: Deacetilasa de las Histonas  
HER2: Factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 o c-erbB-2  
H&E: Hematoxilina & Eosina  
HR: Hazard Ratio o índice del riesgo  
HTN: Hormonoterapia neoadyuvante  
HUB: Hospital Universitari de Bellvitge  
IA: Inhibidores de la aromatasa  
IC: Intervalo de Confianza  
ICO: Institut Català d'Oncologia  
IGFR: Receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1  
IHQ: Inmuno-histoquímica  
ILRD: Intervalo Libre de Recaída a Distancia  
ILR: Intervalo Libre de Recaída  
ILV: Invasión Linfo-Vascular  
LBD: Dominio de unión al ligando  
LET: Letrozol  
LH-RH: Hormona liberadora de hormona luteinizante  
mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
pRB: Proteína del Retinoblastoma

pCR: Respuesta Patológica Completa  
PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina  
PAM50: Prediction Analysis of Microarray 50  
PD1: Proteína 1 de la respuesta celular programada  
PDL-1: Lignado1 de la muerte celular programada  
PEPI: Índice pronostico a la endocrinoterapia preoperatoria  
PET: Tomografía por emisión de positrones  
PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa  
pS6: Proteína ribosomal S6 quinasa  
pTNM: Estadificación patológica  
QT: Quimioterapia  
RA: Receptores de Andrógeno.  
RB: Retinoblastoma  
RCB: Residual Cancer Burden  
RE: Receptor de estrógeno  
RMN: Resonancia magnética nuclear  
ROR: Puntuación de Riego de Recurrencia de PAM50  
RP: Receptor de progesterona  
RTP: Radioterapia  
SECM: supervivencia específica por cáncer de mama  
SERM: Modulador Selectivo de los Receptores de Estrógeno  
SLE: supervivencia libre de enfermedad  
SLR: Supervivencia Libre de Recaída  
SG: supervivencia global  
SRCM: Supervivencia Relativa por Cáncer de Mama  
TAM: Tamoxifeno  
TCGA: The Cancer Genoma Atlas  
TMA: Tissue microarray  
TOR: Toremifeno  
TR: Tasa de respuesta  
pTNM: Estadificación patológica tras la cirugía primaria  
ypTNM: Estadificación patológica tras tratamiento neoadyuvante y cirugía posterior  
WT: Wild type

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE MAMA.....	17
1.2. SUBTIPOS HISTOLÓGICOS Y CLASIFICACIÓN MOLECULAR ...	20
1.3. CARCINOMA LUMINAL Y HORMONODEPENDENCIA.....	24
1.4. FACTORES DE PRONÓSTICO Y FACTORES DE PREDICCIÓN EN C. DE MAMA.....	27
1.5. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.....	30
1.5.1. Generalidades.....	30
1.5.2. Quimioterapia Neoadyuvante en tumores RE (+) y HER2 (-).	35
1.5.3. Hormonoterapia Neoadyuvante (HTN).....	37
1.5.3.1. Estudios con SERM.....	37
1.5.3.2. Estudios con Inhibidores de Aromatasa.....	40
1.5.3.3. Duración de la HTN.....	43
1.5.3.4. Estudios de HTN frente a Quimioterapia.....	46
1.5.3.5. Factores predictivos de la HTN.....	48
1.6. MECANISMOS DE HORMONORESISTENCIA ADQUIRIDA.....	56
1.6.1. Por Receptor de Estrógeno.....	56
1.6.2. Por pérdida de Receptor de Progesterona.....	60
1.6.3. Por Ciclinas y ciclo celular.....	61
1.6.4. Por la vía PI3K-mTOR.....	65
1.6.5. Por cruces en diferentes vías de señal intracelular.....	67
1.6.6. Por componentes del microambiente tumoral.....	68
1.7. PRONÓSTICO DESPUÉS DE HTN.....	70
1.7.1. Respuesta patológica.....	70
1.7.2. Respuesta Clínica.....	70
1.7.3. Grado histológico en el tumor residual tras HTN.....	71
1.7.4. Disminución del Ki-67.....	72
1.7.5. Preoperative endocrine prognostic index (PEPI).....	72
1.7.6. Plataformas Génicas.....	74
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	
2.1. HIPÓTESIS.....	79
2.2. OBJETIVOS.....	80
<b>3. POBLACIÓN Y MÉTODOS</b>	
3.1. Selección de pacientes y procedimientos empleados.....	83

3.2. Muestras biológicas y determinaciones realizadas.....	87
3.3. Análisis estadístico.....	93
3.4. Aspectos éticos.....	96
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Características clínico-patológicas de las pacientes.....	99
4.2. Tipo y duración de HTN.....	106
4.3. Respuesta clínica al tratamiento primario.....	107
4.4. Tipo de cirugía.....	108
4.5. Valoración patológica tras HTN y cirugía.....	109
4.6. Tratamiento postquirúrgico (adyuvante).....	114
4.7. Análisis de supervivencia.....	115
4.8. Análisis univariante de factores de pronóstico clínico y biológico determinados por inmunohistoquímica.....	119
4.9. Resultados de plataforma de genes .....	133
4.10. Análisis multivariable de factores de pronóstico.....	141
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>171</b>
<b>7. LINEAS DE FUTURO.....</b>	<b>175</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>179</b>
<b>9. ANEXOS</b>	
9.1. Autorización del CEIC para llevar a cabo el estudio .....	195
9.2. Abstract comunicación en SABCS 2017.....	197
9.3. Abstract comunicación en ASCO 2019.....	199

## Resumen

### FACTORES DE PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA DESPUÉS DE HORMONOTERAPIA NEOADYUVANTE

**Introducción:** La hormonoterapia neoadyuvante (HTN) gana cada día más aceptación en el tratamiento del cáncer de mama (CM) con receptores hormonales (RH) positivos. Después de HTN, el descenso de Ki-67 y PEPI score son los únicos factores asociados con la supervivencia. Hay descritas múltiples vías de desarrollar hormono-resistencia en cáncer de mama. Muchas de ellas, pueden ser estudiadas mediante técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ) o por secuenciación de genes (SG). PAM50 es un test pronóstico validado en CM sin tratamiento sistémico previo, pero su valor en el tumor residual tras HTN es desconocido.

**Objetivo:** Descubrir nuevos biomarcadores en muestras del tumor resecado tras HTN, que puedan ser útiles en la decisión del tratamiento sistémico adyuvante.

**Población y método:** Estudio retrospectivo sobre 119 muestras parafinadas de la pieza quirúrgica de pacientes postmenopáusicas con CM RH positivos en estadios II a III y tratadas con HTN en el ICO-HUB entre 1997-2009. Duración media de la HTN: 8.5 meses. Edad mediana: 74 años (63-88). Todas las pacientes fueron operadas (el 73% con cirugía conservadora). Tratamiento adyuvante: Hormonoterapia 96%, Radioterapia 76,5%, Quimioterapia 7%. Seguimiento medio de 112 meses. Observamos 26 casos con recaída metastásica y 75 muertes (44 sin cáncer). La supervivencia mediana desde el momento de la cirugía fue de 127 meses.

Construimos un Tissue Microarray para efectuar tinciones por IHQ de: Receptores de Estrógeno (RE), Progesterona (RP), Andrógeno (RA), HER2, Ki-67, p53, BCL-2, CD1, pRB, p16, SOX9, VAV3, sinaptofisina, CD 44 y pS6.

Se extrajo ARN de tejido tumoral para análisis de SG de un panel de 55 genes relacionados con el cáncer de mama, incluidos PAM50 (subtipos, ROR-S y ROR-P), RA y genes relacionados con inmunidad (CD8A, CD4, PDL1 y PD1).

También estudiamos otros factores: PEPI score, Grado Histológico (GH), TNM, ypTNM, invasión linfo-vascular y respuesta clínica.

Efectuamos análisis univariante mediante la prueba de log-rank y se utilizó el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para evaluar la relevancia del pronóstico independiente de cada factor en términos de intervalo libre de recaída a distancia (ILRD).

**Resultados:** La evaluación de RE, RP y Ki67 antes y después de la HTN mostró una disminución estadísticamente significativa de RP y Ki67 después de HTN. El análisis univariante mostró peor ILRD estadísticamente significativo en: ypN1-2, estadio III, cN1-2; GH 3, p16 (-) en núcleo, BCL-2 < 50%, p53 mutada, pS6 (-) en célula tumoral y del estroma. El análisis multivariable de biomarcadores por IHQ mostró que p16 (-), p53 mutada, BCL2<50% y pS6 (-) en célula tumoral se asociaron de manera independiente con peor ILRD.

Distribución del subtipo PAM50: Luminal A 54%, Normal-like 24%; HER2 enriquecido 16,5%, Luminal B 1% y Basal 1%. Distribución de los grupos ROR-S: bajo 64%, medio 30%, alto 6%. La puntuación PEPI fue: <3 en 43%, 3 en 37% y 6 en 20%. Entre las diferentes variables exploradas por SG, PEPI  $\geq$  3, ROR-S intermedio y expresión de RA <-2 se asociaron significativamente con peor ILRD en análisis univariante. En el análisis multivariable que agrupaba tanto a variables de IHC como de SG, p53, pS6, ROR-S y expresión de AR mantuvieron la significación estadística.

**Conclusión:** p53, p16, pS6, ROR-S y RA evaluado por SG aportan información pronóstica independiente a PEPI score. Estos factores pueden ayudar en la decisión del tratamiento adyuvante.

## Summary

### PROGNOSIS FACTORS IN BREAST CANCER AFTER NEOADJUNT ENDOCRIN THERAPY

**Background:** Neoadjuvant endocrine therapy (NET) is gaining more acceptances for the management of hormonal receptors (HR)-positive breast cancer (BC). Ki-67 decrease and PEPI score are the only prognostic factors associated with relapse after NET. Multiple pathways of developing hormone resistance in BC have been described. Some of them can be studied immunohistochemically (IHC) or by gene sequencing (GS). PAM50 is a validated prognostic test in newly diagnosed BC; however, its value in residual tumours after NET is currently unknown.

**Aim:** To discover new biomarkers in the surgery specimen after NET that could be useful in the decision-making of systemic adjuvant treatment.

**Methods:** Retrospective study over 119 tumour samples from postmenopausal patients diagnosed of HR-positive stage II-III BC. Patients were treated with NET in ICO-HUB between 1997-2009 for a median duration of 8.5 months. Median age was 74 (63-88). After NET all patients underwent surgery (73% conservative). Adjuvant treatment: Endocrine therapy 96%, Radiotherapy 76,5%, Chemotherapy 7%. Median follow-up since surgery was 112 months. We observed 26 distant relapses and 75 deaths (44 without cancer). Overall survival was 127 months.

We constructed a Tissue microarray for evaluation by IHQ of: Estrogen Receptors (ER), Progesterone Receptor (PR), Androgen Receptor (AR), HER2, Ki-67, p53, CD1, pRB, p16, SOX9, BCL-2, VAV3, synaptophysin, CD 44 and pS6.

RNA was extracted from tumor tissues to perform a GS analysis of a panel of 55 Breast Cancer-related genes, including PAM50 (subtypes, ROR-S and ROR-P pre-defined cut-points), AR and immune genes (CD8A, CD4, PDL1 and PD1)

We also studied: PEPI score, cTNM, ypTNM, histological grade (HG), limpho-vascular invasion and clinical response to NET.

Univariate and multivariate analysis by log-rank test and Cox proportional hazard regression model were used to evaluate the independent prognostic relevance of each factor in terms of distant relapse free interval (DRFI).

**Results:** Assessment of ER, PR and Ki67 pre and post NET showed a statistically significant decrease of PR and Ki67 after NET. Univariate analysis for DRFI showed statistically significant differences in: ypN1-2, stage III, cN; HG 3, p16 negative in nucleus, BCL-2<50%, mutated p53 and pS6. Multivariate analysis of IHC biomarkers showed that p16 negative, p53 mutated and BCL2<50%, were factors independently associated with worse DRFI.

PAM50 subtype distribution was: Luminal A 54%, Normal-like 24%; HER2-enriched 16.5%, Luminal B 1% and Basal 1%. Distribution of ROR-S groups was: Low 64%, medium 30%, high 6%. Distribution of PEPI score was <3 in 43%, 3 in 37% and 6 in 20%. Among the different variables explored by GS, PEPI score  $\geq 3$ , intermedium ROR-S and AR expression  $<-2$  were significantly associated with lower DRFI in univariate analyses.

A multivariable analysis of both, IHC and GS variables, showed statistical significance in p53, pS6, ROR-S and AR expression.

Conclusion: p53, p16, pS6, ROR-S and RA evaluated by SG provide independent prognostic information to PEPI score. These factors can help in the decision of adjuvant treatment.

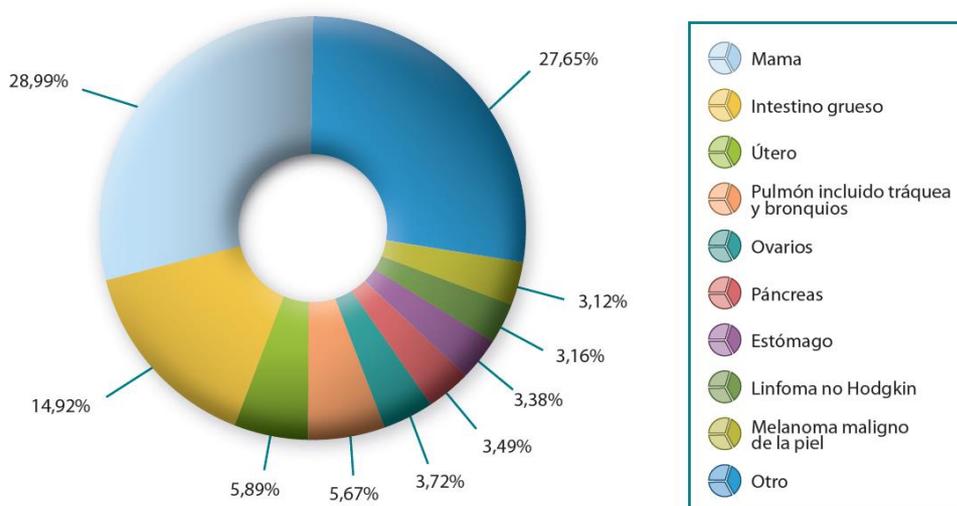
# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 DEFINICION Y EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE MAMA

El cáncer de mama consiste en una proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio de la glándula mamaria que, en una primera fase, van cubriendo la luz de los ductos o de los lobulillos terminales y después, van adquiriendo la capacidad de atravesar la membrana basal, invadir el parénquima circundante y finalmente, crecer a distancia en otras partes del organismo (1).

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente de la mujer. En el año 2015 se registraron 27.747 nuevos casos de cáncer de mama en España, lo que representa el 29% de todos los cánceres de la mujer (2). (Figura 1). La Sociedad Española de Oncología Médica, calcula que durante año 2019 se diagnosticarán 32536 nuevos casos de cáncer de mama.



Los datos de incidencia fueron proporcionados por IARC a través del proyecto EUCAN.

*Figura 1: Incidencia del cáncer en mujeres en España en el año 2015*

Supone una incidencia estandarizada de cáncer de mama en España de 84 casos por cada 100.000 mujeres año. En los últimos 30 años, la incidencia del cáncer de mama ha aumentado de forma casi constante un 2-3% anual. Esto es debido, por un lado, al crecimiento y envejecimiento de la población y por otro a los cambios en los hábitos de vida y en los patrones reproductivos.

La edad mediana de las mujeres a las que se les diagnóstica un cáncer de mama está entre los 60 y los 65 años, pero el riesgo de desarrollar un cáncer de mama aumenta de forma correlativa con la edad, de forma que, actualmente más de una tercera parte de todos los casos de cáncer de mama son diagnosticados en mujeres mayores de 70 años y, como consecuencia del aumento en la esperanza de vida de la población, se espera un aumento del 30% en la incidencia para el año 2030 (3).

Mientras que en nuestro país la incidencia ha ido aumentando lentamente desde finales de los años 90, la mortalidad presenta un descenso mantenido del 2% anual (4). Esto en parte es debido al diagnóstico precoz, pero sobre todo es debido a los avances en los diferentes tratamientos y en su administración sistematizada.

Según los datos de EUROCare-5, la supervivencia relativa del cáncer de mama (SRCM) a los cinco años es del 89.2% (5). El estadio evolutivo en el que se diagnostica el cáncer influye en la supervivencia, así la supervivencia a los 10 años en el estadio I está por encima del 98% y en cambio, en los estadios III la supervivencia desciende hasta el 24%.

A pesar del alto porcentaje de curaciones, dada su enorme incidencia, el cáncer de mama todavía es la principal causa de muerte por cáncer en la mujer española. (figura 2). En el año 2014 se registraron en España 6213 fallecimientos por cáncer de mama (2).

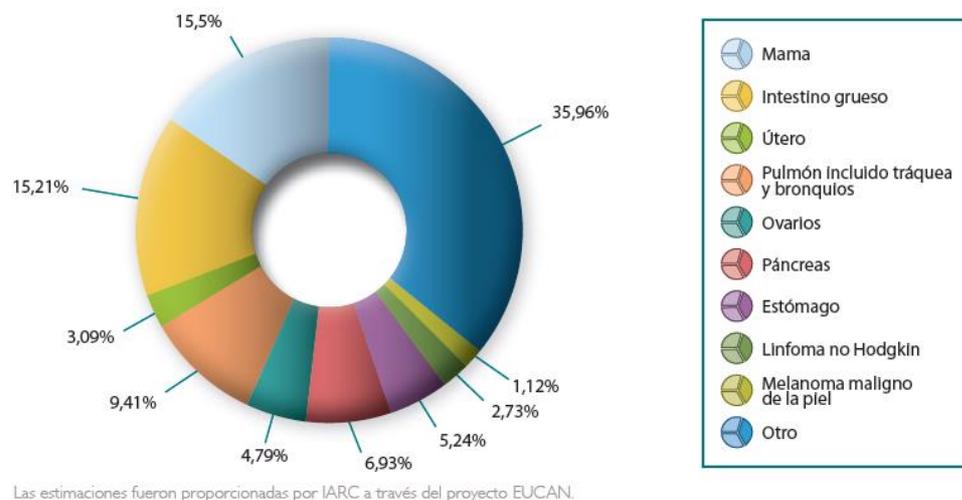


Figura 2: Mortalidad estimada por tipo de cáncer en mujeres en el año 2015

Dado que muchos casos de cáncer de mama son curables y la mayoría de los que no lo son, presentan una larga supervivencia, nos encontramos con una enorme prevalencia, de más de 1000 casos por cada 100000 mujeres (figura 2). Es por tanto un problema sanitario de enorme magnitud.

Cancer	Incidencia			Mortalidad			5-year prevalencia		
	Total	(%)	ASR	Total	(%)	ASR	Total	(%)	Prop.
Labios, cavidad oral	1.219	1,4	2,3	351	0,9	0,6	3.361	1,3	16,6
Nasofaringe	97	0,1	0,2	50	0,1	0,1	229	0,1	1,1
Faringe, otras localizaciones	157	0,2	0,4	93	0,2	0,2	384	0,2	1,9
Esófago	334	0,4	0,7	271	0,7	0,5	339	0,1	1,7
Estómago	2.944	3,4	5,1	2.054	5,2	3,1	4.698	1,8	23,3
Colorrecto	12.979	14,9	24,2	5.958	15,2	8,5	36.014	14,1	178,4
Hígado	1.516	1,7	2,4	1.487	3,8	2,0	1.441	0,6	7,1
Vesícula biliar	1.055	1,2	1,6	691	1,8	0,9	993	0,4	4,9
Páncreas	3.032	3,5	5,0	2.717	6,9	4,3	1.588	0,6	7,9
Laringe	268	0,3	0,7	86	0,2	0,2	954	0,4	4,7
Pulmón	4.935	5,7	11,3	3.688	9,4	8,0	5.380	2,1	26,6
Melanoma	2.718	3,1	7,2	440	1,1	0,9	10.584	4,1	52,4
Sarcoma de Kaposi	73	0,1	0,2	8	0,0	0,0	203	0,1	1,0
Mama	25.215	29,0	67,3	6.075	15,5	11,9	104.210	40,8	516,2
Cérvix	2.511	2,9	7,8	848	2,2	2,1	8867	3,5	43,9
Útero	5.121	5,9	11,6	1.211	3,1	1,9	19.272	7,6	95,5
Ovario	3.236	3,7	7,7	1.878	4,8	3,7	7.925	3,1	39,3
Riñón	2.128	2,4	4,8	764	1,9	1,2	6.023	2,4	29,8
Vejiga	2.205	2,5	3,7	905	2,3	1,1	7.401	2,9	36,7
Sistema nervioso	1.661	1,9	4,2	1.199	3,1	2,6	1.289	0,5	6,4
Tiroides	1.361	1,6	4,1	186	0,5	0,3	5.306	2,1	26,3
Linfoma de Hodgkin	534	0,6	2,2	95	0,2	0,2	1.525	0,6	7,6
Linfoma no Hodgkin	2.751	3,2	5,9	1.071	2,7	1,7	7.136	2,8	35,3
Mieloma múltiple	1.109	1,3	1,8	826	2,1	1,1	2.599	1,0	12,9
Leucemia	2.162	2,5	5,0	1.378	3,5	2,3	4.503	1,8	22,3
Todos los tumores (excl. tumores cutáneos no melanoma)	86.984	100,0	198,2	39.183	100,0	67,0	255.195	100,0	1264,2

GLOBALCAN 2012 (IARC)

Datos de incidencia y mortalidad para todas las edades.

Prevalencia 5 años solo para población adulta, ASR (age-standardized rate = tasa relativa ajustada por edad) y proporciones por 100.000.

*Tabla 1: Incidencia, Mortalidad y Prevalencia por diferentes tumores*

## **1.2 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS Y CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE CÁNCER DE MAMA.**

El cáncer de mama representa un grupo de tumores heterogéneo que muestran un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica. El subtipo histológico de carcinoma de mama más frecuente es el ductal, que se origina en las células del epitelio de los ductos galactóforos y representa el 75-80% de los casos. El carcinoma lobulillar representa el 10-15% y se origina de los acinos glandulares. Ambos pueden dividirse en infiltrantes y no infiltrantes o “in situ”, según si la membrana basal está invadida o indemne, respectivamente. El resto de variedades histológicas (apocrino, cribiforme, medular, metaplásico, micropapilar, mucinoso, neuroendocrino, papilar, tubular, etc.) representan menos del 10% del total de carcinomas de mama (6). Pero la clasificación histológica de los carcinomas de mama no refleja bien esta heterogeneidad entre tumores, su diferente comportamiento biológico, ni permite identificar a las pacientes que presentarán mejor respuesta y beneficio con las diferentes opciones terapéuticas actuales.

En los últimos años, técnicas que permiten el estudio masivo de genes, han hecho posible, por un lado, comprender el comportamiento biológico del cáncer de mama y por otro lado, individualizar el pronóstico y el tratamiento de algunas pacientes. Perou y sus colaboradores, desarrollaron en los primeros años de este siglo, una clasificación molecular basada en la diferente expresión de distintos genes relacionados con diferentes vías de señalización y proliferación, que refleja mejor la variabilidad biológica y el pronóstico del cáncer de mama (7)(8). Esta clasificación divide los carcinomas de mama en cinco subtipos a los que denomina: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal y normal (figura 3).

Los carcinomas de mama de tipo luminal, así denominados por asemejarse a las células de la luz del conducto galactóforo, son los subtipos con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del receptor de estrógeno

(RE), genes asociados, como LIV1 y ciclina D1 (CD1) y queratinas de bajo peso molecular CK7, CK8 y CK18 (figura 4). Estos tumores, al expresar RE pueden responder a diferentes manipulaciones hormonales.

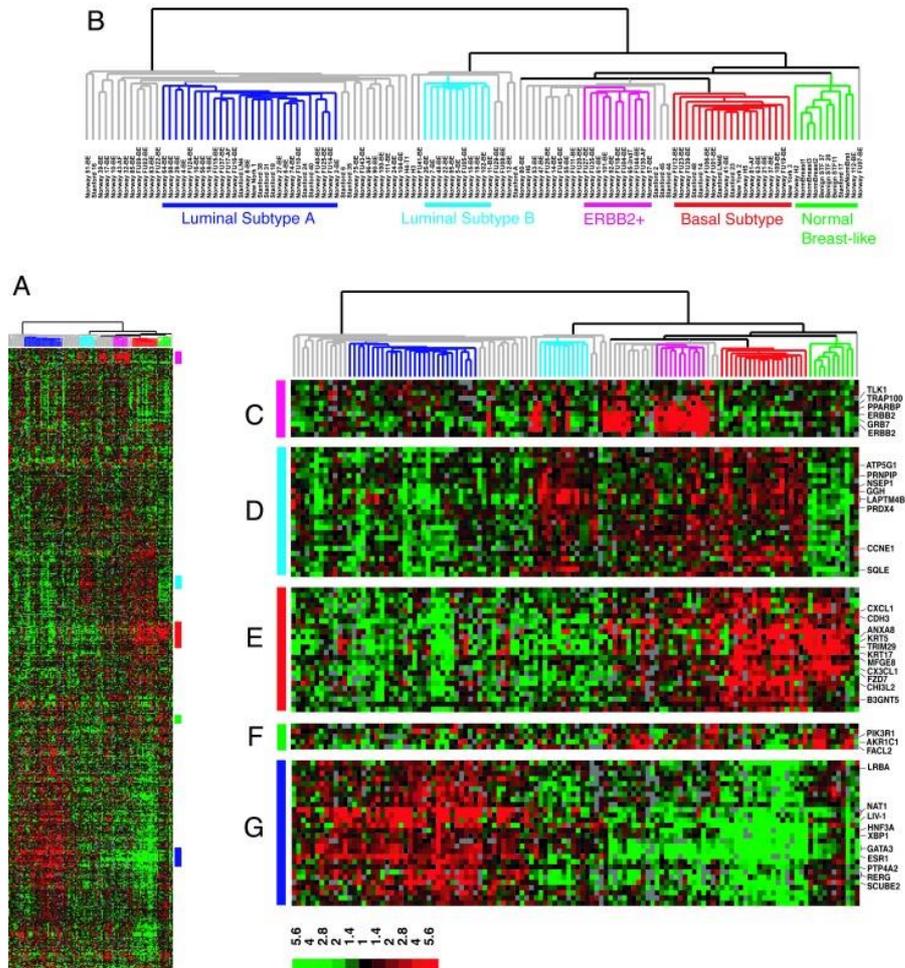
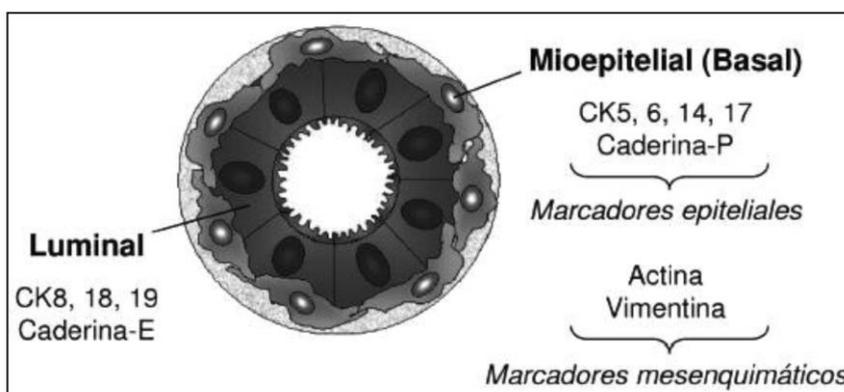


Figura 3: Clasificación por subtipos intrínsecos. Tomada de Sørlie, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 [8]

El carcinoma de mama HER2-enriquecido muestra una expresión aumentada o amplificación de genes asociados al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 o c-erbB-2 (HER2) y suele asociarse a otros marcadores de mal pronóstico, incluyendo alteraciones de otros genes como topoisomerasa II alfa, GATA4, genes de angiogénesis y genes de proteólisis.

Estos tumores suelen responder a la quimioterapia (QT) y al tratamiento con anticuerpos dirigidos contra el receptor de HER2.



*Figura 4: Subtipos moleculares y glándula mamaria. Tomado de Clasificación molecular del cáncer de mama. F. Imigo et al. Cuad. Cir. 2011; 25: 67-74*

El subtipo basal, así denominado porque sus células se asemejan a las que se encuentran cerca de la membrana basal del conducto galactóforo (Figura 4), se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas CK5/6, CK17 y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Estos tumores suelen presentar mutaciones en el gen onco-supresor p53, sobre-expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se caracterizan por la ausencia de expresión de RE y de HER2. A menudo, este subtipo se asocia a la mutación BRCA1 y, a pesar de su alta sensibilidad a la QT, presenta el comportamiento más agresivo.

El carcinoma de mama de tipo normal comparte características con el tejido mamario normal, muestra una fuerte expresión de genes expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales (9).

Aunque, actualmente se considera que el análisis de los perfiles de expresión génica constituye la mejor forma de clasificar los carcinomas de mama, en la mayoría de los hospitales su uso se encuentra limitado por su

elevado coste. En la práctica habitual, la mayor parte de los diagnósticos de rutina se realiza mediante tinción de Hematoxilina/Eosina (H&E) y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Diversos estudios sugieren que, con un limitado número de marcadores por IHQ, como RE, receptores de progesterona (RP), HER2 y el factor de proliferación celular Ki-67 (10)(11)(12)(13), es posible catalogar la mayor parte de carcinomas de mama en subtipos equivalentes a aquéllos basados en perfiles de expresión génica. En este caso los denominamos como subtipos luminal A o B *like*, basal *like* o Her2 enriquecido *like*. La ventaja del estudio IHQ es que utiliza marcadores que se encuentran disponibles en la mayoría de los servicios convencionales de Anatomía Patológica y a un precio diez veces inferior al de las plataformas de genes. El panel de expertos de Sant Gallen adoptó esta clasificación en 2011, con modificaciones en 2013, definiendo como luminal A “like” los tumores con RE positivo,  $RP \geq 20\%$ , HER2 negativo y  $Ki-67 < 20\%$  y como luminal B “like” los tumores con RE positivo y al menos, una de los siguientes: HER2 positivo,  $RP < 20\%$  o  $Ki-67 \geq 20\%$ ; HER2 no luminales si HER2 positivo junto a RE y RP ambos negativos o Triple negativo en los casos en que tanto HER2 como RE y RP son todos negativos. Pero las tasas de discordancia entre subtipos basados en la IHQ y basados en análisis genéticos alcanza en algunos estudios el 30% (10-13)

### **1.3 CARCINOMA LUMINAL Y HORMONODEPENDENCIA**

El luminal es el subtipo más frecuente, representa el 70% y si analizamos solo a las pacientes mayores de 70 años, este porcentaje aún es más alto (14). Se caracterizan por la expresión de RE y a menudo, son tumores de grado histológico (GH) bajo o intermedio, expresan citoqueratinas CK8 y CK18 y presentan mutación de p53 en < 20% de los casos (7)(8)(9).

Aunque se han considerado varios subtipos, lo más corriente es la división en Luminal A y Luminal B. El Luminal A es más frecuente, representa el 35-40% de todos los cánceres de mama. Posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y con su activación, como GATA3 y CD1; y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. A la inversa, el Luminal B presenta una expresión moderada de genes relacionados con los RE y aún menos con los de RP y una alta expresión de genes asociados con la activación del ciclo celular. Representa el 25-30% de todos los carcinomas de mama. Es necesario mencionar el subtipo Luminal HER2/neu, que se caracteriza, además de por presentar sobre-expresión de HER2, por expresar citoqueratinas CK9 y CK10. De hecho, el 50% de los tumores con sobre-expresión HER2 son tumores luminales por expresión génica (15). En general, los tumores RE positivo tienen menor respuesta a la QT comparado con los tumores RE negativo. Los tumores luminal A tienen aproximadamente un 6% de respuesta patológica completa (pCR) a la QT preoperatoria o neoadyuvante, en comparación con el aproximadamente 45% de pCR en los subtipos basal y HER2/neu (16)(17)(18)(19)(20)(21).

La proliferación de las células epiteliales de la glándula mamaria normal tiene una gran dependencia fisiológica de los estrógenos. El factor regulador

más importante es el estradiol a través de su interacción con el RE. Las células del cáncer de mama de tipo luminal también están reguladas por la interacción estradiol-RE. El objetivo del tratamiento hormonal, es el de impedir que las células del carcinoma de mama reciban este estímulo estrogénico. De esta forma, inhibiendo la vía de señalización intracelular generada por la activación de los RE del núcleo celular, se bloquea el crecimiento celular. Esto fue demostrado de forma empírica en 1896, mucho antes de que se conociesen los RE, cuando Beatson describió respuestas objetivas en pacientes premenopáusicas con cáncer de mama avanzado cuando eran sometidas a ooforectomía bilateral (22).

El tratamiento hormonal ha demostrado su utilidad en los tumores que presentan receptores hormonales positivos, tanto en cáncer de mama avanzado (22)(23)(24)(25)(26), como en cáncer de mama precoz (27).

En la clínica, la privación del estímulo estrogénico se puede obtener de dos formas:

- 1) Por fármacos que se unen de forma específica a los RE, bloqueándolos, como son los moduladores selectivos de los RE (SERM): tamoxifeno (TAM) y toremifeno (TOR); o destruyéndolo al unirse con él, como fulvestrant (FUL)

- 2) Por supresión de la síntesis de estrógeno, mediante la administración de inhibidores de la aromatasa (IA) en mujeres postmenopáusicas o por supresión ovárica (quirúrgica o con por medio de agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) en mujeres premenopáusicas.

Los meta-análisis del grupo Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) demostraron el beneficio del uso de TAM después de la cirugía, el denominado tratamiento adyuvante, en aquellas las pacientes con

cáncer de mama que expresan receptores hormonales positivos. Este beneficio era independiente de la edad, estado menopáusico, de la presencia o ausencia de metástasis ganglionares, del tamaño del tumor y de recibir o no, tratamiento con QT. El beneficio observado significó una prolongación de la supervivencia global (SG), de la de la supervivencia libre de recaída (SLR) y de la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Este efecto se mantiene por lo menos hasta los 15 años de seguimiento. El TAM redujo un 31% el riesgo de muerte anual por cáncer de mama (27), pero las pacientes sin expresión de receptores hormonales no obtuvieron ningún beneficio con TAM.

Posteriormente, los IA de tercera generación, anastrozol (ANA), letrozol (LET) y exemestano (EXE), han demostrado superioridad sobre TAM tanto en el cáncer de mama metastásico (24)(25)(26) como precoz (28)(29)(30)(31) en mujeres postmenopáusicas

El valor de la QT asociada al tratamiento hormonal adyuvante se evaluó en diversos estudios y en los meta-análisis del EBCTCG (27), demostrando mejoría en la SLR y en la SG. Por ese motivo se ha utilizado la QT además del tratamiento hormonal adyuvante, en mujeres con RE o RP positivos. Por otro lado, datos procedentes de estos estudios de tratamiento adyuvante con QT, sugieren que los cánceres con RE positivos obtienen un beneficio absoluto menor que los cánceres que no expresan receptores hormonales. Hoy en día, con estudios de plataformas génicas para la decisión del tratamiento adyuvante o neoadyuvante, ha quedado claro que muchas pacientes con tumores de tipo luminal no obtienen ningún beneficio de la QT y en cambio si presentan una importante toxicidad (32)(33)(34).

## **1.4 FACTORES DE PRONOSTICO Y DE PREDICCIÓN EN C. DE MAMA**

Un factor pronóstico es cualquier parámetro medible que se correlaciona con la evolución de la enfermedad (recaída o supervivencia), con independencia del tratamiento practicado. En contraste, un factor predictivo es cualquier parámetro medible que se asocia con la respuesta a un tratamiento. Hay factores que pueden ser pronóstico y predictivos a la vez.

Para indicar el programa terapéutico más adecuado a una paciente con cáncer de mama, es imprescindible valorar un conjunto de factores del pronóstico y de factores de predicción, con ello se hace una evaluación individual de cada paciente, que intenta conocer o pronosticar, qué evolución tendría dicha paciente en concreto, sin tratamiento y que evolución tendrá esa paciente con los diferentes tratamientos que le podamos ofrecer. Por tanto, el tratamiento del cáncer de mama debe individualizarse basándose en múltiples factores del pronóstico y de predicción.

Hay factores del pronóstico que dependen de la paciente, como son la edad, la comorbilidad, el estado menopáusico, la obesidad, los tratamientos que previamente haya podido recibir y los factores de tipo psicológico (tanto el estrés como la depresión pueden ser factores adversos).

Otros factores del pronóstico dependen del tumor, entre ellos se encuentran el tamaño tumoral, la presencia de ganglios linfáticos regionales, la presencia de metástasis a distancia (estos tres factores se agrupan en el sistema de clasificación TNM), el tiempo de evolución, la localización del tumor, el GH, el índice de proliferación celular, la invasión linfo-vascular (ILV), la extensión extracapsular del ganglio y por último expresión de RE, RP y HER2.

Estos factores pronóstico dependientes del tumor, se pueden analizar en el

momento del diagnóstico de la enfermedad, después de un primer tratamiento quirúrgico, mediante el TNM patológico (pTNM), o después de un primer tratamiento sistémico, que denominamos neoadyuvante, y posterior a la cirugía, es decir, después de dos tratamientos, y que se clasifica como ypTNM.

Cada subtipo molecular de cáncer de mama tiene un patrón de recaída diferente a lo largo del tiempo, según sea la expresión de los receptores hormonales, HER2 y de la tasa de proliferación celular medida por Ki-67 (35)(36) (figura 5). Así los tumores basales y HER-2 enriquecidos suelen recaer durante los primeros 5 años de seguimiento, en cambio, los tumores luminales presentan recaídas más tardías, incluso pueden recaer después de 10 o más años de seguimiento. Por este motivo, en tumores de tipo luminal, se consideran maduros los resultados de un ensayo clínico en enfermedad precoz, cuando tiene un seguimiento medio de 10 o más años.

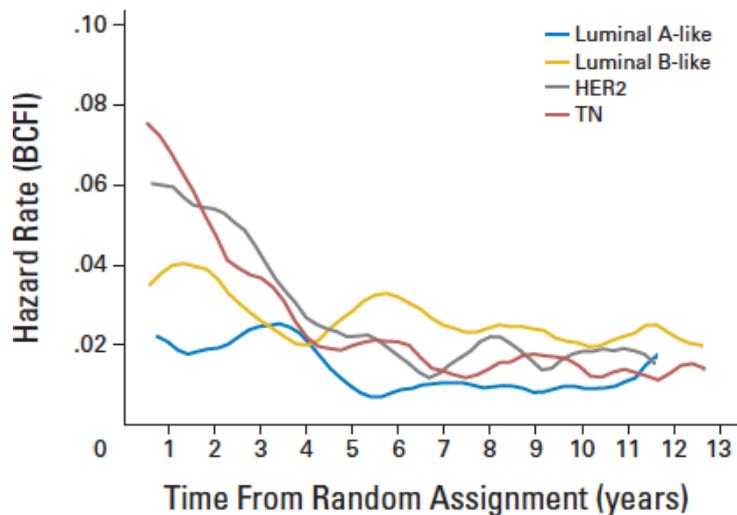


Figura 5: Probabilidad del Riesgo de Recaída por Cáncer de Mama a lo largo del tiempo. (Tomado de Metze-Filho et al [35])

Diversas plataformas de expresión génica, cuatro de ellas comercializadas actualmente en España, han demostrado que son capaces de evaluar el riesgo de recurrencia para pacientes con cáncer de mama, son MammaPrint® (33),

Oncotype DX® (34), Prosigna® (37) y Endopredict® (38). La plataforma denominada comercialmente Prosigna® contiene el test Prediction Analysis of Microarray 50 (PAM50). Es un test basado en la expresión de 50 genes, obtenidos mediante RT-qPCR de tejido parafinado, utilizando la tecnología nCounter® de NanoString®. PAM50 ha demostrado tener valor pronóstico tras la cirugía del cáncer de mama, estimando el riesgo individual de recurrencia a distancia a 10 años, mediante una puntuación de riesgo de recurrencia (ROR) en una escala de 0-100, habiéndose propuesto una división en tres categorías: bajo si  $< 40$ , intermedio 40-60 y alto si  $> 60$  (ver figura 6). También ha demostrado valor de predicción a la QT y además, es capaz de clasificar el tumor en los distintos subtipos intrínsecos de Perou de una forma fidedigna (37). A diferencia de Oncotype® y Mammaprint®, el análisis de PAM 50 no se efectúa en un laboratorio centralizado y se puede realizar en laboratorios locales homologados. Por estos motivos escogimos esta plataforma para el presente estudio.

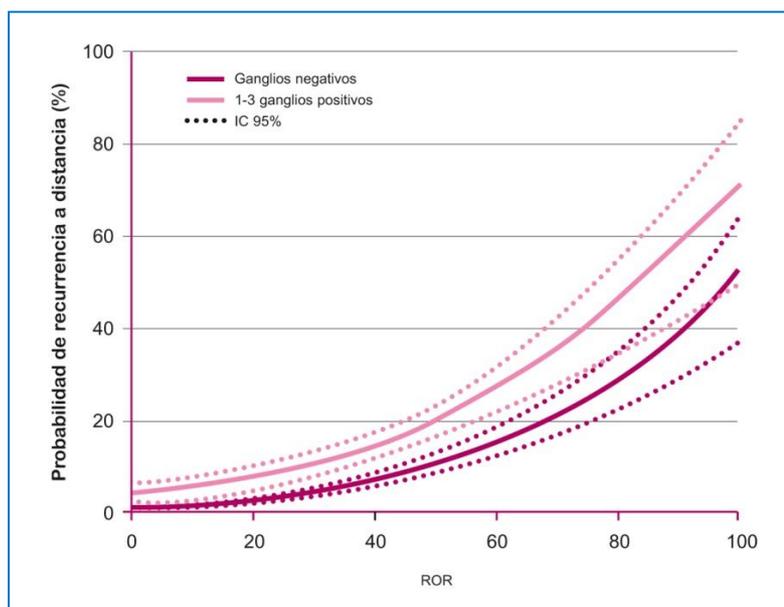


Figura 6: Riesgo de recurrencia a 10 años tras cirugía en función de PAM50 y del estado ganglionar. Tomada de Parker et al. [37]

## **1.5 TRATAMIENTO NEOADYUVANTE**

### **1.5.1 GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE**

El tratamiento actual del cáncer de mama de tipo luminal en estadios II y III se basa en la combinación de cirugía, hormonoterapia y, en muchos casos, QT y radioterapia (RTP). Por tanto el tratamiento óptimo requiere de la colaboración de un equipo multidisciplinar, que incluya como mínimo a patólogos, radiólogos, cirujanos, oncólogos médicos y oncólogos radioterápicos. Clásicamente, el tratamiento del cáncer de mama en estadios iniciales comenzaba con la cirugía y posteriormente se administraba el tratamiento sistémico y la RTP. Pero el orden de administración de estas modalidades terapéuticas es variable. En la actualidad, a menudo la primera maniobra terapéutica es un tratamiento sistémico pre-quirúrgico. Es lo que llamamos tratamiento primario o neoadyuvante. La denominación neoadyuvante está consolidada por su amplio uso, pero semánticamente es poco precisa. Tiene un origen histórico, porque como a la QT que se utilizó inicialmente tras la cirugía, se la denominó adyuvante, y el desarrollo de la QT prequirúrgica fue posterior en el tiempo, se la denominó neoadyuvante para diferenciarla. Al tratamiento neoadyuvante se le llama también tratamiento primario o prequirúrgico, denominaciones más precisas, aunque menos usadas. Además de la QT neoadyuvante, en la última década también ha adquirido gran relevancia el uso de hormonoterapia neoadyuvante (HTN)

El tratamiento sistémico neoadyuvante es el estándar para las pacientes con tumores localmente avanzados y es una opción a tener en cuenta en las pacientes con tumores en estadios técnicamente operables (39).

Los objetivos de los tratamientos quimioterápicos neoadyuvantes son:

En primer lugar, facilitar la cirugía. En tumores que por su tamaño o por sus características no son operables de entrada, se utiliza para disminuir el tamaño del tumor y hacer posible una cirugía completa. En pacientes con tumores operables, pero que obligan a una mastectomía en el momento del diagnóstico, los tratamientos neoadyuvantes pueden permitir una cirugía conservadora si se consigue una disminución del tamaño del tumor. Pero incluso en aquellos tumores con posibilidad de cirugía conservadora de entrada, reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía puede conseguir un mejor resultado estético.

La segunda ventaja importante de administrar tratamiento sistémico antes de la cirugía, es que podemos saber si ese tumor ha sido sensible o no, a dicho tratamiento. Esto permite, por un lado, una valoración rápida de la utilidad de nuevos esquemas o fármacos, sin tener que esperar durante años a los datos de supervivencia. Por otro lado, está demostrado que el hecho de que un tumor desaparezca completamente con la QT neoadyuvante, hasta el punto de que, tras la cirugía, el patólogo no encuentra carcinoma infiltrante al analizar la pieza quirúrgica con el microscopio, es un factor de muy buen pronóstico.

La tercera ventaja es que en el caso de no objetivarse respuesta a un tratamiento neoadyuvante concreto, se puede ofrecer a la paciente un tratamiento alternativo adyuvante para intentar evitar o retrasar la recaída (40).

La cuarta, pero no menos importante, ventaja de la administración de tratamientos neoadyuvantes, es el poder estudiar los mecanismos moleculares de crecimiento y resistencia tumoral y de esta manera poder identificar nuevos factores biológicos predictivos de eficacia. Este es el objeto de la presente tesis.

Como teóricos inconvenientes del tratamiento sistémico neoadyuvante se

han argumentado la posibilidad de la progresión durante el tratamiento, el sobre-tratamiento de algunas pacientes y la ausencia de información sobre el estado ganglionar de la axila.

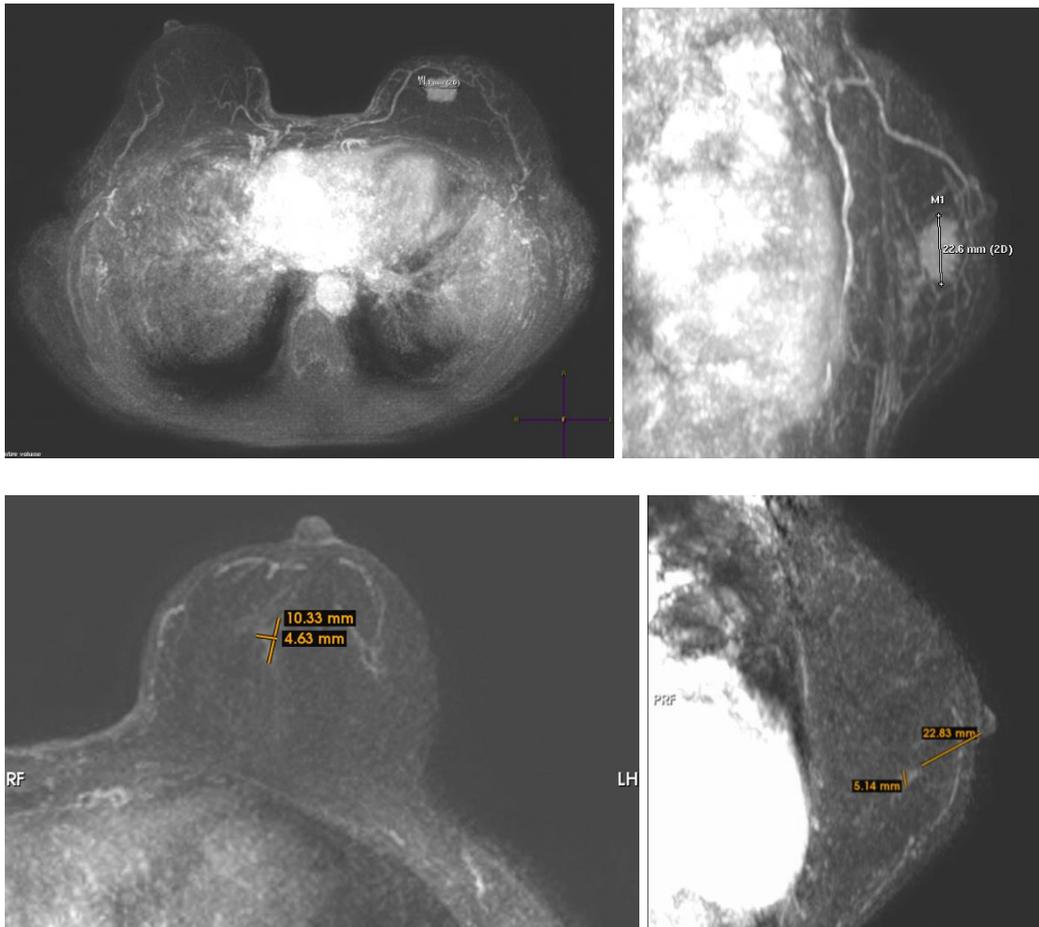
La progresión durante el tratamiento es poco frecuente, menos del 5% en todas las series, y tras múltiples estudios, ha quedado demostrado que la SG no empeora por dar la QT antes o después de la cirugía (39)(41).

Respecto al sobre-tratamiento, hay que decir que, actualmente, la toma de decisiones a la hora de elegir un tratamiento complementario se basa, en la mayoría de los casos, en las características biológicas y tamaño del tumor primario, lo que minimiza la importancia actual de la estadificación ganglionar. Además las técnicas de imagen, ecografía (42) y resonancia magnética (RMN) y la del ganglio centinela, permiten una valoración precisa de la axila, tanto antes (43), como después del tratamiento neoadyuvante (44).

Con respecto al tipo de tratamiento utilizado en neoadyuvancia, puede utilizarse cualquier modalidad de tratamiento sistémico (hormonoterapia, quimioterapia, anticuerpos monoclonales, fármacos contra nuevas dianas o combinaciones de varios de ellos) dependiendo del subtipo de cáncer de mama y de la expresión o no de receptores accionables. En general, los fármacos usados para la neoadyuvancia, pueden ser los mismos que se usan para la adyuvancia.

Con respecto a la evaluación de la respuesta al tratamiento neoadyuvante, disponemos de varios métodos: exploración clínica con calibrador, mamografía, ecografía, RMN y tomografía por emisión de positrones (PET). En la práctica, la respuesta se debe monitorizar mediante clínica y una o más técnicas de imagen. En estudios comparativos de mediciones clínicas, mamográficas y

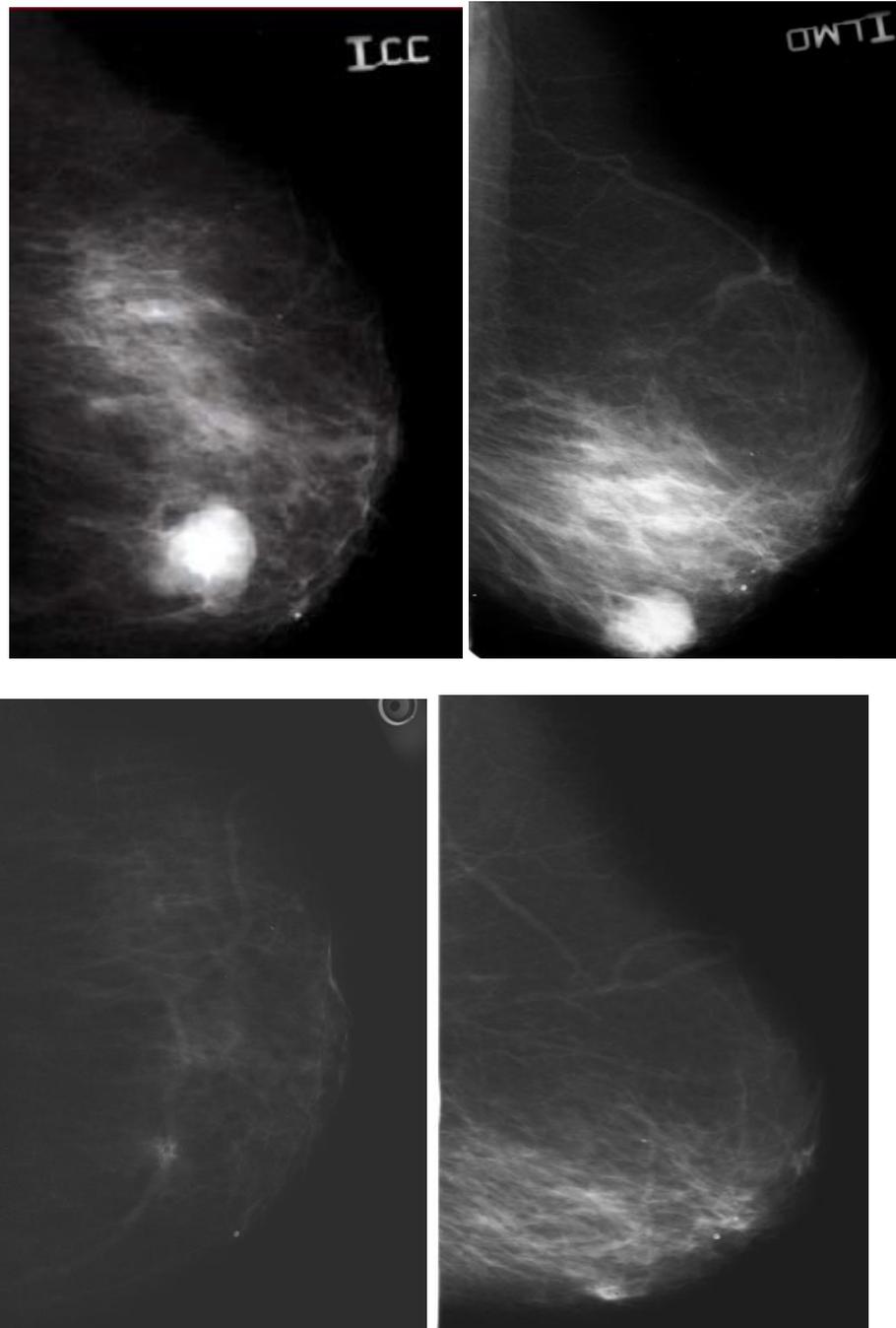
ecográficas, las que mejor se correlacionan con la respuesta patológica son la RMN para la QT (39) y la ecografía para la HTN (45). La RMN ha demostrado su utilidad en la valoración de la respuesta a QT, pero todavía no hay suficiente experiencia con RMN ni con PET en la valoración de la respuesta a la HTN (46).



**Figura 7:** Resonancia Magnética basal (arriba) y después de 6 meses de neoadyuvancia (abajo) de una paciente con carcinoma RE positivo.

Probablemente en la población de pacientes añosas, la mamografía y sobre todo, la ecografía, son pruebas fácilmente valorables, menos costosas, menos molestas para la paciente y muchas veces útiles (figuras 8). Con respecto a PET, hay trabajos preliminares que mostraron predicción de la respuesta a la QT con PET de con fluorodesoxiglucosa (46) y un trabajo sobre 47 pacientes con PET de fluoroestradiol que dice que es capaz de predecir la respuesta al

TAM después de solo 7-10 días de tratamiento del mismo (47).



**Figura 8:** Mamografía diagnóstica Proyección Cráneo-Caudal (imagen superior izquierda) y Medio-Lateral (imagen superior derecha) en una paciente con carcinoma RE positivo y después de 6 meses de HTN proyección Cráneo-Caudal (imagen inferior derecha) y Medio-Lateral (imagen inferior izquierda)

## 1.5.2 QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN TUMORES RE POSITIVO Y HER2 NEGATIVO

La probabilidad de respuesta a la QT neoadyuvante es menor en la población con tumores RE positivo (16)(17)(18)(19)(20)(21)(48)(49). En esta población, la QT neoadyuvante produce una tasa de respuesta (TR) clínico-radiológica que ronda el 60% (39)(41)(47) (48)(49)(50).

Por otra parte, la QT neoadyuvante ha demostrado que aumenta la tasa de cirugía conservadora de la mama (CCM), si bien el porcentaje varía mucho entre los distintos estudios debido a las diferentes características de la población incluida en cada uno. En el estudio de Boughey y col. (48) se revisaron 694 casos y la tasa de CCM fue significativamente superior en los casos de tumores triple negativo (46.8%) y tumores HER2 positivo (43.0%) con respecto a los tumores con RE positivo y HER2-negativo (34,5%;  $p = 0,019$ ). El beneficio en CCM aún es menor en el carcinoma lobulillar, en donde la evaluación clínico-radiológica es más dificultosa y la tasa de reintervenciones y de mastectomías es mayor (43)(47)(50). Esto quedó de manifiesto en el estudio de Straver y col. (49), en donde la tasa de CCM aumentó con la QT neoadyuvante un 37% (73 de 198 casos), pero en las pacientes con histología ductal fue del 41% (63 de 152 casos) (IC95% 0,34–0,49) frente a solo el 20% de la histología lobulillar (7 de 35 casos) (IC95% 0,10–0,36) ( $p = 0,02$ ). Los autores comentan que la mitad de las pacientes con carcinoma lobulillar, debieron ser sometidas a una segunda cirugía para practicar mastectomía por afectación de los márgenes tras la tumorectomía inicial.

El índice proliferación Ki-67 es otro factor relacionado con la pCR. En el estudio de Alba y col (51), los tumores con Ki-67 igual o inferior a 10 tuvieron la

misma tasa de respuesta TR clínica con QT que con HTN (QT: 63%, HTN: 58%;  $p = 0,74$ ), en cambio los tumores con Ki67 > 10% respondieron mejor a la QT (67% versus 42%;  $p = 0,075$ ). Un reciente estudio retrospectivo de la Universidad de Chongqing sobre 1010 pacientes tratadas con QT neoadyuvante, revela que Ki-67 solo está relacionado con la pCR en los tumores de tipo luminal y que un punto de corte > 25% marca diferencias significativas en alcanzar o no la pCR (52).

Recientemente se ha publicado la tasa de pCR de 13939 mujeres tratadas con QT neoadyuvante en la base de datos de los Estados Unidos, de las cuales 322 (2%) eran luminal A, 5941 (43%) luminal B, 2274 (16%) HER2 y 5402 (39%) triple negativo. La pCR de los tumores luminales A fue solo del 0,3 % (53). Dado que el beneficio con QT neoadyuvante en SLR y SG se observa fundamentalmente cuando se obtiene pCR y dada la toxicidad que produce, es cuestionable la indicación de QT neoadyuvante en tumores RE positivo y con baja tasa de proliferación.

La histología de carcinoma lobulillar también es un factor de baja tasa de pCR (54), de hecho en el estudio de Straver y col (49) la tasa de pCR en tumores ductales fue del 12% frente al 2% de los lobulillares ( $p = 0,09$ ).

Pero, a diferencia de los tumores con receptores hormonales negativos, en los tumores RE positivo y HER2 negativo, la tasa de pCR no es un buen indicador pronóstico de la SG, sobre todo en tumores de tipo luminal A. En este subtipo la tasa de pCR es muy baja y sin embargo exhiben una larga supervivencia (55) (56).

### **1.5.3 HORMONOTERAPIA NEOADYUVANTE**

#### **1.5.3.1 Estudios con SERM**

El uso de HTN no está tan generalizado como el de la QT neoadyuvante (57), quizá porque no existe ningún estudio de fase III que haya comparado HTN con hormonoterapia adyuvante. Pero, hace muchos años que el tratamiento hormonal primario, se demostró como una estrategia muy eficaz en la paciente anciana o con elevada comorbilidad. De hecho, en pacientes ancianas, es frecuente el diagnóstico de tumores voluminosos, no porque el tumor tenga una biología más agresiva, sino porque a menudo, estas pacientes tardan en consultar al médico y habitualmente son excluidas de los programas de cribado poblacional (58)(59). El primer estudio fase II con TAM como agente único sobre 68 mujeres mayores de 75 años fue publicado en 1982 por Preece y col. (60) Reportaron una TR del 73% y una supervivencia actuarial a los 5 años del 50%, aunque la supervivencia de las pacientes que obtuvieron respuesta completa fue del 92% (61). Otras series de pacientes tratadas con TAM han reportado una TR de entre 33-70% (62)(63).

Los primeros estudios aleatorizados compararon la cirugía frente a TAM en monoterapia en pacientes ancianas con tumores operables. Confirmaron una TR clínico-radiológicas de entre 33 y 70% (64)(65)(66). El tiempo necesario para alcanzar la respuesta según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) osciló entre los 3 y 9 meses, y la duración media de la respuesta era de aproximadamente 25 meses. Tras un seguimiento prolongado se constató, en todos los trabajos, que no existían diferencias en SG entre los brazos de cirugía y TAM, aunque si hubo un peor control local del cáncer en aquellas pacientes a las que no se les practicó cirugía de inicio (Tabla 2).

<b>Autor año</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>% R. Local</b>	<b>SG</b>	<b>DMR meses</b>	<b>Segui. Med.(años)</b>
<b>Gazet 1994 [64]</b>	TAM vs Cirugía min.	60	38	No dif	25	3
<b>Robertson 1992 [65]</b>	TAM vs Mastectomía	66	81	No dif		12
		55	38 p<0,0001			
<b>Fentiman 2003 [66]</b>	TAM vs Mastectomía	89	57	No dif		11,7
		88	9			

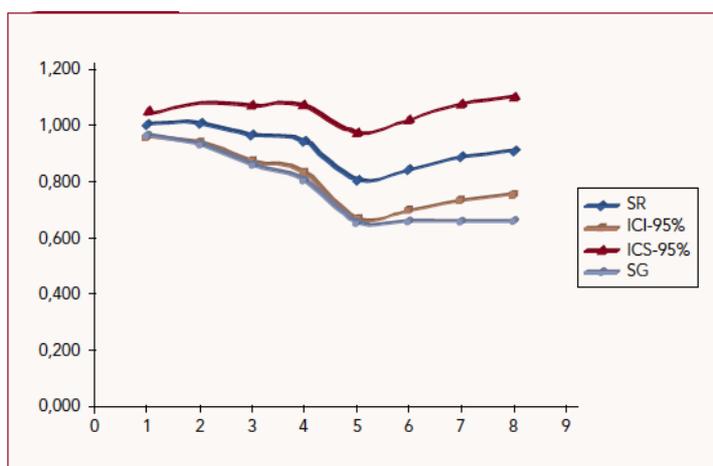
*Tabla 2: Estudios aleatorizados entre cirugía y tamoxifeno como tratamiento único.*

Posteriormente, otros dos ensayos aleatorizados que incluyeron a 474 pacientes, compararon TAM monoterapia frente a cirugía seguida de TAM adyuvante en pacientes > 70 años. Tras un seguimiento medio de 5 años, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ni en SG ni en tasa de metástasis a distancia (Tabla 3), pero el grupo de pacientes tratado con cirugía presentó menor tasa de recaídas/progresiones locales (66)(67). La CCM obtuvo los mismos resultados en cuanto a control local que la mastectomía. Tras un seguimiento medio de 12,7 años, se evidenció una mejor supervivencia específica por cáncer de mama (SECM) en la rama de pacientes con cirugía de inicio (69). El tema quedó zanjado cuando un meta-análisis de 7 ensayos, fue incapaz de encontrar diferencias en SG, pero confirmó que las pacientes con cirugía inicial presentaron mejor SLR con un hazard ratio (HR) de 0,55 y  $p = 0,0006$  (70). Por los resultados de estos estudios, se puede concluir que, la cirugía tiene un bajo impacto en la SG de las pacientes ancianas con cáncer de mama RE positivos y con esperanza de vida corta, pero, si la expectativa de vida es larga, es imprescindible practicar una cirugía para obtener un buen control local de la enfermedad.

<b>Autor año</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>% R. Local</b>	<b>SG</b>	<b>Segui. Med.(años)</b>
<b>Bates 1998 [67]</b>	TAM 40 mg	183	30	82,5	3
	Cir + TAM	171	20,5	85	
<b>Mustacchi 2003 [68]</b>	TAM 20 mg	236	25,5	82,5	3
	Cir + TAM	237	6,5	80	

*Tabla 3: Estudios aleatorizados entre cirugía seguida de tamoxifeno frente a tamoxifeno como tratamiento único.*

El Toremifeno (TOR) es otro SERM que ha demostrado ser clínicamente tan eficaz como TAM en enfermedad metastásica y en adyuvancia (71)(72). En 1997 en el Institut Català d'Oncologia (ICO) – Hospital de Bellvitge diseñamos un estudio fase II con la intención de determinar la actividad clínica de TOR como HTN del cáncer de mama en tumores de más de 3 cm con RE y/o RP positivos en pacientes mayores de 65 años (73). Se incluyeron 58 pacientes con una mediana de edad de 75 años (rango 65-88). Todas las pacientes recibieron 60 mg/día de TOR. La cirugía se practicó entre 6 y 24 meses después de iniciar TOR, en un intento de alcanzar la máxima respuesta. Se efectuaba una evaluación de la respuesta cada 3 meses. En caso de observarse respuesta a la HTN, el tratamiento con TOR se mantenía en adyuvancia hasta un máximo de 5 años. El objetivo principal era la TR según criterios de la OMS, objetivándose un 63% (IC95%: 52,6-77,9%). Inicialmente, todas las pacientes habían sido consideradas como no tributarias de CCM; después de la HTN, 43 pacientes fueron operadas (73%), 26 con CCM y 17 con mastectomía. Por tanto, se pudieron beneficiar de CCM un 55% de las pacientes en las que inicialmente estaba contraindicada esta cirugía.



**Figura 9:** Supervivencia relativa y supervivencia global del estudio fase II con toremifeno. Tomado de Gil et al.(29). SR: supervivencia relativa; ICI: intervalo de confianza inferior; ICS: Intervalo de confianza superior; SG: supervivencia global.

Tras una mediana de seguimiento de 56 meses, la SG a los 5 años fue del 60% (IC95%: 48,4-75,5%) y la SRCM fue del 86% (figura 9). La tasa de supervivencia relativa es la forma de demostrar si el diagnóstico de cáncer acorta la esperanza de vida.

### **1.5.3.2 Estudios con IA**

En pacientes postmenopáusicas, los IA han demostrado en estudios aleatorizados que son superiores a los SERM, tanto en enfermedad metastásica (24)(25)(26) como en adyuvancia (28)(29)(30)(31). Usados como HTN en pacientes postmenopáusicas con RE positivos, también demostraron una alta TR en ensayos de fase II sobre series cortas de pacientes (tabla 4): ANA 70% (74), LET 59-65% (75)(76) y EXE 41-66% (77)(78)(79). Estos resultados motivaron el llevar a cabo estudios comparativos entre diferentes IA y TAM en pacientes postmenopáusicas. El primero de estos estudios fue el estudio P024 que aleatorizó a 324 pacientes con cáncer de mama > 3 cm y receptores hormonales positivos, a recibir durante 4 meses en forma doble ciego LET 2,5 mg/día o TAM 20 mg/día (80). Los datos del estudio demostraron que LET como tratamiento neoadyuvante era más eficaz que TAM en TR tanto por evaluación clínica (55% vs 36%  $p<0,001$ ), como mamográfica (34% vs 25%  $p<0,042$ ), como ecográfica (34% vs 17%  $p<0,0001$ ) así como en la tasa de pacientes con CCM (45% vs 35%  $p=0,022$ ). El estudio confirmó la escasa frecuencia de pCR en ambas ramas (2 casos con LET y 3 con TAM). Estos resultados condujeron a la progresiva sustitución de los SERM por IA en esta indicación.

El estudio fase III, doble ciego IMPACT aleatorizó 330 mujeres postmenopáusicas con tumores operables > 2 cm y RE positivos a recibir ANA, TAM, o a la combinación de ambos durante 12 semanas antes de la cirugía (81). No hubo diferencias ni en TR clínica, que fueron de 37%, 36% y 39% respectivamente ( $p=0,29$ ), ni en la TR valorada por ecografía (24%, 20% y 28%). Si hubo una tendencia a favor de ANA en la tasa de CCM (44% vs. 31%) pero sin llegar alcanzar la significación estadística ( $p= 0,23$ ).

El estudio PROACT también comparó ANA frente a TAM en 451 pacientes, aunque un 29% de las pacientes tratadas con ANA y un 32% de las tratadas con TAM también recibieron QT de forma opcional y concomitante con la HTN (82). Los resultados iniciales, no mostraron diferencias significativas en la TR entre los dos grupos, pero si excluimos las pacientes que recibieron QT concomitante, la TR fue más alta con ANA que con TAM, tanto por valoración clínica (49 vs. 36%,  $p = 0,04$ ) como por ecografía (37 vs. 24%,  $p = 0,03$ ). Además, también hubo diferencias significativas en la tasa CCM a favor de las pacientes tratadas con ANA en lugar de TAM (43 vs. 31%,  $p = 0,04$ ).

El estudio fase II aleatorizado ACOSOG Z1031, ha comparado la eficacia de los diferentes IA comercializados, sobre 377 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama RE positivo (Allred score 6-8) estadios II o III, aleatorizadas a recibir EXE 25 mg/día, ANA 1 mg/día o LET 2,5 mg/día como HTP durante 16-18 semanas (83). La TR fue del 62.9 para EXE, 74.8 para LET y 69.1 para ANA. El estudio concluyó que los tres agentes son equivalentes en cuanto a actividad clínica, tanto por TR como por tasa de CCM. La tasa global de CCM para las pacientes con indicación inicial de mastectomía fue del 51%.

Autor y año	n	Edad	Tratamiento	% TR	CCM	PRO	pCR	SLE 3ª	Obs.
<b>Estudios Fase II</b>									
Baselga J <sup>76</sup> 2009	138	67	LET-PI x 4 m	59	-	4,5%	1,4%	-	Fase II R
	132	68	LET-Ev x 4 m	68 p= 0,062		2,2%	0,8%		
Dixon MJ <sup>115</sup> 2011	60	76,2	Let 3-10 m	65	81%	5%	0%	90%	Lobelar
Mlineritsch B <sup>77</sup> 2007	80	71	EXE x 4m	41	76%	3%	3%	-	Fase II
Barnadas <sup>78</sup> 2009	55	76	EXE x 6m	61	58%	3,7%	2,3%	-	Fase II
Takei <sup>79</sup> 2008	44	60	EXE x 4m	66	90%	7,5%	0%	-	Fase II
<b>Estudios aleatorizado entre diferentes tratamientos hormonales</b>									
Eiermann W <sup>80</sup> 2001	154	67,5	LET x 4 m	55	45%	12%	1%	-	Fase III DC
	170		TAM x 4 m	36 p<0,001	35% p=0,02	17%	2%	2%	
Smith IE <sup>81</sup> 2005	113	73	ANA x 3 m	37	46%	9%	-	-	Fase III DC
	108		TAM x 3m	36	22%	5%			
	109		ANA+TAM	39 p=0,03	26% 5%				
Cataliotti L <sup>82</sup> 2006	228	67,3	ANA ± QT	37	43%	-	-	-	Fase II R
	223	66,7	TAM ± QT	24 p=0,03	31%				
Ellis J <sup>83</sup> 2011	125	Post	ANA x 4 m	69,1	76%	7,3%	-	-	Fase III
	128		LET x 4 m	74,8	60%	4,7%			
	124		EXE x 4m	62,9	67%	6,5%			
Masuda N <sup>84</sup> 2012	97	Prem	Gos+ANA 6m	64,3	72%	1%	1%	-	Fase III DC
	97		Gos+TAM6m	37,4 p=0,032	68%	8%	0%	0%	
Lerebours F <sup>85</sup> 2016	59	71,6	ANA x 4-6m	54,4	57%	1,7%	-	94,9%	Fase II R
	57		FUL x 4-6 m	54,1	50%	0%		91,2%	
<b>Estudios que comparan la duración de la HTN</b>									
Dixon MJ <sup>87</sup> 2009	182	76,5	LET 3m	69,8	60%	2,2%		70%	Serie
	63		LET 3-24m	83,5	72%				
Llombart A <sup>88</sup> 2012	56	79	LET 4-12 m	76,8	43%		0%	-	Fase II TMR:4m
Carpenter R <sup>91</sup> 2014	139	73,5	Let x 4-12 m	75,3	69%	6%	-	-	Fase II TMR:7m
Allevi G <sup>92</sup> 2013	120	79,4	LET x 4 m	49,6	80%	5%	2,5%	-	Fase II no R
		75	LET x 8 m	85,3	85%	1%	5%		
		78,5	LET x 12 m	95,0	87,5%	0%	17,5%		
KrainickStrobel <sup>93</sup> 2008	14	67	LET x 4	55	71%	0%	-	-	Fase II R
	15		LET8 m	72	80%	3,5%			
Fontein DB <sup>94</sup> 2012	102	72	Exe x 3-6 m	58,7	61,8%	4%	1,8%	-	Fase II R
				68,3	70,6%				
<b>Estudios que comparan Quimioterapia con HTN</b>									
Semiglazov V <sup>95</sup> 2007	121	68	Ana/Exe x3m	64	33%	9%	3%	96%	Fase II R
	118	67	DOXO-Pac	64	24%	9%	6%	96%	
Alba E <sup>51</sup> 2012	47	51	EXE±LhRh 6 m	48	56%	8%	0%	-	Fase II R QT> tox
	48		EC x4 → D x 4	66 p=0,075	47%	2%	2%		
Palmieri C <sup>96</sup> 2014	22	59,8	Let x 4-5,5m	59,1	-	-	0%	98%	Fase II R
	22		FEC x 6	54,5			0%		
Bear HD <sup>97</sup> 2017	12	65	RS < 11- HT	83,3	75%		0%		Asigna Tto por RS
	19	64	RS 11-25-HT	50	72%		0%		
	14	56,5	RS 11-25 QT	72,7	64%		0%		
	14	60	RS > 25 QT	92,9 p=0,049	57%		14%		

Tabla 4: Estudios con IA neoadyuvante en cáncer de mama Receptor Hormonal Positivo

El ensayo fase III doble ciego STAGE, aleatorizó a 197 mujeres premenopáusicas con tumor RE positivo y HER2 negativo, a recibir ANA 1 mg/día o TAM 20 mg/día junto a goserelina durante 6 meses (84). ANA fue superior a TAM en TR clínica (70,4% vs. 50,5%,  $p = 0,004$ ), TR por ecografía (58,2% vs. 42,4%,  $p=0,027$ ) y TR por RMN o TAC (64,3% vs. 37,4%,  $p= 0,032$ ). La tasa de CCM también fue mayor con ANA + Goserelina (72% vs 68%).

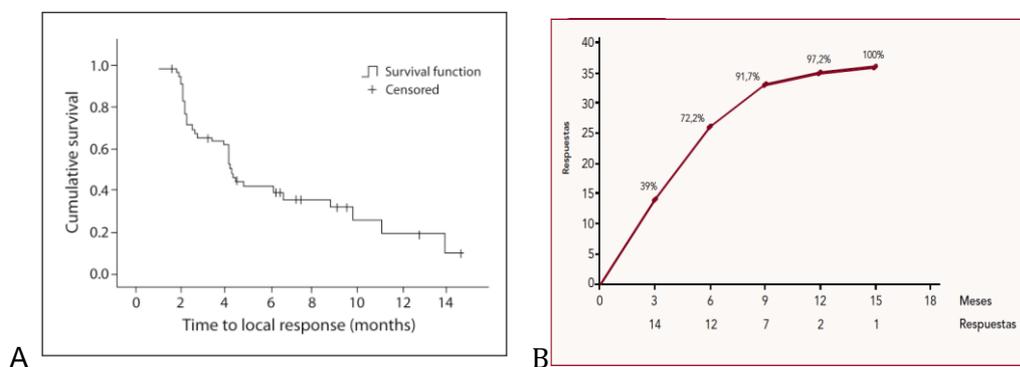
Otro reciente estudio comparativo entre IA y un fármaco anti-RE, es el estudio Fase II CARMINA, que incluyó 116 mujeres con carcinoma de mama T2-T4, N0-N3, M0 con una edad media de 71,6 años. Fueron aleatorizadas para recibir ANA 1mg/día o FUL 500mg / 4 sem (85). La TR clínicas a los 6 meses fue del 52,6% (IC95%: 41%-64%) con ANA y 36,8% (IC95%: 25%-49%) con FUL. Se practicó CCM en el 57,6% y 50% respectivamente. La SLR a los 3 años fue del 94,9% con ANA y 91,2% con FUL.

El meta-análisis de Spring y col. publicado en 2016 sobre 20 estudios con 3490 pacientes, concluyó que las pacientes que recibieron un IA en HTN, tuvieron de forma significativa mayor TR clínica (HR 1,69; IC95%:1,36-2,10;  $p < 0,001$ ), TR radiológica (HR 1,49; IC95%:1,18-1,89;  $p < 0,001$ ) y tasa de CCM (HR 1,62; IC95%: 1,24-2,12;  $p < 0,001$ ) en comparación con TAM y que la incidencia de pCR era  $<10\%$  en todos los estudios (86).

### **1.5.3.3 Duración de la HTN**

Una cuestión crítica y todavía no claramente resuelta por estudios prospectivos, es cual ha de ser la duración óptima de la HTN. Los grandes estudios aleatorizados escogieron de forma empírica, periodos diversos entre los 3 y los 6 meses (80) (81) (82) (83) (84) (85). La respuesta clínico-radiológica a la hormonoterapia suele ser lenta, puede observarse a partir de

los 2-3 meses, pero el máximo efecto suele verse pasado los seis meses. Un estudio de Dixon y cols. analizó una serie de 182 pacientes tratadas de forma consecutiva en Edimburgo con LET durante 3 meses o más; 63 de estas pacientes continuaron con LET neoadyuvante durante más tiempo hasta un máximo de 2 años (87). A los 3 meses el 69,8% había presentado respuesta radiológica. La TR alcanzó el 83,5% prolongando el tratamiento. La tasa de CCM también pasó del 60% a los 3 meses, al 72% con la prolongación. En el estudio de Llombart-Cussac y cols. el tiempo medio para alcanzar la respuesta fue de 4,2 meses, pero el 37,1% de las pacientes alcanzaron la máxima respuesta entre los 6 y los 12 meses (88). En el ensayo de Gil y col; el tiempo medio necesario para obtener la respuesta radiológica fue de 6 meses con unos extremos de entre 3 y 18 meses por lo que, aunque no se sabe con certeza cuál es el mejor momento para practicar el tratamiento quirúrgico después de HTN, nuestra recomendación es practicar cirugía a partir de los 6 meses de iniciado el tratamiento hormonal y no más allá de los 12 meses, porque a partir de ese momento existe riesgo de que se desencadene resistencia y pueda aparecer progresión tumoral después de una respuesta inicial al tratamiento (73).



**Figura 10:** A) Curva del tiempo hasta alcanzar la máxima respuesta del estudio de Llombart-Cussac [88]. B) Curva hasta alcanzar la máxima respuesta del estudio con TOR de Gil et al [71]

Todos los estudios han confirmado que la HTN permite aumentar la tasa de CCM (57), aunque el porcentaje de cirugías conservadoras varía en los estudios dependiendo del tanto por ciento de pacientes candidatas a cirugía conservadora en el momento del inicio de la HTN y de la duración de la HTN. Hay que resaltar aquí que, para todas las pacientes, con independencia de si son o no de edad avanzada, la mastectomía supone una mutilación y tiene un impacto emocional tan importante como en la mujer joven. Si las dejamos elegir, las pacientes mayores de 70 años eligen una cirugía conservadora antes que la mastectomía (89). Por otra parte, algunos investigadores han comparado la tasa de recaída local tras tratamiento conservador entre pacientes mayores o menores de 65 años, reportando a los 10 años 4% de recaídas en las > 65 años frente al 13% de las menores (90). Además, las pacientes ancianas no toleran peor el tratamiento radioterápico, por lo que la edad no debe ser motivo de exclusión para la CCM. Pero los datos más robustos provienen de un estudio prospectivo, multicéntrico, de Fase IV, que incluyó a 146 pacientes a las que administró LET hasta que se alcanzase la indicación de CCM o hasta un máximo de 12 meses (91). El tiempo mediano para alcanzar una respuesta suficiente para poder practicar una CCM fue de 7,5 meses (IC95% 6,3–8,5 meses), solo 9 pacientes del estudio (6,5%) presentaron progresión durante la HTN. Un solo estudio ha encontrado relación entre la pCR y la duración de la HTN (92).

Se han publicado dos estudios aleatorizados sobre la duración de la HTN: Un pequeño fase II, que comparó LET por 4 meses frente a 8 meses observando mayor TR con el tratamiento más prolongado (93) y el estudio TEAM, que es otro fase II multicéntrico holandés, que aleatorizó a 102

pacientes postmenopáusicas a recibir HTN con EXE durante 3 o 6 meses y observaron una TR de 58,7% a los 3 meses frente al 68,3% a los 6 meses y un aumento en la tasa de CCM del 61,8% al 70,6 % ( $p = 0,012$ ) (94).

La tasa de progresiones en todos los ensayos con HTN de duración entre 6 y 12 meses, oscila entre el 4-8% (73)(78)(83)(84)(85)(91)(92). A los 5 años de seguimiento, la tasa de recaídas loco-regionales en los estudios de HTN es  $< 2\%$  (73)(74)(75)(76)(77)(78)(79).

En conclusión, todos los estudios evidencian que prolongar el tratamiento más de 4 meses aumenta la TR clínico-radiológicas y la tasa de CCM y sugieren que, la duración de la HTN fuera de ensayo clínico, debería individualizarse, intentando buscar la disminución de volumen del tumor deseada para poder realizar la cirugía conservadora, aunque manteniéndola un mínimo de 6 meses si queremos objetivar respuesta y no prolongándola más allá de un año para minimizar el riesgo de progresión tras una respuesta inicial.

#### **1.5.3.4 Estudios con HTN frente a QT**

El primero estudio que comparó HTN con IA de tercera generación frente a QT fue el estudio fase II de Semiglazov y col. Que incluyó 151 pacientes posmenopáusicas RE y/o RP positivo (95). Las pacientes fueron aleatorizadas para recibir 4 ciclos de QT con doxorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup> y paclitaxel 200 mg/m<sup>2</sup> concomitantes, cada 3 semanas o un IA durante 3 meses, que en la mitad de los casos fue ANA 1mg/d y en la otra mitad EXE 25mg/d. Las TR objetivas y de SLR a los 3 meses fueron similares (62% vs 72% vs 70% respectivamente  $p=0,096$ ). Tampoco hubo diferencias en el tiempo a la respuesta (57 frente a 51 días) pero si hubo una tendencia a mayor tasa de CCM con la HTP (20% vs 38% vs 33%)  $p=0,058$ .

Posteriormente el estudio fase II GEICAM 2006-2003, aleatorizó 96 pacientes con tumores RE positivo y HER2 negativo, a recibir una HTN con EXE 25 mg/día más análogos de la LH-RH si eran pacientes premenopáusicas, o bien un esquema de QT neoadyuvante con epirrubicina y ciclofosfamida por 4 ciclos seguido de docetaxel por 4 ciclos (duración total de 6 meses en ambas ramas). La TR clínica fue de 66% para QT frente a 48% de HTN ( $p = 0,07$ ). La pCR fue del 3% para la QT y no hubo ninguna pCR para la HTN. La tasa de mastectomías fue similar (49% para la QT y 35% para HTN;  $p=0,18$ ). Se incluyeron en el estudio 27 pacientes premenopáusicas, sobre las que la TR clínico-radiológicas fue solo del 24%, mucho menor que el 75% obtenido con la rama de QT (51). En este estudio la toxicidad fue significativamente mayor en la rama de pacientes tratadas con QT.

El estudio de Palmieri y col (96) sobre 44 pacientes postmenopáusicas con RE positivos que fueron aleatorizadas para recibir 6 ciclos de QT tipo FE<sub>100</sub>C cada 3 semanas o HTN con LET 2.5 mg/día durante 18-23 semanas. La TR radiológica fue del 54,5% (IC 95% 32,2–75,6) para la QT y del 59,1% (IC 95 % 36,4–79,3) para LET.

El meta-análisis de Spring sobre las 378 pacientes incluidas en estos estudios, concluyó que la QT neoadyuvante comparada con HTN, no ha demostrado diferencias significativas ni en TR clínica (HR 1.08; IC 95% 0,50-2,35;  $p = 0,85$ ), TR radiológica (HR 1,38; IC 95%, 0,92-2,07;  $p = 0,12$ ), ni en tasa de CCM (HR 0,65; IC95% 0,41-1,03;  $p= 0,07$ ) pero sí mayor toxicidad (86).

El más reciente, es el pequeño estudio de Bear et al, diseñado para asignar HTN en los tumores con Oncotype RS <11, QT neoadyuvante en los tumores con RS > 25 y aleatorizar los casos con RS entre 11 y 25. Reclutaron

55 pacientes, siendo aleatorizadas por tener un RS intermedio 29 casos. El estudio confirmó alta TR con QT en el grupo con RS > 25 (93%), alta TR con HTN en el grupo con RS < 11 (83%) y mayor TR con QT que con HTN en el grupo con RS intermedio (72,7 vs 50%) (97).

Los datos sobre la tasa de progresión con QT en tumores RE positivo y Her2 negativo son de 1-5% (16)(17)(18)(19)(20)(21)(39)(49)(54), cifras similares a las reportadas con HTN, por tanto no hay ninguna evidencia de que la HTN tenga mayor riesgo de progresión durante el tratamiento que la QT.

Por último, hemos de comentar que en el estudio ACOSOG-Z1031, se realizó una enmienda para incluir una determinación del Ki-67 después de 2-4 semanas de tratamiento con IA. Si el Ki67 era > a 10%, las pacientes cambiaban el tratamiento neoadyuvante a QT. Solo 2 de las 35 pacientes que cambiaron a QT neoadyuvante dentro en este sub-estudio denominado ACOSOG Z1031B alcanzaron la pCR (5,7%) (98).

#### **1.5.3.5 Factores predictivos de la HTN**

En todos los estudios la presencia de RE $\alpha$  es el mejor y más poderoso factor predictivo de respuesta a la HTN (73)(78)(79) y en algunos estudios existe una correlación directa entre el porcentaje de expresión de RE y la TR del tumor (73)(99). En este sentido, con el sistema de puntuación de Allred, un valor aproximado a 6 o superior, hace más probable la respuesta (100).

No hay tanta unanimidad con respecto a la expresión de RP como factor de predicción a la respuesta en HTN. El RP es un factor predictivo estadísticamente significativo en algunas series (100) pero, en cambio, no lo es en otras (73). Muchos autores creen que el RP sólo desempeña un papel en caso de que exista presencia simultánea de RE, por eso los raros casos de

tumores RE negativo y RP positivos (representan < 1%) hay que considerarlos como poco o nada hormonosensibles (101). En un pequeño estudio Fase II francés con exemestano neoadyuvante durante 16 semanas, el porcentaje de RP en la biopsia diagnóstica ( $p=0,017$ ) y la disminución de este en la pieza tumoral se asociaron de forma significativa a la TR ( $p=0,028$ ) (102). En lo que todos los estudios están de acuerdo es en que el porcentaje de expresión de RP disminuye significativamente cuando analizamos los RP en la pieza quirúrgica de una paciente tratada con HTN con respecto al de la biopsia ( $p<0,001$ ) (73)(75)(76)(103).

Sin embargo, a pesar de seleccionar a las pacientes por la expresión de receptores hormonales, la TR raramente alcanza el 70% de los casos. Por tanto, es necesario seguir buscando factores predictivos de la respuesta para seleccionar mejor las pacientes que se benefician de la HTN y para ofrecer mejores alternativas a las pacientes que tiene poca posibilidad de respuesta.

La amplificación del gen ESR1 se ha manifestado como un factor de resistencia hormonal en estudios de cáncer de mama avanzado, pero ha sido poco estudiado en HTN. Algún trabajo dice que esta amplificación puede ser detectada hasta en el 20% de todos los carcinomas de mama y que la presencia de esta amplificación correlaciona con sobreexpresión de RE (104), pero otros muchos trabajos, sostienen que en el momento del diagnóstico, solo el 3% de los cáncer de mama presentan esta amplificación y por tanto su valor como factor de predicción sería escaso (105)(106).

BCL-2 también ha sido estudiado como factor predictivo de la respuesta a la HTN, pero sin haber demostrado resultados significativos (107).

El GH o nuclear es un factor estadísticamente significativo en muchos

estudios (73) pero no siempre es un factor independiente del nivel de RE.

La sobreexpresión de HER2 es un factor de resistencia a TAM, y así ha quedado demostrado en estudios de hormonoterapia en adyuvancia (30). En el estudio de HTN P024 que comparó LET frente a TAM. Los tumores con sobreexpresión HER2 o de EGFR por IHQ presentaron una TR significativamente menor con TAM (21% vs 48%) pero no con LET (88% vs 60%)  $p=0,0004$ . También en el estudio IMPACT, ANA demostró mayor TR que TAM en presencia de sobreexpresión de HER2 (55% vs 22%); pero hay que aclarar que solo un 9% de los tumores del estudio P024 presentaban amplificación de HER2 y en IMPACT solo un 14% de tumores mostraban sobreexpresión (108). Por este motivo, su valor como factor predictivo, aunque importante es limitado.

El marcador de proliferación Ki67 es una proteína nuclear no histona, que está universalmente expresada en las células en proliferación y está ausente en las células quiescentes. Se expresa en la fase G1, S y G2 del ciclo celular, con un pico en la mitosis y está ausente en la fase G0 del ciclo celular (109). Se puede determinar sobre tejido fresco o parafinado, a través de diversos anticuerpos, aunque el más usado es MIB-1. El resultado se da en un porcentaje, contando la cantidad de células con núcleo teñido. Ki-67 correlaciona con GH y de hecho la clasificación de Nottingham lo incluye como uno de sus criterios de puntuación (110). Habitualmente tiene una correlación inversa con el porcentaje de expresión de los RE (99). Hace años que Ki-67 demostró su valor pronóstico en cáncer de mama en algunos ensayos, pero debido a que no se ha consensuado una metodología uniforme de la valoración, ni a que no se ha podido consensuar un punto de corte concreto a la hora de definir el riesgo, los resultados de los estudios publicados han sido

contradictorios. Una revisión de 40 estudios con más de 11.000 pacientes publicada por Urruticoechea y col. describe que Ki-67 es una variable independiente del pronóstico en pacientes con ganglios negativos (111).

Por otro parte, un Ki-67 elevado correlaciona con mayor probabilidad de respuesta a la QT y es por tanto, un factor predictor de la respuesta a la QT neoadyuvante (18)(19)(20) (52). En el estudio GEICAM 2006-2003, en los tumores con  $Ki-67 \leq 10\%$  la TR radiológica medida por RMN fue similar entre la QT y la HTN (63% y 58% respectivamente;  $p=0,74$ ) mientras que en los tumores con  $Ki-67 > 10\%$  la TR fue significativamente mayor con QT que con HTN (67% vs 42%;  $P = 0,075$ ) (51).

Dado que la acción de la de la terapia endocrina se debe principalmente a la detención del ciclo celular, un Ki-67 bajo durante o tras el tratamiento, podría ser un potencial marcador sustitutivo de la respuesta a la HTN. Sin embargo, es importante destacar que el mejor momento para evaluar la respuesta con Ki-67 no está bien definido. Varios estudios con HTN han evaluado la determinación seriada de Ki-67 como factor de predicción de la respuesta y del beneficio de la HTN a largo plazo. Dowset y col. evaluaron la disminución de Ki-67 14 días después del inicio de la HTN y demostraron que en los casos con respuesta clínica existía una disminución significativamente mayor del porcentaje de Ki-67 ( $p=0,005$ ) con respecto a los casos que no respondieron (112). En este contexto, los resultados del estudio IMPACT demostraron que el descenso de Ki-67 era más acusado con ANA que con TAM, tanto a las 2 semanas como a las 12 semanas de iniciar la HTN ( $p=0,013$  y  $p=0,0006$  respectivamente) y aunque esto no se correlacionó con diferencias significativas en la TR, el descenso de Ki-67 si se correlacionó

significativamente con SLE (HR 1,95; p= 0,004) (103). En el estudio P024 las pacientes tratadas con LET también presentaron descenso del Ki67 en la cirugía significativamente mayor, que las pacientes tratadas con TAM (108).

En una serie de 51 pacientes de Cameron y cols. (113), la disminución de Ki-67 a los 14 días del inicio de la HTN, se correlacionó con mejor TR (83% vs 41%), con mejor SLE a los 8 años (59% vs 17%) y con mejor SG ( $p < 0,05$ ).

En el estudio ACOSOG-Z1031, no hubo diferencia en la disminución de Ki-67 entre LET, ANA y EXE. El análisis de Ki-67 durante el tratamiento, fue capaz de predecir la respuesta con los tres IA (83). Pero en este estudio se vieron aumentos paradójicos en Ki-67 en la muestra quirúrgica en comparación con la biopsia basal ( $> 5\%$ ). Estas elevaciones del Ki-67 se dieron en el 12.3% y 5.8%, de los pacientes luminales A y luminales B respectivamente. También en el ensayo IMPACT, el 15% de los pacientes que tenían disminuciones en la segunda semana de HTN, presentaron aumentos de Ki-67 en la pieza quirúrgica. Esto podría justificarse por el desarrollo de resistencia a la hormonoterapia o simplemente por la heterogeneidad tumoral y el muestreo que significa una punción biopsia en un tumor voluminoso. Todo ello genera dudas sobre los puntos de tiempo óptimos para la evaluación de este y otros potenciales biomarcadores.

El estudio fase III POETIC fue diseñado para confirmar el valor de una terapia hormonal preoperatoria de solo 2 semanas en el control de la enfermedad, pero otro de sus objetivos era el análisis de Ki-67 a los 14 días del iniciado la HTN. Los primeros resultados fueron comunicados en el simposio de San Antonio de 2017 y todavía no han sido publicados (114). Se incluyeron 4480 pacientes postmenopáusicas con tumores RE positivo, que fueron

aleatorizadas 2:1 a recibir LET 2.5mg o ANA 1mg día durante 2 semanas antes de la cirugía (2976 casos) o bien cirugía primaria sin tratamiento hormonal previo (1504 casos). El 98% de las pacientes de ambas ramas recibieron hormonoterapia adyuvante y un 26% de la rama de pacientes tratadas con IA preoperatorios y un 31% de la rama control recibieron QT adyuvante. Tras 5 años de seguimiento medio, no hay diferencias significativas en Intervalo libre de recaída (ILR) y el 90% de las pacientes en ambas ramas siguen libres de recaída. Un 4,9% de las pacientes con Ki-67 basal < 10% presentaron recaída frente al 12,1% con Ki-67 igual o > de 10% (HR 2,6; IC 95% 1,82- 3,73;  $p < 0,0001$ ), es decir, confirma que Ki-67 basal es un factor pronóstico. Destaca que, en solo 32 de las pacientes tratadas con IA preoperatorio y con Ki-67 basal < 10%, el Ki-67 a las 2 semanas era > 10%, mientras que en 1202 casos con Ki67 > 10%, a las 2 semanas estaba por debajo de 10% y en 551 el Ki67 era > 10% tanto en el basal como a las 2 semanas. Este último grupo presentó un significativo mayor riesgo de recaída antes de los 5 años: 19,6%, frente al 8,9% de las que presentaron descenso del Ki67 o el 4,5% de recaídas en las pacientes que siempre tuvieron Ki-67 < 10% (HR para Ki67 mayor o igual a 10% las dos semanas 2,22; IC 95% 1,68 – 2,94;  $p < 0,001$ ). Esto evidencia que el descenso de Ki-67 a las 2 semanas de un tratamiento HTN es un factor pronóstico y predictivo independiente.

En el estudio NEOCENT, que comparó QT con HTN, la caída media de Ki-67 se produjo igual en cualquiera de las dos ramas, tanto a los pocos días de iniciado el tratamiento, como en el momento de la cirugía (96).

Otro marcador histológico de respuesta a HTN es la variante histológica lobulillar infiltrante (115). Algunos estudios contemplan esta variante histológica

como adversa a la respuesta con QT neoadyuvante, tanto por la bajísima tasa de pCR como de CCM (49)(54). Sin embargo los carcinomas lobulillares producen buena respuesta a la hormonoterapia neoadyuvante (45); de hecho la única pRC documentada en el estudio de Barnadas et al. con EXE neoadyuvante correspondía a un carcinoma lobulillar infiltrante (78).

Las plataformas de genes también pueden ser factores predictivos del beneficio de la HTN. Dos pequeños estudios japoneses analizaron la asociación entre la plataforma Oncotype RS y la TR a HTN. Encontraron que la TR fue mayor en las pacientes con RS bajo con respecto a los casos con RS alto (116)(117). Uno de estos dos estudios encuentra una TR similar entre las pacientes con RS bajo e intermedio (116). Estos datos han sido confirmados por el estudio fase III TransNEOS en el que 295 pacientes postmenopáusicas con tumores cN0, RE positivo y HER2 negativo, fueron tratadas con LET neoadyuvante durante 6 meses. La TR clínica fue significativamente mayor en los tumores con RS < 18 frente a los tumores con RS > 31 (54% vs 22%;  $p < 0,001$ ) al igual que la tasa de CCM ( $p = 0,01$ ) (118).

Con BluePrint, una plataforma de 80 genes desarrollada en Holanda y comercializada por Agendia junto con Mammaprint, hay publicado un estudio retrospectivo sobre pacientes tratadas con QT neoadyuvante o con HTN. Lo más destacable del estudio es que 87 de 474 (18%) pacientes valoradas como luminales por IHQ, fueron reclasificadas como basales por BluePrint. La tasa pCR a la QT fue del 32% para los tumores basales frente al 11% de pRC de los tumores luminales. De 53 pacientes con tumores luminales que recibieron HTN con un IA, en 36 casos (68%) se objetivó respuesta clínica (119). Es decir que Blueprint puede ser útil para clasificar correctamente el subtipo tumoral y

predecir a respuesta a la QT neoadyuvante, aunque aún no está claro que mejore la predicción de la respuesta clínica a la HTN.

Las pacientes premenopáusicas han sido habitualmente excluidas de la mayoría de los estudios de HTN y los pocos resultados que disponemos son contradictorios, por lo que es difícil extraer conclusiones en esta población. En el ensayo de Alba y col. (51) las pacientes premenopáusicas presentaron una TR significativamente inferior a las postmenopáusicas, a pesar de que las premenopáusicas recibieron análogos de la LH-RH. Otros estudios, en cambio, obtiene una TR parecida al usar análogos de la LH-RH junto a IA en pacientes premenopáusicas (84). En un estudio fase III específico para pacientes premenopáusicas, las pacientes tratadas con la combinación de ANA y Goserelina presentó mejor TR y mayor descenso de la expresión de RP, con independencia de si el Ki-67 basal era mayor o menor de 20 (120).

El papel de los receptores de andrógeno (RA) en la progresión del cáncer de mama no está claramente establecido, pero se ha mostrado como un factor de pronóstico independiente favorable en algunos estudios (HR 0,3; IC95% 0,19-0,49;  $p < 0,001$ ) (121).

## **1.6 MECANISMOS DE HORMONORESISTENCIA ADQUIRIDA**

A pesar de una respuesta inicial al tratamiento hormonal en cáncer de mama metastásico, sabemos que todos los casos acabarán progresando y que entre un 20-40% de las pacientes con cáncer de mama precoz tratadas con hormonoterapia recaerán. Estudios preclínicos han demostrado múltiples mecanismos que pueden contribuir al desarrollo de hormono-resistencia, incluyendo: pérdida de expresión de RE, aumento de la expresión de EGFR, aumento de expresión de HER-2, aumento de expresión del factor de crecimiento de la insulina-1 (IGF-1R), alteración de la vía PI3K/AKT/mTOR, activación de la vía MAPK, presencia de ligandos independientes activadores del RE $\alpha$ , cruce entre diferentes vías de señal intracelulares y activación de las ciclinas del ciclo celular (122). Describiremos brevemente los relacionados con algunas de las variables que hemos analizado en el presente estudio.

### **1.6.1 HORMONORESISTENCIA ADQUIRIDA POR EL RE**

Hay descritos dos RE funcionalmente distintos, el RE- $\alpha$ , codificado en el gen ESR1, y el RE- $\beta$ , codificado en el gen ESR2. El RE- $\alpha$  es la principal proteína reguladora de la vía, tanto en el tejido mamario normal como en el cáncer de mama hormono-dependiente. El complejo estrógeno-RE se dimeriza al unirse al ligando, e interactúa con proteínas correguladoras y secuencias específicas del ADN llamadas elementos sensibles al estrógeno (ERE) (Figura 11). Estas interacciones promueven la transcripción de una amplia gama de genes que participan en la regulación del ciclo celular, la replicación del ADN, la diferenciación celular, la apoptosis y la angiogénesis (123).

La pérdida de expresión de RE $\alpha$  es un factor de resistencia importante

porque es la diana terapéutica. Las revisiones del grupo de EBCTCG confirmaron la falta de beneficio al tamoxifeno adyuvante en los tumores RE negativo (27). Sin embargo la pérdida de expresión de RE como explicación de la resistencia endocrina adquirida no es frecuente; se observa en menos del 15% de los pacientes con cáncer de mama metastásico (124). La mayoría de los casos con resistencia endocrina adquirida, continúan expresando RE $\alpha$  activos, y ese es el motivo por el que se ven respuestas a segundas y terceras líneas secuenciales de tratamientos endocrinos.

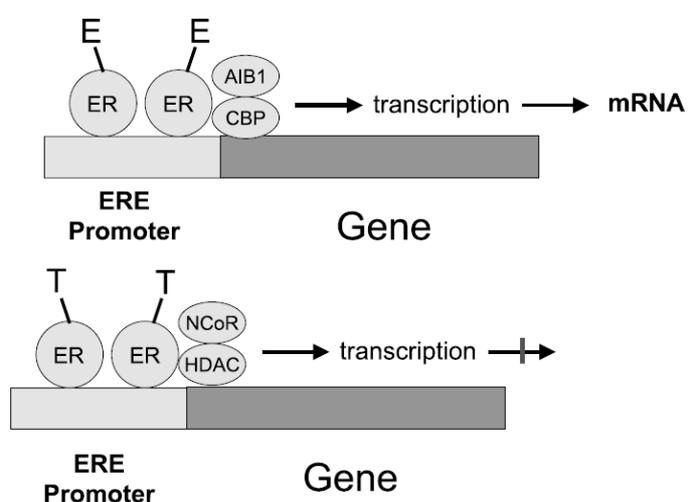


Figura 11: Efectos del Estrógeno (E) o tamoxifeno (T) unidos al RE en elemento sensible a estrógenos (ERE). AIB1 y CBP son coactivadores, mientras que NCoR es un correpresor. HDAC, histona deacetilasa. Modificado de Osborne et al [122]

Se pueden dar mutaciones o amplificaciones del gen ESR1 agrupadas en torno al dominio de unión al ligando (LBD). Estas mutaciones de ESR1 son muy raras en los tumores sin tratamiento hormonal previo. Pero estas mutaciones se puede presentar entre un 3% y un 20%, según diferentes series de pacientes con carcinoma de mama avanzado de tipo luminal que han recibido tratamiento endocrino previo (104)(105)(106). Estas mutaciones confieren la capacidad de la activación del RE sin ligando y por tanto marcarían la resistencia a IA. Un estudio mostró que la mutación K303R hace que el RE

sea capaz de inducir la proliferación incluso en condiciones de niveles de estrógeno muy bajos (125), pero esto no ha sido confirmado por otros autores. Otros estudios mostraron que FUL y TAM fueron capaces de inhibir la actividad del ESR1 mutado, aunque se requirieron dosis más altas de ambos fármacos, sugiriendo una resistencia parcial pero no completa a estos agentes hormonales (126). Se ha observado, que la incidencia de las mutaciones LBD en ESR1, correlacionan con el número de líneas de tratamiento y con el mayor tiempo de exposición a tratamiento endocrino previo. Una hipótesis es que la presión terapéutica permitiría la expansión de los clones mutados por simple selección, pero esta sigue siendo un pregunta sin contestar (127). La importancia clínica de las amplificaciones de ESR1 en enfermedad precoz y en cáncer recurrente aún no está clara. Además, hay que destacar que, a pesar del papel central de los RE en el cáncer de mama luminal, los datos actualizados de 962 muestras de cáncer de mama incluidos en el programa “The Cancer Genome Atlas” (TCGA), informan de mutaciones ESR1 en solo el 0,5% de los casos y de amplificación de ESR1 en el 2,6% de los casos (128). Todo ello hace que, a pesar de muchos trabajos de investigación sobre mutaciones en ESR1, su papel clínico en el desarrollo de hormono-resistencia en pacientes sin tratamiento hormonal previo es limitado. Se espera que estudios actualmente en curso proporcionen pronto un espectro más completo de las diversas mutaciones ESR1 y de su papel en la patología y en la resistencia endocrina del cáncer de mama RE positivo, primario y metastásico. Actualmente su análisis como un marcador no está recomendado por las guías de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) (32).

AIB1 es un coactivador del RE; interactúa con el RE de manera dependiente de ligando para mejorar la transcripción (figura 11). Sin embargo, también se ha demostrado que interactúa con otros factores de transcripción y vías de señalización y que pueden inducir la proliferación independientemente de la presencia de hormonas. En el cáncer de mama, AIB1 se correlaciona con otros factores que indican un fenotipo más agresivo (amplificación HER2, ADN no diploide, alto grado, alta fracción de fase S y Ki-67 elevado). Está demostrado que AIB1 es un marcador pronóstico (129). Recientemente, se ha publicado un análisis de este biomarcador sobre un grupo de pacientes que habían participado en el ensayo aleatorizado de hormonoterapia adyuvante BIG 1-98, y se ha confirmado que AIB1 es un claro factor de mal pronóstico pero en cambio, no lo es de predicción a mejor respuesta a IA o a TAM (130).

Las proteínas VAV1-3 están implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluido el cáncer. En el caso del cáncer de mama, se ha demostrado que la expresión de VAV2 y VAV3 es importante, tanto para la génesis tumoral primaria como para el desarrollo de metástasis. Además, VAV2 y VAV3 controlan el paso del fenotipo celular epitelio-mesénquima y la sensibilidad a la QT. VAV 3 es un activador del RE $\alpha$ . Una expresión baja o una funcionalidad baja de VAV3 se asocia a una mejor evolución clínica mientras que alta expresión puede provocar resistencia a terapias hormonales (131)

El RE- $\beta$  se expresa en las células con diferente frecuencia según el órgano. Aunque los dos subtipos de RE están codificados por diferentes genes ubicados en dos cromosomas diferentes, estructuralmente tienen mucho en común. El LBD en los dos subtipos exhibe una homología del 59% y ambos

receptores se unen a los estrógenos con similar afinidad (132). Sorprendentemente, ER $\beta$  tiene la capacidad de producir algunos efectos opuestos a RE $\alpha$ . En contraste con el RE- $\alpha$ , en el cáncer de mama se ha visto tendencia a la baja del RE- $\beta$ . Los niveles altos de proteína Re- $\beta$  se han visto asociados a tumores de buen pronóstico, prolongada SLE y respuesta a TAM. Sin embargo, son necesarios más estudios antes de que RE- $\beta$  pueda usarse como herramienta de diagnóstico y posible objetivo de la terapia.

### **1.6.2 HORMONORESISTENCIA ADQUIRIDA POR PÉRDIDA DEL RP**

La hormona esteroide progesterona es el ligando para el RP y su unión provoca la dimerización y disociación del complejo al núcleo donde se une al ADN y modula la transcripción. Se ha demostrado que la vía de señal del RE regula positivamente la expresión de RP y, por lo tanto, la mayoría de tumores RE positivo son también RP positivo. Sin embargo, hay un subgrupo de tumores que son RP-negativo al diagnóstico y algunos estudios han relacionado este genotipo con resistencia innata. De hecho, los tumores que son RE-positivo y RP-negativo muestran una menor tasa de respuesta a las terapias endocrinas y un fenotipo más agresivo que los que tienen ambos receptores positivos (133). La expresión de RP depende en gran medida de la presencia de RE. Tumores que expresan RP pero no RE son muy raros, representan menos del 1% de todos los cánceres de mama, por eso ante un tumor RP positivo y RE negativo, debe repetirse de nuevo el análisis de expresión de los receptores hormonales. En cambio, si es muy frecuente la pérdida de expresión de los RP tras un tratamiento endocrino; pero los estudios de HTN no han evidenciado que esta pérdida adquirida de la expresión de RP marque una peor supervivencia (73).

### 1.6.3 HORMONORESISTENCIA POR CICLINAS Y CICLO CELULAR

La sobreexpresión de la ciclina D1 (CD1) está implicada en el desarrollo tanto del cáncer de mama como de otros tumores sólidos y de neoplasias hematológicas. CD1 está sobreexpresada en el 29% de los carcinomas de tipo luminal A y en el 58% de los carcinomas de tipo luminal B. CCND1 es el gen que codifica esta proteína y se observa amplificación en el 14% y 25% respectivamente de estos subtipos (134).

Las ciclinas D son la llave de paso que regula la transición de la célula de fase G1 a la fase S: Cuando la ciclina D1 se une a las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4-6, provoca la fosforilación de la proteína del gen del Retinoblastoma (pRB), inactivando al gen y liberando el factor de transcripción E2F, paso necesario para que la célula progrese de fase G1 a S (Figura 12). El gen del RB y su proteína son por tanto supresores tumorales, porque evitan la proliferación celular excesiva. Mientras el factor E2F este inactivado, la célula permanece en la fase G1. Si los dos alelos del gen están mutados, la proteína está inactivada y el resultado es la proliferación de tumores, como ocurre con el Retinoblastoma de la infancia. La pérdida de expresión de pRB se da en un 20%-35 de los tumores humanos, pero no de forma homogénea. La mayoría de los cánceres de mama retienen pRB no alterada.

Se ha descrito una fuerte correlación positiva entre los niveles de expresión de RE, de RP y de CD1 (135). También hay una clara evidencia de que la sobreexpresión de CD1 es un factor pronóstico adverso, en particular entre las pacientes con RE positivo y su amplificación se asocia con recaídas tempranas (136). Además, ha demostrado valor predictivo de resistencia a

TAM adyuvante, tanto con la sobreexpresión como con la amplificación de CD1, en un estudio aleatorizado de 500 pacientes premenopáusicas con receptores hormonales positivos, mirando tanto la SLR (HR 6,38; IC95% 2,29-17,78;  $p < 0,001$ ) como la SG (HR 5,34; IC95% 1,84-15,51;  $p = 0,002$ ) (137).

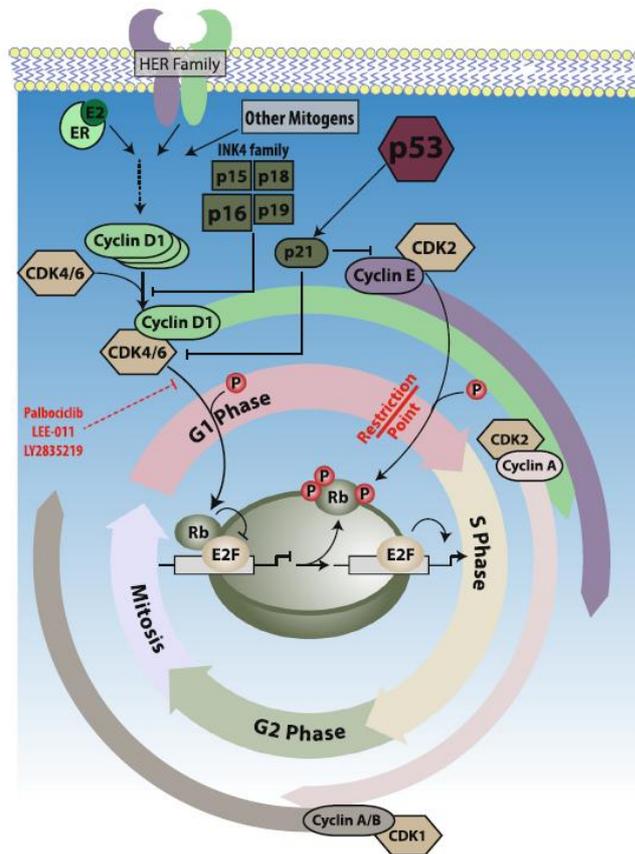


Figura 12: Ciclo celular y su regulación por Ciclina D1, CDK, RB p16 y p53. [Tomado de Finn RS et al *Breast Can Res* 2016; 18:17]

La ciclina E actúa de manera similar a la CD1 como un regulador positivo de la transición del ciclo celular, con niveles máximos de expresión de proteínas y formación de complejos enzimáticos con la CDK 2 en la fase G1 (138). La amplificación del gen Ciclina E ha sido detectada en varias líneas celulares de cáncer de mama y hay evidencias de que la ciclina E juega un papel importante en la génesis tumoral. Un estudio midió la expresión de ciclina E en 395 casos de cáncer de mama primario, y correlacionó los niveles ciclina E con otros factores de mal pronóstico ya establecidos y encontró que los

niveles de ciclina E eran los factores discriminantes más poderosos de SG y SLE, superando biomarcadores clínicos y patológicos clásicos en análisis multivariable (139). Algunos estudios han demostrado que los niveles alterados aumentan la sensibilidad de las células de cáncer de mama al cisplatino y paclitaxel (140) y además, facilitan la resistencia al tratamiento hormonal (141). Pero estos resultados deben ser validados en ensayos prospectivos.

La proteína p16 es un inhibidor de la proliferación celular, compite con las CDK 4-6 por la unión a CD1 (figura 12). De esta forma, p16 inhibe la fosforilación de pRB y detiene el ciclo celular. Esta codificada por el gen CDKN2A. Tanto la hipermetilación, como la mutación o la delección de p16 inducen proliferación celular. La pérdida de expresión de p16 en el núcleo celular y también en el citoplasma, se ha visto implicada en múltiples cánceres (vejiga, próstata, ginecológicos, ORL, melanoma y mama) (142)(143). La expresión por IHQ de p16 y CD1 demostró tener valor pronóstico en una serie de 827 pacientes con cáncer de mama tratadas con QT adyuvante (144).

La proteína p53 es una proteína supresora tumoral que también está involucrada en el ciclo celular a nivel del paso G1 a S. Si p53 está activa induce apoptosis, deteniendo el ciclo celular en el punto de control G1/S o G2/M. Pero p53 presenta isoformas, algunas de las cuales funcionan como activadoras, mientras que otras funcionan como inactivadoras. Por eso a veces, los resultados han sido contradictorios. Los tumores que presenten alelos mutados de p53 tendrán problemas para activar la entrada en apoptosis y podría permitir que las células anormales proliferen. La p53 no es detectable en las células normales porque su vida media es muy corta, tan solo 20 minutos, mientras que la p53 mutada tiene una vida media de

aproximadamente 24 horas. La localización celular de la proteína p53 varía durante el ciclo celular: durante la fase G1 se encuentra en el citoplasma, luego entra en el núcleo en la transición G1/S y allí permanece hasta el final de la fase G2/M. Como norma, en células tumorales, la proteína p53 es estrictamente nuclear. Esta acumulación nuclear de la p53 mutada permite su detección por métodos de IHQ. Este procedimiento se ha empleado en diversos tipos de cáncer con una buena correlación entre el análisis molecular (presencia de una mutación) y el análisis IHQ (sobreexpresión de la proteína mutante). La ventaja de este procedimiento es que puede ser realizado de un modo rutinario en los laboratorios de histología, el inconveniente es que algunas mutaciones pueden abolir la expresión de la p53 ("nonsense mutations", inserciones, deleciones, mutaciones de señal), no producen la proteína y como consecuencia dan un resultado negativo (5-10 % de los casos). Por otra parte, los tumores pueden sobreexpresar la p53 en la completa ausencia de mutaciones en cualquier parte del gen. Esta sobreexpresión es específica de las células tumorales y no afecta a los tejidos normales. En el proyecto TCGA se observaron mutaciones somáticas de TP53, gen que codifica p53, en el 37% de 825 cánceres de mama no tratados (128).

p53 media su efecto a través de p21 (figura 12), por lo que se suelen estudiar de forma conjunta p53 y p21. p21 inhibe las CDK y evitan la fosforilación de pRb, de manera que el factor de transcripción E2F permanece inactivo y se impide la progresión de la célula hacia la fase S. La proteína p21 es codificada por el gen CDKN1A pero, a diferencia del p53, en el cáncer no se ven mutaciones acumuladas sobre p21, de modo que los ratones que por ingeniería genética les falta p21, se desarrollan normalmente y no son

susceptibles a una mayor incidencia de cáncer, a diferencia de lo que ocurre con el p53. La expresión de p21 está íntimamente controlada por el gen supresor tumoral p53, por lo que el control del ciclo celular en G1 es dependiente de p53 y es la forma en que la célula detiene el ciclo celular.

BCL-2 (derivado de B cell Lymphoma 2) es otra de las proteínas que regulan el ciclo celular, en este caso por inducción de la apoptosis o por inhibición de la anti-apoptosis. No es por tanto una señal de crecimiento celular. Se localiza en la membrana externa de la mitocondria jugando un rol importante en la supervivencia celular. Hay dos isoformas ligadas con el linfoma (BAX y BAK). Algunos estudios asociaron expresión de BCL-2 a una mejor respuesta a la hormonoterapia y a una mejor SLE y SG (107), pero esto no fue confirmado en otros estudios. Algunos autores aseguran que las terapias endocrinas no mejoran la apoptosis de las células tumorales y que la apoptosis, por lo tanto, no es un predictor útil del beneficio de la HTN (145).

#### **1.6.4 HORMONORESISTENCIA VIA PI3K/AKT/mTOR.**

Un posible mecanismo de resistencia endocrina es la vía de señalización aberrante PI3K/AKT /mTOR. Es una vía de señalización intracelular que juega un papel en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular y tiene un papel crítico en la génesis tumoral. En el 36% de los 825 cánceres de mama del proyecto TCGA se observaron mutaciones en la vía de PIK3K (128). La proteína quinasa B o AKT es el objetivo sobre el que actúa la vía de señal PI3K y parece jugar un papel crítico en la resistencia a medicamentos. Mutaciones AKT y pérdida de PTEN ocurren hasta en un 70% de los tumores de mama (146). El complejo mTOR es la diana sobre la que actúa, aguas abajo, AKT (Figura 13). Se ha observado hiperactivación del eje PI3K/AKT/mTOR en

células de cáncer de mama endocrino-resistentes. La proteína quinasa ribosomal S6K (pS6) es un efector del complejo mTORC1. mTORC1 fosforila y activa las proteínas S6K1 y S6K2, cuyo primer sustrato es pS6. Sabemos que el eje mTOR-pS6 controla procesos celulares fundamentales, incluida la transcripción, la traducción, la síntesis de proteínas y el crecimiento y el metabolismo celular y que la desregulación de este eje de señal, contribuye al desarrollo de la enfermedad y se cree que pS6 promueve la proliferación celular y la supervivencia celular y puede producir la activación de los RE con independencia de su ligando (147). Pero en realidad, los detalles moleculares por los que se produce proliferación por el complejo mTORC1 siguen siendo poco conocidos. Estudios realizados durante la última década han descubierto una serie de sustratos S6K1 adicionales (148).

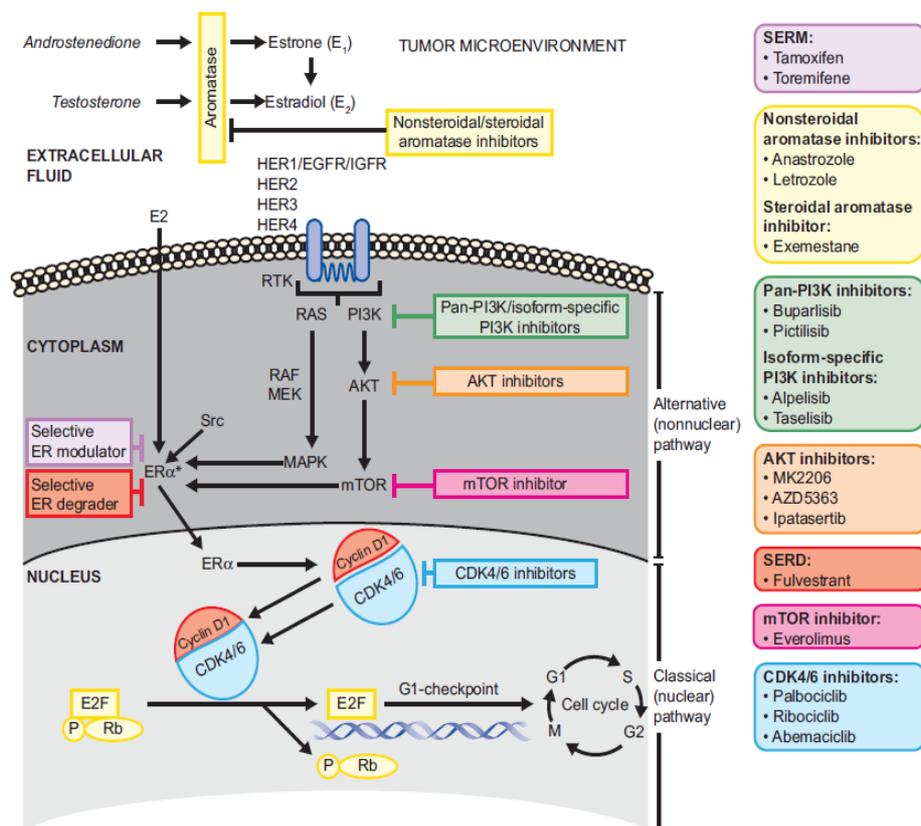


Figura 13: Vías de señal intracelular nuclear y no nucleares implicadas en la resistencia endocrina y dianas con fármacos aprobados o en desarrollo. [Tomado de Brufsky AM et al. *The Oncologist* 2018;23:528–539

Se han desarrollado diversos fármacos dirigidos contra PI3K y sus isoformas, fármacos inhibidores de AKT, así como fármacos inhibidores de mTOR. Aunque, hasta la fecha, en cáncer de mama, solo los inhibidores alostéricos de mTOR, everolimus y temsirolimus, han sido aprobados para su uso clínico en pacientes con tumores RE positivos que han presentado resistencia a alguna línea hormonal previa, al haber demostrado suficiente evidencia de revertir resistencia en cánceres en humanos, junto a una toxicidad aceptable (76)(149).

El factor de transcripción SOX9, es una proteína codificada por el *gen SOX9b*. SOX son una familia de factores de transcripción que controlan múltiples procesos de desarrollo y están envueltos en el mantenimiento de la actividad stem cell durante la embriogénesis, además media en la resistencia por la vía mTOR y con la capacidad de diseminación metastásica del cáncer de mama. Esta actividad es dependiente de EVI1 en cooperación con SOX9 (150). El gen EVI1 codifica una oncoproteína que está envuelta en hematopoyesis, apoptosis, desarrollo proliferación y diferenciación celular. Puede interactuar con MAPK.

**1.6.5 El cruce de señal intracelular** bidireccional entre RE y otros vías de señal intracelular, puede provocar un aumento de los niveles de fosforilación y de la actividad de los co-receptores de RE. Este puede ser un mecanismo clave para mantener la activación RE, independientemente del ligando, y para mediar en la resistencia a varias terapias endocrinas (Figura 14).

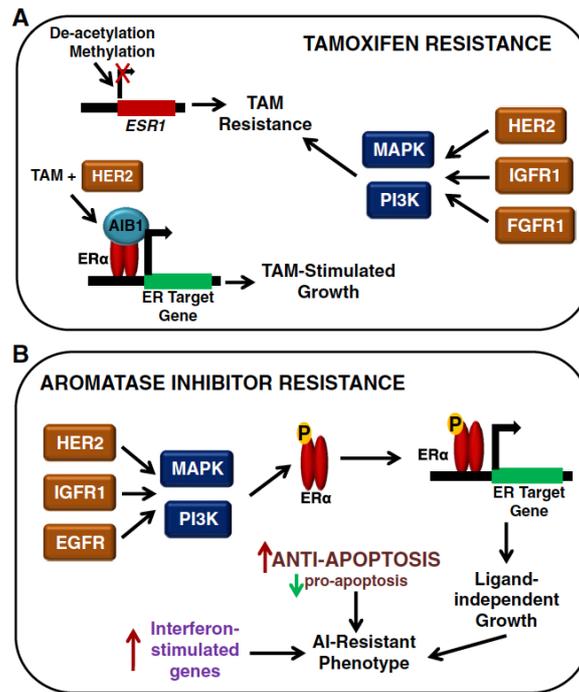


Figura 14: Mecanismos de resistencia endocrina en cáncer de mama. (A) Mecanismos de resistencia al tamoxifeno (TAM). (B) Mecanismos de resistencia a los IA. Tomado de Hayes EL & Lewis-Wambi JS. *Bres Can Res* 2015; 17: 40

Las vías no nucleares, correguladoras de la activación del RE $\alpha$ , incluyen receptores, como el receptor el IGFR, el receptor del factor crecimiento de fibroblastos (FGFR) y los receptores HER2 y HER3; y también incluye quinasas, como por ejemplo las de las vías Myc, Src y las ya comentadas vías PI3K/AKT/mTOR y la vía CDK (151,152) (Figura 14). Por cualquiera de estas vías, el RE puede ser activado a través de mecanismos independientes del ligando (123)

**1.6.6.** Finalmente, también se ha reconocido un papel emergente de varios **componentes del microambiente tumoral**. Los componentes del microambiente implicados en la resistencia endocrina incluyen células del estroma, células del sistema inmunitario, elementos estructurales de la matriz extracelular y factores solubles (por ejemplo, factores de crecimiento y

citoquinas), así como condiciones microambientales adicionales, como hipoxia y acidez. Está documentado el papel de estos estímulos microambientales extracelulares, especialmente la familia de integrinas y otras moléculas de adhesión (por ejemplo CASp130) en la mediación con las vías intracelulares de proliferación (153). CD44 es una glicoproteína transmembrana que regula la adhesión entre células y a diferentes componentes de la matriz extracelular (es un receptor del ácido hialurónico y puede interactuar con metaloproteinasas), por lo que está implicada en la migración y en la adhesión entre células. CD44 ha sido objeto de una extensa investigación durante más de 3 décadas debido a su papel dual en el cáncer de mama y a que, además actúa en muchos procesos fisiológicos. Hay datos que implican a CD44 tanto en la supresión tumoral como en la promoción del tumor. Algunos estudios lo relacionan con el desarrollo de metástasis, en cambio otros dicen que aumenta la supervivencia porque evita las metástasis a distancia (154). También juega un papel importante en la recirculación de linfocitos, facilitando la entrada de estos dentro del tejido linfoide y en la activación de células T.

Hay evidencias que sugiere un papel importante para las células madre en el desarrollo del tejido mamario y del cáncer de mama. En el cáncer de mama, estas células indiferenciadas, están vinculadas al aumento del fenotipo invasivo y metastásico. Sin embargo, su frecuencia depende del grado del tumor, estadio de la enfermedad y subtipo molecular. Se cree que las células madre son de tipo basal y principalmente RE-negativas, por lo que más que participar en el desarrollo de resistencia endocrina sería una selección clonal durante el tratamiento y esto justificaría el aumento observado en la expresión del EGFR en los tumores con resistencia endocrina (155).

## **1.7 FACTORES DEL PRONÓSTICO DESPUÉS DE LA HTN**

### **1.7.1 Respuesta patológica**

En QT neoadyuvante la pCR se ha demostrado como un factor con claro impacto pronóstico a largo plazo en tumores RE negativo (55). Pero la tasa de pCR con HTN es muy baja, oscila entre el 0% y el 9% (Tabla 4). Aunque hay que recordar que, la QT neoadyuvante en tumores RE-positivos también obtiene una tasa de pCR baja, en torno al 5-6% y con menor impacto como factor pronóstico que en tumores RE negativos o HER2 positivos (16).

Aunque la pCR con HTN es rara, sí es habitual que el patólogo vea fibrosis, ductitis, presencia de macrófagos y parches de infiltrados inflamatorios, junto con persistencia de nidos de células neoplásicas viables. Estos hallazgos podrían ser otro método de valoración de la eficacia del tratamiento, pero el problema se suscita en como medir el grado de la respuesta patológica parcial. Llegar a un acuerdo de consenso para evaluar este punto es muy difícil y de hecho, todavía no se ha conseguido. En consecuencia, sería de un gran interés poder identificar el subgrupo de pacientes RE positivo que han sido altamente sensibles a la HTN y que tiene poca probabilidad de que se beneficien de la adición de una QT adyuvante.

### **1.7.2 Respuesta Clínica**

En un estudio del grupo de Edimburgo, los dos factores adversos independientes con claro impacto en peor SG fueron: 1) que la paciente no alcanzara respuesta parcial con la HTN frente a las pacientes que sí presentaron respuesta parcial objetiva ( $p < 0,05$ ) y 2) el número de ganglios axilares con invasión patológica ( $p = 0,0001$ ) (113). Pero otros autores no han

encontrado que la respuesta clínica sea un factor independiente en los estudios multicéntricos con respecto a SG o SLR (156).

Además, ninguno de los grandes estudios de HTN nos ha dado datos comparativos entre las medidas clínicas, radiológicas y patológicas. En el ICO revisamos los datos de 58 pacientes que habían recibido HTN y analizamos la correlación entre la reducción del tumor medida por mamografía o ecografía y los cambios inducidos por el tratamiento por el informe de anatomía patológica. En 18 de los 35 casos (51,4%) en habían sido evaluados como respuesta radiológica, el patólogo no vio ningún cambio relacionado con el tratamiento. Por otro lado, en 5 de 23 casos sin respuesta radiológica, el informe patológico informó de respuesta en forma de fibrosis en más del 30% del volumen tumoral. El coeficiente de correlación de Pearson entre la reducción tumoral analizada por el patólogo y la radiológica fue de 0,418. Esta falta de correlación entre la respuesta radiológica y la patológica puede causar sesgo en la valoración de esta variable y sobre todo, incertidumbre a la hora de decidir si ha habido beneficio o no con la HTN y por tanto, de cual ha de ser el tratamiento adyuvante más óptimo a seguir.

### **1.7.3 Grado histológico (GH) en el tumor residual tras HTN.**

En un estudio retrospectivo italiano sobre 144 pacientes con tumores mayores de 3 cm, se observó que, en las pacientes a las que se les pudo practicar CCM y el tumor en la pieza quirúrgica fue valorado como de GH 1, tuvieron una mejor SLR ( $p=0,009$ ) y mejor SG ( $p=0,005$ ) estadísticamente significativas. Que el tamaño del tumor residual fuese menos a 2 cm también se relacionó de forma significativa con mejor SLE ( $p = 0.005$ ) (157)

#### **1.7.4 Disminución del Ki-67**

La evaluación temprana, mediante punción biopsia, del Ki-67 a las 2-4 semanas de iniciada la HTN, se ha desarrollado con el propósito de identificar de forma precoz las pacientes que no se beneficia de la HTN. Ellis y Dowsset escogieron el punto de corte en 10% basándose en que todos los casos por debajo de este punto presentan tumor de tipo Luminal A evaluado mediante una plataforma PAM50. De los estudios pivótales, sabemos que un Ki-67 basal elevado no supone una menor posibilidad de respuesta a la HTN, en cambio un Ki-67 > 10% a las 2-4 semanas de iniciada la HTP, predice por un lado, mayor Ki-67 en la pieza quirúrgica ( $p=0,001$ ), por otro lado, menor posibilidad de obtener un PEPI score 0 ( $p=0,004$ ) y también peor SLR ( $p=0,003$ ) (112).

En cuanto a la evaluación del Ki-67 en la pieza quirúrgica, en el estudio de Grassadonia y col; el presentar un Ki-67 <13 en la pieza quirúrgica fue un factor significativo de mejor SLR y SG ( $p = 0,002$ ), sin embargo en el análisis multivariable perdió la significación estadística a favor de GH y CCM (157).

#### **1.7.5 “Preoperative endocrine prognostic index” (PEPI)**

En la línea de identificar el subgrupo de pacientes con alta sensibilidad a la HTN y con poco o nulo beneficio de la QT. Ellis y col. generaron el índice de pronóstico tras terapia endocrina preoperatoria (PEPI) (156). Se desarrollo en inicialmente en base a datos obtenidos de 228 muestras tumorales del ensayo P024 y posteriormente fue validado utilizando otras 203 muestras del ensayo IMPACT. Destacar que el seguimiento medio era de tan solo 61 meses.

Los autores destacan en primer lugar que, en los 30 casos que el estadio clínico disminuyó desde II-III a estadio patológico 0-I, la SLE fue del

100%, frente al 70% de los 175 casos con estadio patológico II o III ( $p < 0,001$ ). Es decir que en los casos ypT0-is pN0 e ypT1pN0 el pronóstico es excelente y no requieren de QT adyuvante.

Otros factores significativos asociados con la SLE en el análisis univariante fueron el estado patológico de la axila ( $p < 0,001$ ), la respuesta clínica a la HTN ( $p = 0,002$ ), el GH basal ( $p = 0,002$ ) y GH post-tratamiento (grado I vs grado II o III;  $p < 0,001$ ); tamaño tumoral patológico (pT1-T2 vs pT3-4;  $p < 0,001$ ), elevación de Ki-67  $> 2.7$  veces ( $p < 0,001$ ) y RE positivos (Allred score  $> 3$ ) en la pieza quirúrgica ( $p < 0,03$ ). Los 16 casos del ensayo P024 que negativizaron la expresión de RE entre la biopsia inicial y la de la pieza quirúrgica tuvieron muy mala supervivencia específica por cáncer de mama (SECM). Pero en el análisis multivariable practicado sobre 158 casos, solo **cuatro variables** mostraron ser un factor independiente asociado a SLR y a SECM: el **tamaño del tumor en la pieza quirúrgica** (pT1-2 vs. pT3-4;  $p < 0,001$ ); la **afectación patológica de la axila** (positivo vs. negativo;  $p < 0,009$ ); **expresión de RE** por Allred score  $> 3$  ( $p = 0,03$ ) y **elevación del Ki67**  $>$  de 2.7% veces el basal ( $p = 0,01$ ).

Factor		Puntos para SLR	Puntos para SECM
ypT	ypT0-2	0	0
	ypT3-4	3	3
ypN	ypN0	0	0
	ypN1-3	3	3
RE (Allred)	0-2	3	3
	3-8	0	0
Nivel de Ki-67	0-2,7%	0	0
	2,8-7,3%	1	1
	7,4-19,7%	1	2
	19,8-53,1%	2	3
	53,2 o más	3	3

Tabla 5: PEPI score. Traducida de Ellis et al. J Natl Cancer Inst [156]

La HR de cada una de estas variables, se uso para construir un marcador o score, de forma que a cada una de estas cuatro variables se les asignaba una puntuación que iba de 0, en el caso más favorable y hasta 3 en los casos más desfavorables (Tabla 5). La puntuación final del índice PEPI resulta de la suma aritmética de los puntos de riesgo obtenidos para cada una de las 4 variables; de forma que los pacientes que obtenían una puntuación final de 0 eran las que tenían mejor pronóstico, probablemente tuvieron un beneficio máximo con el tratamiento hormonal y por tanto no requieren de QT adyuvante. Los autores agruparon las pacientes en 3 grupos (0, 1-3 y > 4 puntos) que mostraron una asociación estadística significativa con el riesgo de recaída en las pacientes del ensayo P024 (10%, 23%, y 48%;  $p < 0,001$ ) y de SECM (2%, 11% y 17%;  $p < 0,001$ ). Los resultados fueron similares con las pacientes del ensayo IMPACT. Recientemente se han publicado los resultados del estudio ACOSOG-Z0131 tras un seguimiento de 5,5 años y su valoración PEPI (98). El 3,7% de las pacientes con PEPI = 0 presentaron recaída frente al 14.4% de las pacientes con PEPI > 0 (HR 0,27; IC 95% 0,09-0,76;  $p = 0,014$ ).

En el estudio CARMINA 02 (85) que comparó LET frente a FUL en HTN, el PEPI score también se mostró como un factor significativo en SLR.

#### **1.7.4 Plataformas Génicas**

Como comentamos en el punto 1.2 de la presente memoria, las plataformas que analizan múltiples genes han conducido a una nueva clasificación pronóstica y predictiva del cáncer. Los tumores con RE positivos son esencialmente de tipo luminal, pero los luminal B tiene peor pronóstico que los luminal A. La plataforma **Prosigna-PAM50®** ha sido validada, en análisis retrospectivos de pacientes incluidas en ensayos clínicos aleatorizados, para

predecir la recurrencia del cáncer de mama tras cirugía.

En el estudio ACOSOG-Z0131 se clasificaron los tumores mediante PAM50 intrínseco. Esta plataforma identificó un 3,3% de pacientes con tumores que no eran luminales y por tanto con pocas posibilidades de respuesta a la HTN. La TR clínicas y de CCM fueron similares entre los tumores de tipo luminal A frente a los luminal B. En cambio entre los tumores luminales A fue más frecuente alcanzar un PEPI score de 0 (el subgrupo de mejor pronóstico) que en los luminal B (27,1% vs 10,7%;  $p = 0,004$ ) (83). Hasta la fecha, no se conoce el papel pronóstico de las plataformas de genes después de HTN. El análisis de estas plataformas como biomarcadores postratamiento hormonal podría mejorar los algoritmos de pronóstico y ayudar a identificar en que pacientes el tratamiento endocrino no es suficiente.

Las demás plataformas comercializadas en España también han sido evaluadas con respecto a su capacidad de predicción de la respuesta a la HTN. El estudio TransNEOS, recientemente publicado demuestra mayor probabilidad de respuesta si  $RS < 18$  vs  $RS > 31$  ( $p < 0,001$ ) (118). Un estudio con Blueprint también ha demostrado su capacidad de recalificar subtipos moleculares y de predecir una tasa de respuestas del 68% a la HTN en los luminal A. Pero ninguna de estas plataformas ha sido estudiada como factor pronóstico tras HTN.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 Hipótesis:

Cada vez es más habitual el uso de tratamientos sistémicos prequirúrgicos o neoadyuvantes en el cáncer de mama. En los casos de carcinoma de mama no luminal tratados con quimioterapia neoadyuvante, la respuesta patológica completa (pCR) es un buen marcador para predecir el pronóstico de cada caso en particular y ayuda en la toma de decisiones sobre tratamientos posteriores. La hormonoterapia neoadyuvante (HTN) es una alternativa terapéutica en el cáncer de mama de tipo luminal estadios II y III. Existen diferentes factores biológicos que predicen la respuesta a la HTN, pero después de la HTN, los únicos factores biológicos que han demostrado una relación con la supervivencia son la desaparición de la expresión del receptor de estrógeno (RE) y la disminución de la proliferación celular medida mediante Ki-67. Ambos biomarcadores, junto a otros dos parámetros anatómicos, como son ypT e ypN, forman el PEPI score que, a día de hoy, es la herramienta de pronóstico más utilizada tras HTN. Por tanto, es importante encontrar otros factores de pronóstico que predigan, de forma más precisa, la evolución posterior de cada caso tratado con HTN.

El análisis de marcadores moleculares en el tumor residual de las pacientes que no alcanzan una pCR tras HTN podría, por un lado, **identificar factores pronóstico de supervivencia específica de cáncer de mama** que definan poblaciones de alto riesgo de recaída a distancia y por otro lado, identificar **mecanismos biológicos de resistencia**. Estos factores serían de gran utilidad en la decisión del tratamiento adyuvante posterior y, servirían de base para iniciar líneas de investigación con tratamientos diferentes a la hormonoterapia, como por ejemplo son los inhibidores de CDK4/6, los

inhibidores de mTOR, los inhibidores PI3K, la QT o la inmunoterapia. Con estos factores pronóstico se podría individualizar las necesidades de tratamiento para cada paciente en concreto en busca de un tratamiento más eficaz.

## **2.2 Objetivos:**

### **Principal:**

1. Análisis de los factores biológicos en el tumor residual tras hormonoterapia neoadyuvante (HTN), que puedan influir de forma significativa en el intervalo libre de recaída a distancia (ILRD).

### **Secundarios:**

1. Identificar nuevos factores de riesgo de recaída a distancia en las pacientes tratadas con HTN que no alcanzaron una pCR.
2. Confirmar el valor del "PEPI score" como factor de pronóstico de ILRD en una serie con un seguimiento medio de 10 años.
3. Determinar el subtipo intrínseco del tumor residual de las pacientes tratadas con HTN y que no alcanzan una pCR.
4. Determinar el valor pronóstico del ROR de PAM50 sobre el tumor residual tras HTN en términos de ILRD.

## **3. POBLACIÓN Y MÉTODOS**



### **3.1 Selección de pacientes y procedimientos empleados**

En 2014 diseñamos un estudio retrospectivo sobre aquellas pacientes postmenopáusicas, diagnosticadas de un cáncer de mama en estadio II a III con RE o RP positivo, que habían sido tratadas con HTN en el Institut Català d'Oncologia (ICO) – Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) durante los años 1997-2009 y de las que disponíamos de muestra de la pieza quirúrgica conservada en parafina.

Inicialmente se seleccionaron 136 pacientes, siendo excluidos 17 casos por los siguientes motivos: tres casos porque alcanzaron pCR (2,2%), cinco por presentar tumor multicéntrico o bilateral (3,6%) y nueve (6,6%) por mala calidad de la muestra parafinada (Figura 15), por lo que finalmente se incluyeron y se analizaron 119 pacientes que correspondían a 3 cohortes diferentes:

- A. Pacientes tratadas con Toremifeno neoadyuvante dentro de un ensayo prospectivo de fase II: 39 casos.
- B. Pacientes tratadas con Exemestano neoadyuvante en otro ensayo prospectivo de Fase II: 24 casos.
- C. Pacientes tratadas en práctica asistencial y fuera de ensayo: 52 casos con Letrozol neoadyuvante y 4 casos con Tamoxifeno neoadyuvante.

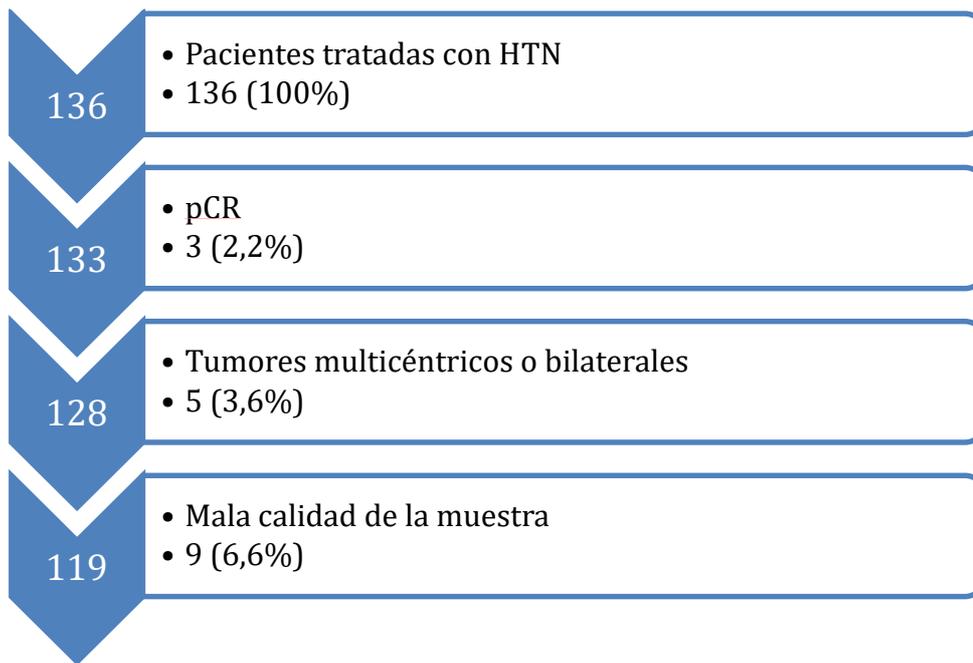


Figura 15: Diagrama de flujo de las pacientes incluidas y excluidas del estudio.

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado, bien del ensayo prospectivo correspondiente o bien de tratamiento hormonal neoadyuvante. En todos los casos se siguió una metodología uniforme, bien por haber participado de un ensayo clínico o bien porque se siguió el protocolo asistencial del centro: Así, durante la HTN, todas las pacientes fueron evaluadas por clínica (inspección y palpación con un calibrador o pie de rey) y radiológicamente (con ecografía y mamografía o resonancia) de forma basal y al menos una vez cada 12 semanas, en la Unidad Funcional de Cáncer de Mama del ICO-HUB. Se usaron los criterios de la OMS en la definición de la respuesta.

Todas las pacientes fueron operadas tras HTN y seguidas posteriormente con una mediana de 112 meses (9,3 años) en el servicio de Oncología Médica del ICO.

Se diseñó una base de datos en donde se han registrado las siguientes

**variables:**

- **En el diagnóstico:** Edad, cTNM, tipo histológico, GH, RE, RP, Ki-67, HER-2 (por IHQ y FISH si ++), tipo de tratamiento hormonal y fecha de inicio de la HTN.
- **Tras la cirugía:** Respuesta clínica; respuesta radiológica; proporción de fibrosis en la pieza quirúrgica, duración de la HTN, fecha de la cirugía, tipo de cirugía, ypTNM, GH, RE, RP, Ki-67, HER-2 de la pieza (por IHQ y FISH si ++).
- **Durante el seguimiento:** Tratamiento adyuvante (QT sí o no, HT sí o no, RTP sí o no), fecha de recaída y lugar (si la hubo); y fecha de último seguimiento o del exitus y causa del exitus si lo hubo.



### **3.2 Muestras biológicas y determinaciones realizadas**

El departamento de Anatomía Patológica del HUB determinó en la biopsia con aguja gruesa (BAG) diagnóstica y/o punción aspiración con aguja fina (PAAF): el GH de Nottingham o el grado nuclear en los casos de PAAF, el % de expresión del RE, del RP, del Ki67 y de HER-2.

Después de la cirugía, las piezas de resección tumoral y la pieza de la linfadenectomía axilar o de la biopsia selectiva del ganglio centinela, fueron examinadas por una patóloga experta en cáncer de mama, para valorar la presencia de enfermedad residual, el tamaño máximo, el GH, la presencia o no de ILV, y los cambios morfológicos atribuibles al tratamiento neoadyuvante en porcentaje de fibrosis sobre el volumen tumoral patológico y el estado ganglionar. Se consideró como pCR a la ausencia de tumor residual invasivo en glándula mamaria y en los ganglios axilares linfáticos (ypT0/is e ypN0). Las pacientes con respuesta completa a la HTP (2,2 % de los casos) fueron excluidas del estudio.

Dado el largo periodo transcurrido desde la cirugía y la elevada edad media de las pacientes al diagnóstico, se solicitó al Comité de Ensayos e Investigación Clínica del HUB, autorización para llevar a cabo el estudio sobre las muestras tumorales sin solicitar consentimiento informado a las pacientes (documento anexo 1). Una vez obtenida esta autorización, en el departamento de Anatomía Patológica del HUB se procedió a seleccionar los bloques parafinados de las muestras de tumor de la pieza quirúrgica para la construcción de un tissue microarray (TMA).

Los pasos para construir el TMA fueron: Primero, selección de un área de tumor invasivo representativa. Segundo, marcaje de la zona tumoral

seleccionada en el bloque de parafina. Tercero, extracción del bloque de parafina seleccionado “donante” de un cilindro de 1 mm de grosor que contenía el tejido de interés previamente marcado. Cuarto, inclusión del cilindro de tejido extraído del bloque “donante” a un bloque “receptor” de forma ordenada y siguiendo una plantilla de inclusión. Quinto, obtención de un bloque receptor que contiene las muestras tumorales. Sexto, se realizaron secciones histológicas y por último se efectuaron estudios posteriores con diferentes marcadores de IHQ. Los TMA permiten el análisis en paralelo de varias muestras de tejido en una sola laminilla: Para cada caso se incorporaron 3-4 cilindros de tejido tumoral de 1 mm de diámetro. Cada array de tejido contenía un total de 23 casos con enfermedad residual. También se incluyeron en el array algunos cilindros de tumores de mama control. Se construyeron un total de 5 TMA. De cada bloque se realizaron secciones de 2- $\mu$ m.

Sobre estos TMA, dos patólogas del ICO-HUB, de forma independiente, midieron **mediante IHQ**, los niveles de **expresión de:**

- En el núcleo de las células tumorales: Porcentaje de positividad de RE, de RP, de RA, de Ki67, de p53, de CD1, de pRB, de p16 y porcentaje e intensidad (0 a 3+) de SOX9.
- En el citoplasma de células tumorales porcentaje de p16 y de sinaptofisina; porcentaje e intensidad (medida de 0 a 3+) de BCL2, de VAV3, de SOX9 y de pS6
- En la membrana de células tumorales se midió en intensidad (de 0 a 3+): HER2 (se efectuaba FISH si la IHQ era 2+) y CD44.
- En el citoplasma y núcleo de células del estroma: Porcentaje de p16 y porcentaje e intensidad de pS6.

Los distintos anticuerpos utilizados en la IHQ se pueden consultar en la tabla 6.

Anticuerpo	Empresa comercial	clona	Referencia	Recuperación	Otros
<b>p16</b>	ventana (Roche)	E6H4	725-4713	Alto	Prediluido
<b>CD44</b>	ABCAM	156-3C11	ab16728	Alto	
<b>CICLINAD1</b>	ventana (Roche)	SP4-R	790-4508	Alto	Prediluido
<b>BCL-2</b>	ventana (Roche)	124	790-4464	Alto	Prediluido
<b>RA</b>	DAKO (AGILENT)	AR441	M3562	Alto	DIL 1/100
<b>p53</b>	DAKO (AGILENT)	DO-7	GA616	Alto	Prediluido
<b>SINAPTOFIS.</b>	DAKO (AGILENT)	DAK-SYNAP	1R660	Alto	Prediluido
<b>RB</b>	BD PHARMINGEN	G3-245	554136	Alto	DIL 1/500
<b>SOX9</b>	ABCAM	ChIP-Grade	Ab3697	Citrato pH6	DIL 1/1000
<b>VAV3</b>	ABCAM	EP1130Y	579-3	Citrato pH6	DIL 1/70
<b>pS6</b>	CELL SIGNALING	21B2	48575	Citrato pH6	DIL 1:250
<b>RE</b>	DAKO (AGILENT)	EP1	GA084	Alto	Prediluido
<b>RP</b>	DAKO (AGILENT)	1294	GA090	Alto	Prediluido
<b>Ki-67</b>	DAKO (AGILENT)	MIB1	GC202	Bajo	Prediluido
<b>HER2</b>	DAKO (AGILENT)	HERCEPTEST	SK001		Prediluido

*Tabla 6: Anticuerpos utilizados en el análisis IHQ*

Se analizó la tasa de cambio en RE, RP, Ki-67 y HER-2 entre la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica.

Se calculó el **PEPI score** y se analizó el valor pronóstico de este marcador con respecto a ILRD.

Por último, en el Laboratorio de Genómica Traslacional del Hospital Clinic de Barcelona se llevó a cabo el **análisis de secuenciación génica** mediante el sistema nCounter de Nanostring, que es una prueba cuantitativa in vitro, que mide los niveles de expresión génica de ARN extraído de tejido tumoral. El proceso de realización se dividió en varios pasos: Primero, las patólogas del HUB marcaron con un círculo la región tumoral viable en el portaobjetos con

H&E, excluyendo el tejido no tumoral circundante y calcularon el porcentaje de celularidad tumoral en el área que se encuentra dentro del círculo (tabla 7).

<b>Celularidad tumoral</b>	<b>N (%)</b>
<b>90-80%</b>	38 (33)
<b>70-60%</b>	41 (36)
<b>50%</b>	8 (7)
<b>40-30%</b>	17 (15)
<b>20-15 %</b>	10 (9)
<b>Total</b>	114 (100)

*Tabla 7: Porcentaje de celularidad tumoral en las muestras analizadas por PAM50*

Para considerar válido el análisis, el porcentaje de celularidad del tumor debía ser > 10 % y el área de la superficie tumoral marcada con el círculo > 4 mm<sup>2</sup>. Tercero, se aisló el ARN a partir de las muestras de tejido tumoral. Cuarto, se provocó la reacción de hibridación de las muestras. Quinto se procesaron y analizaron las muestras en la estación nCounter®. Esta tecnología se basa en que para cada gen se crean sondas marcadas con códigos de barras fluorescentes que se hibridan directamente con la muestra de mARN en solución. Primeramente, las sondas de ADN se hibridan directamente con una región de 70-100 pares de bases de la muestra de ARN en solución. La sonda de marcación fluorescente consiste en una secuencia de 35-50 sondas básicas complementarias del blanco de mARN y una única secuencia de esqueleto de ADN que se hibrida con seis segmentos de ARN etiquetados con una de las cuatro tinturas fluorescentes: roja, amarilla, azul o verde. Los segmentos fluorescentes crean un "código de color" fluorescente

único para cada blanco, de seis posiciones y cuatro colores. Una sonda de captura independiente está formada por una secuencia de pares básicos complementaria del blanco de mRNA y biotina, que se usa para la inmovilización en un portaobjetos con una capa de estreptavidina. Después de la hibridación a +65°C, todos los pasos de purificación de la muestra están automatizados en la estación de preparación nCounter®. Esta tecnología tiene la ventaja que no requiere ninguna amplificación o reacción enzimática, siendo un proceso prácticamente todo automatizado (figura 16). En el proceso de purificación, en primer lugar, se eliminan las sondas de captura y marcación sobrantes mediante esferas magnéticas con pasos sucesivos de captura, seguidos de la vinculación de los complejos sonda-blanco con ubicaciones aleatorias en la superficie del cartucho nCounter. Finalmente, los complejos sonda/blanco se alinean e inmovilizan en el cartucho nCounter.

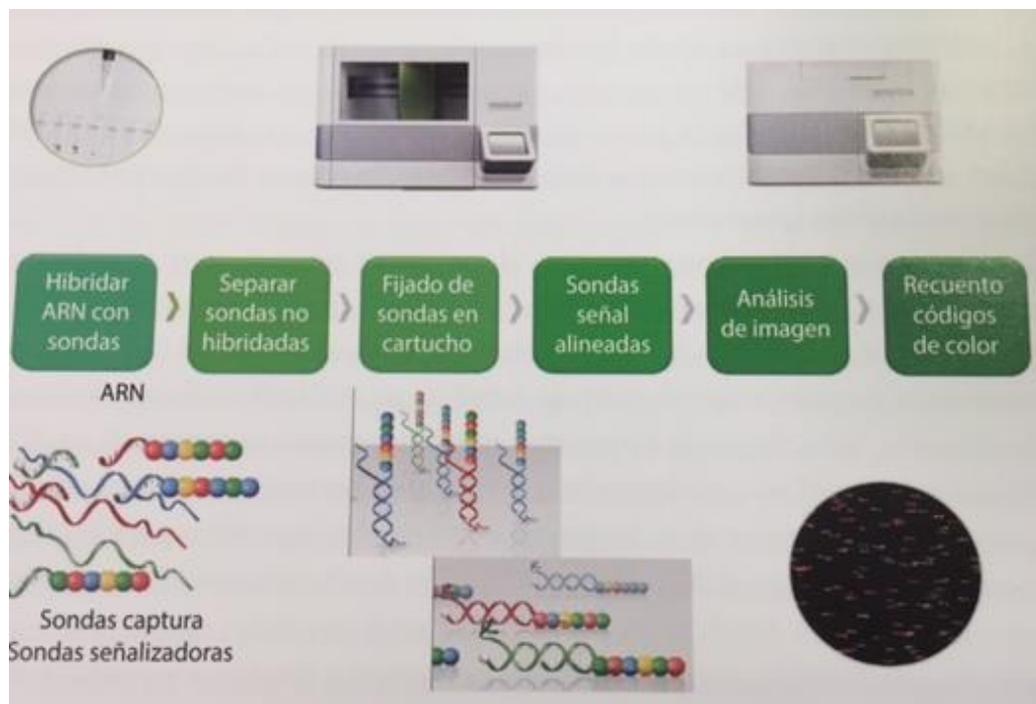


Figura 16: Proceso de análisis con el método nCounter®

Una vez completado el procesamiento de las muestras, los cartuchos se colocan en el analizador digital nCounter® para la recogida de datos. Cada molécula blanco de interés se identifica mediante el "código de color" generado por los seis puntos fluorescentes ordenados presentes en su sonda de marcación asociada. En ese momento se cuentan y tabulan las sondas de marcación de la superficie del cartucho correspondientes a cada molécula blanco y se procesan con el algoritmo. Los datos obtenidos en base logarítmica 2, se transforman y normalizan utilizando los 5 genes de referencia (ACTB, MRPL19, PSMC4, RPLP0 y SF3A1) con el objetivo de identificar y eliminar variaciones sistemáticas, desviaciones con respecto al ideal. De esta forma, se pretende asegurar que las diferencias en el análisis posterior sean debidas realmente a expresión génica diferencial y no a problemas técnicos.

Para este estudio, se ha realizado análisis de expresión de 60 genes (50 genes del PAM50, 5 genes adicionales y 5 genes de referencia para normalizar) de las muestras parafinadas con suficiente tumor residual, de pacientes que no alcanzaron una pCR.

- Los 50 genes de la firma PAM50 se usaron para clasificar en los cinco tumores en subtipos intrínsecos de CM (luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, Basal y Normal).
- 5 genes adicionales que evalúan:
  - RA
  - Respuesta Inmune (CD8A, PDL1, PD1 y CD4)

Además se evaluó el PAM50 de riesgo de recurrencia (ROR), como variable continua categorizada según los puntos de corte publicados previamente del ROR-S y del ROR-P (158) (159).

### **3.3 Análisis estadístico**

El presente estudio es un análisis de una serie retrospectiva de casos consecutivos. El cálculo del tamaño muestral no está basado en ningún test estadístico, sino en el número de pacientes consecutivos que cumplían los criterios del estudio entre octubre de 1997 y Junio de 2009.

La descripción de las variables categóricas o dicotómicas se ha realizado con el cálculo de las frecuencias absolutas y relativas con un intervalo de confianza del 95%. Las variables continuas se describen mediante el cálculo de un valor central, media o mediana, rango de valores e intervalo de confianza del 95% correspondiente.

Para el análisis de estimación de supervivencia se ha utilizado el método de Kaplan y Meier y el intervalo de confianza al 95% correspondiente.

Se analizó el valor pronóstico de cada variable predefinida con respecto al intervalo libre de recaída a distancia (ILRD). Para evaluar la asociación estadística entre las diferentes variables categóricas estudiadas y el ILRD, se ha usado el método de Chi-cuadrado de Pearson o Log Rank (Mantel-Cox), en un análisis univariado.

Se utilizó el modelo de regresión de probabilidad proporcional multivariable de regresión de Cox para evaluar la independencia de cada variable en términos de tiempo a la progresión a distancia o ILRD.

El ILRD fue el tiempo transcurrido desde el tratamiento local definitivo, en este caso la cirugía, hasta la aparición del evento metástasis a distancia o la muerte por cáncer de mama o por toxicidad, censurando la muerte por otra causa. Por tanto, para el análisis de ILRD realizado se consideraron los siguientes eventos clínicos:

- Recaída a distancia de la enfermedad neoplásica. La recaída a nivel local o axilar de cáncer de mama o la enfermedad neoplásica en mama contralateral sin enfermedad a distancia no fueron consideradas (5 casos).
- Fallecimiento de la paciente por causa del cáncer de mama o del tratamiento para el cáncer.

La SG se calculó como el tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía por cáncer de mama hasta muerte por cualquier causa o fecha del último contacto en caso de pérdida de seguimiento.

La SECM se calculó como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de muerte por cáncer de mama. Los pacientes que murieron por causas no relacionadas con el cáncer de mama o su tratamiento no se incluyeron para esta medición.

El Intervalo libre de recaída (ILR): tiempo transcurrido desde la cirugía, hasta la aparición del evento recidiva de enfermedad local o recidiva de enfermedad a distancia.

La Supervivencia Relativa por Cáncer de Mama (SRCM) se usa como una medida del aumento de riesgo de mortalidad en cohortes de pacientes diagnosticadas de cáncer, teniendo en cuenta la mortalidad general (muertes por cualquier causa) de la población de referencia. Se calcula mediante el cociente entre la supervivencia absoluta observada y la supervivencia esperada de la cohorte en función de la mortalidad de la población general a la que pertenecen. Llevamos a cabo el cálculo de la SRCM de nuestra serie mediante WebSurvCa (160)

Todo este análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS y

código abierto R 2.15.1.

### **3.4 Aspectos éticos**

Se solicitó y obtuvo la aprobación del Comité Ético y de Investigación Clínica del HUB para llevar a cabo el estudio (anexo I).

La base de datos diseñada y obtenida está anonimizada, cumple la normativa legal vigente y ha sido explotada con la colaboración de Xavier Pérez estadístico de la Unidad de Investigación Clínica del ICO.

Las horas de técnico de AP y el material fungible del proyecto se ha financiado con fondos obtenidos de donaciones IDIBELL. El resto han sido colaboraciones inestimables y no remuneradas por parte de investigadores del ICO, HUB, IDIBELL y Hospital Clinic de Barcelona.

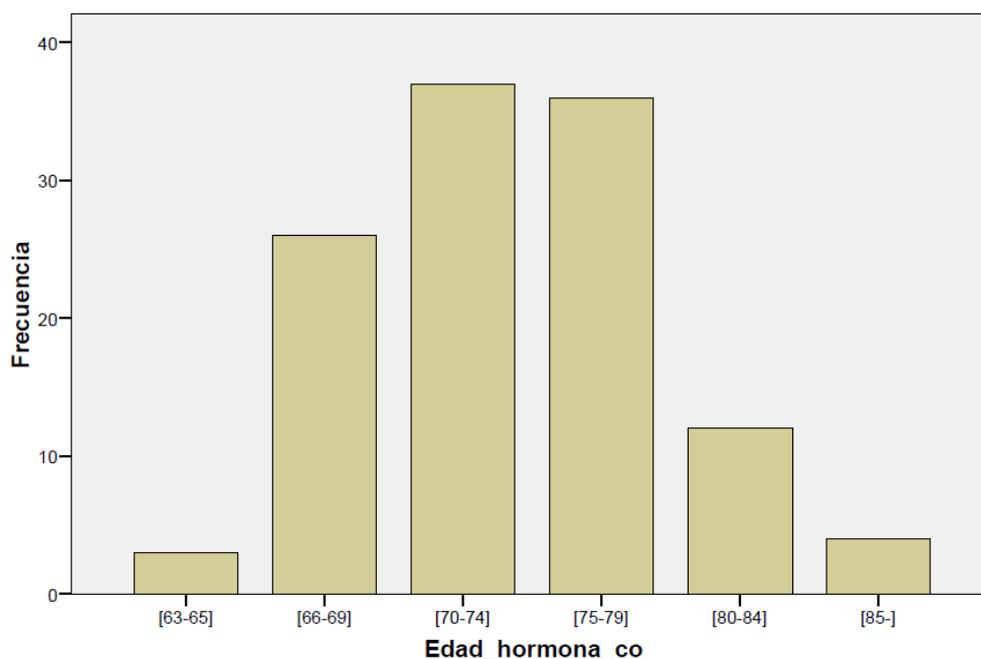
## **4. RESULTADOS**



#### 4.1 Características clínico-patológicas de las pacientes y sus tumores

Entre los años 1997 y 2009 registramos 136 pacientes que habían sido tratadas con HTN en el ICO-HUB. Tres pacientes (2,2) presentaron pCR, cinco pacientes (3,6%) presentaban tumores multicéntricos o bilaterales y en nueve casos (6,6%) el material patológico no fue viable para el presente estudio, por lo que finalmente analizamos **119 pacientes** postmenopáusicas con tumor residual tras HTN.

**La mediana de edad era de 74 años**, con una media de 73,9 y un rango de 63 a 88 años. En la figura 17 está representada la distribución porcentual de las pacientes según la edad.



*Figura 17: Distribución porcentual de pacientes por fracciones de edad*

El tamaño y valoración clínico-radiológica al diagnóstico de los tumores de estas 119 pacientes están resumidos en la tabla 8.

Variable	n%
cT1	4 (3,4)
cT2	55 (46,2)
cT3	8 (6,7)
cT4	52 (43,7)
cN0	70 (58,8)
cN1	30 (25,2)
cN2	17 (14,3)
cN3	2 (1,7)
Estadio I	1 (0,8)
Estadio IIA	40 (33,6)
Estadio IIB	18 (15,1)
Estadio IIIA	7 (5,9)
Estadio IIIB	50 (42,3)
Estadio IIIC	2 (1,6)

TABLA 8: Tamaño Tumoral, Estado Ganglionar y Estadio al diagnóstico.

En total eran **60** pacientes con **estadio III**, **58** estadio II y un estadio I (figura 18)

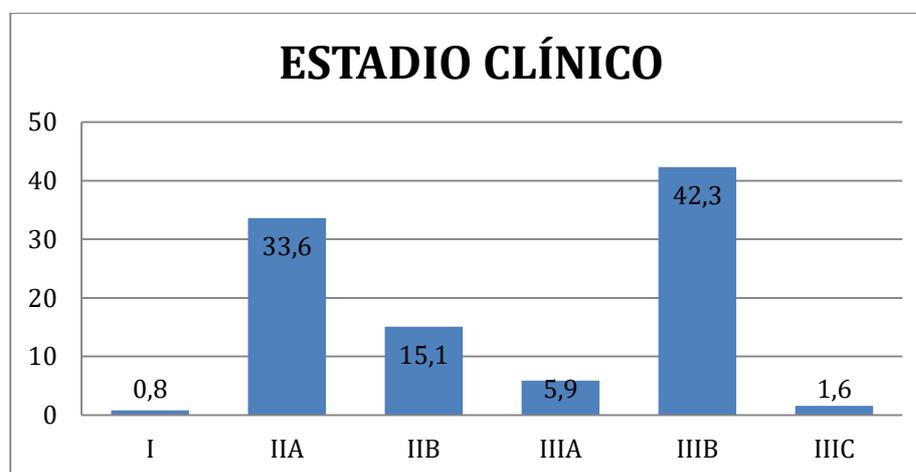


Figura 18: Distribución porcentual de los tumores por estadios

El tipo histológico más común fue el carcinoma ductal infiltrante (84%) seguido del lobulillar (9%). Ver tabla 9

Tipo Histológico	N (%)
Ductal	100 (84)
Lobulillar	11 (9,2)
Mucinoso	2 (1,6)
Micropapilar	2 (1,6)
Neuroendocrino	2 (1,6)
Otros	2 (1,6)

Tabla 9: Tipos Histológicos



Figura 19: Grado Histológico por BAG diagnóstica

El **Grado histológico** en la BAG o PAAF diagnóstica fue de grado 3 en el 19,3% de los casos, grado 2 en el 55,4% y grado 1 en el 25,2% (figura 19); mientras que en la pieza quirúrgica fue grado 3 en el 25,2%, grado 2 en el 54,6% y grado 1 en el 20,2% (figura 20), revelando un leve aumento no significativo en el grado histológico entre la biopsia inicial a la de la pieza quirúrgica practicada después de la HTN (tabla 10).



*Figura 21: Grado histológico en la pieza de tumor tras HTN*

Grado Histológico:	Basal n (%)	Cirugía n (%)
Grado 1	30 (25,2)	24 (20,2)
Grado 2	66 (55,4)	65 (54,6)
Grado 3	23 (19,3)	30 (25,2)

*Tabla 10: Grado histológico*

En cuanto al estado de los **receptores hormonales** en la BAG o PAAF diagnóstica: 2 casos eran RE (-) y RP + (1,7%); 17 presentaban RE + y RP (-) (15%) y en 91 casos ambos receptores eran positivos (82,7%) (Figura 21)

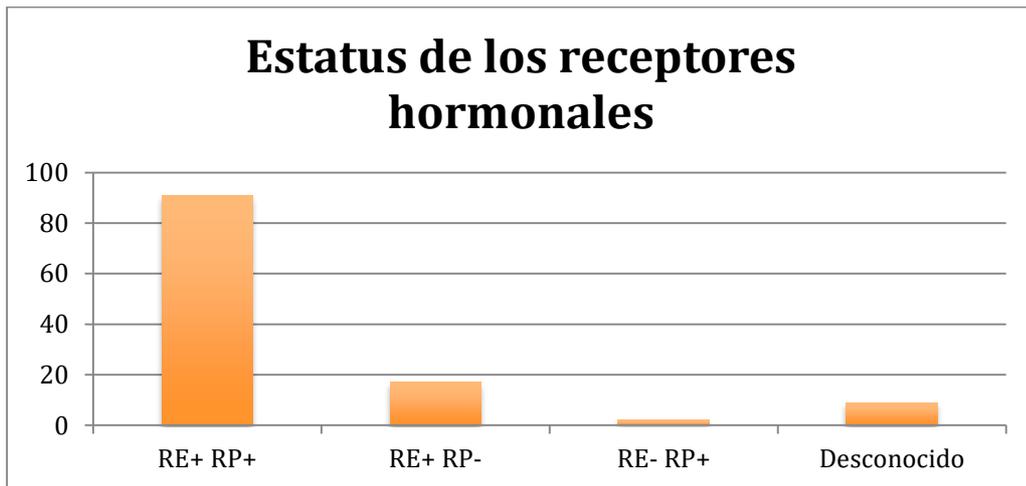


Figura 21: Distribución en % de los tumores según estado de RE y RP al diagnóstico

El 93% de las pacientes presentaban expresión de RE en  $\geq 80\%$  de las células tumorales (figura 22)

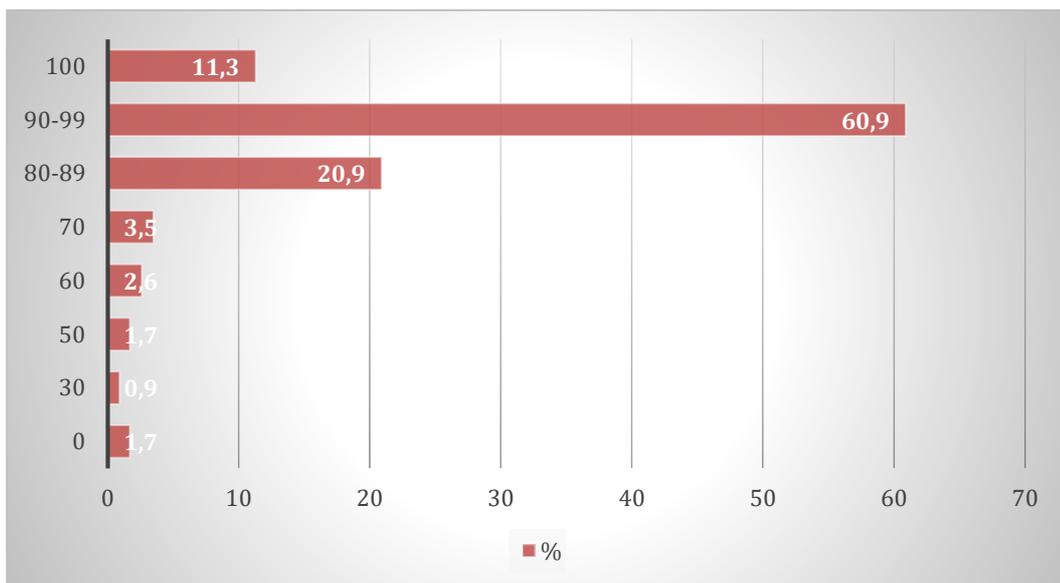


Figura 22: Distribución en % de expresión de RE

En cuanto a los RP la distribución de la intensidad era mucho menos homogénea: un 50% de los casos expresaban RP en  $\leq$  del 50% de las células tumorales y en un 14,5% eran negativos. (Figura 23)

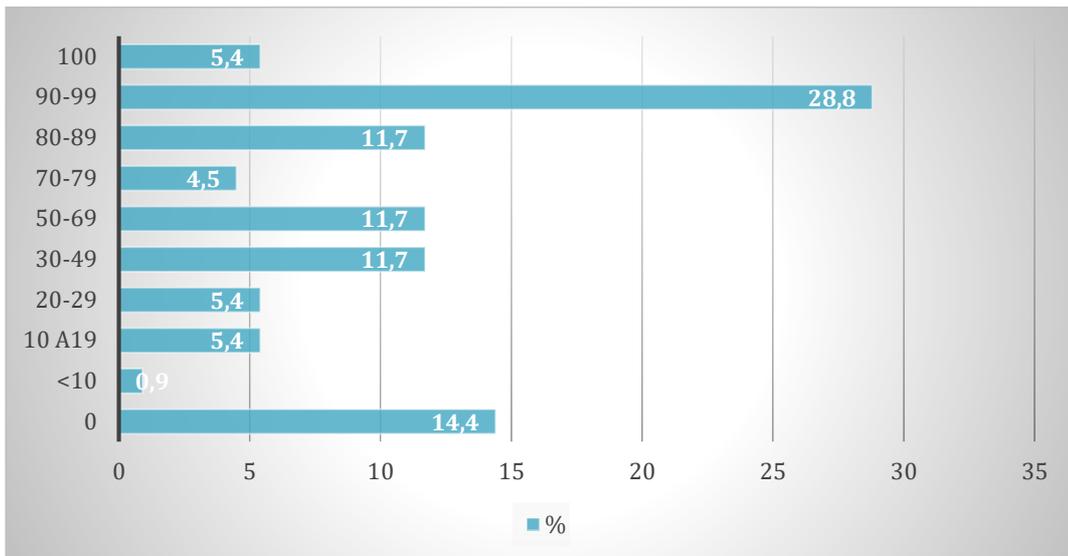


Figura 23: Distribución en porcentaje por nivel de expresión de RP

Solo tres casos (2,5%) presentan sobreexpresión +++ de HER2, ninguno de los ocho casos con expresión HER2 ++ mostraron amplificación en el FISH.

El **Ki67** mediano al diagnóstico fue de 10 (1-80). La distribución porcentual queda reflejada en la figura 24.

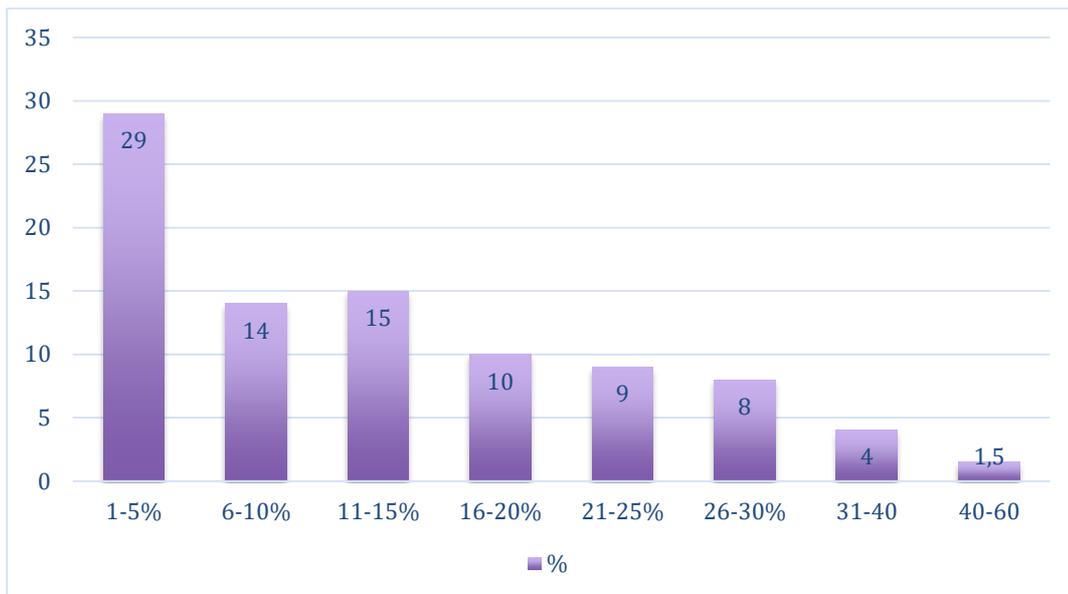


Figura 24: Distribución porcentual del Ki67 basal por tramos

Atendiendo a la presencia de uno de los siguientes criterios: GH 3, RP < a 20% o Ki67  $\leq$  20 en la BAG diagn3stica los tumores podrían haber sido clasificados como 69% Luminal A-like; 23% como Luminal B-like y 8% como no clasificables.

## 4.2 Tipo y duración de HTN

En la tabla 11 y figura 25 se recogen el tipo de HTN prescrita. El 64% de las pacientes fueron tratadas con IA y el 36% con un SERM.

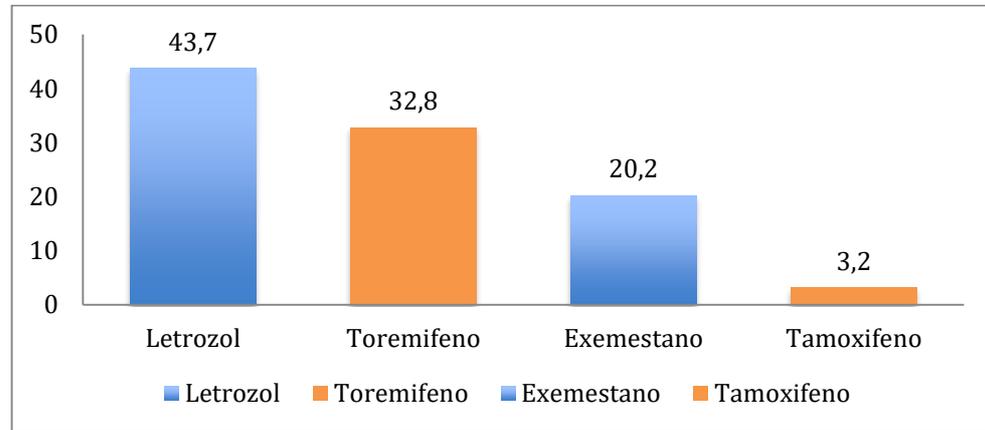


Figura 25: Tipo de HTN administrado

Tipo HTN	n (%)
Toremifeno	39 (32,8)
Tamoxifeno	4 (3,2)
Letrozol	52 (43,7)
Exemestano	24 (20,2)

Tabla 11: Tipo de Hormonoterapia Neoadyuvante prescrita

La duración mediana de la HTN fue de 8.5 meses, media de 10,87 (4-34).

### 4.3 Respuesta clínica al tratamiento primario

La TR valorada mediante calibrador fue de 58%, estabilización 37% y progresión en el 4%. La TR radiológica fue del 52% con estabilización en el 31% y progresión en el 3,5%. (Tabla 12)

Respuesta por Caliper	n (%)	Respuesta Radiológica	n (%)
Completa	4 (3,4)	Completa	2 (1,7)
Parcial	65 (54,6)	Parcial	60 (50,4)
E.Estable	43 (36,1)	E.Estable	41 (31,1)
Progresión	5 (4,2)	Progresión	4 (3,4)
Desconocido	2 (1,7)	Desconocido	4 (3,4)

Tabla 12: Valoración de la respuesta clínica y radiológica según criterios de la OMS

#### 4.4 Tipo de cirugía

En 88 (73%) casos se practicó CCM (85 tumorectomía y 3 cuadrantectomías) y en 31 (27%) casos se practicó una mastectomía (figura 26).

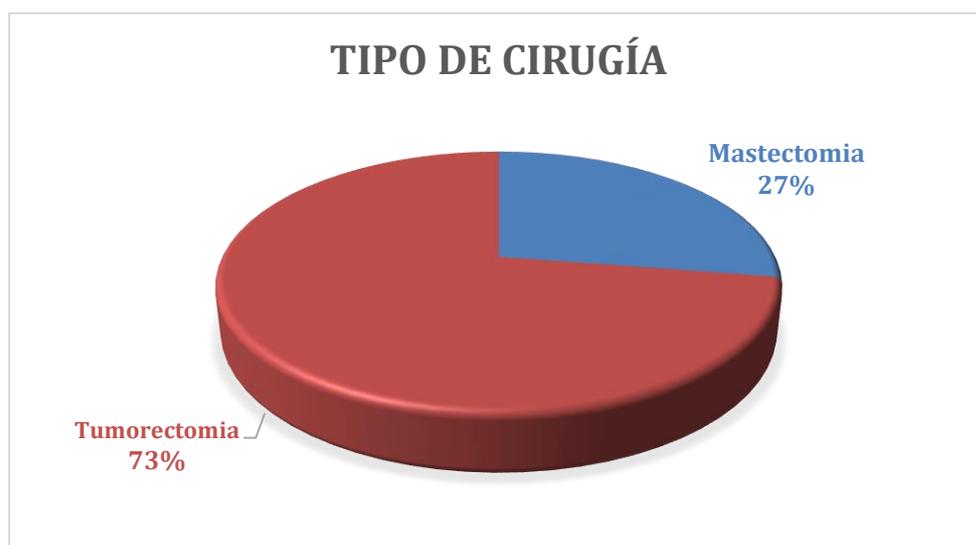


Figura 26: Tipo de cirugía practicada en la mama

En cuanto a la cirugía sobre la axila se practicaron 84 **linfadenectomías (70,6%)** 7 biopsias selectivas de ganglio centinela (6%) y en 28 casos cN0, no se practicó ningún tipo de cirugía axilar (23,4%). (Tabla 13)

Tipo de cirugía en axila:	
Linfadenectomía	84 (70,6)
Ganglio Centinela	7 (5,9)
Ninguna	28 (23,5)

Tabla 13: Tipo de cirugía practicada en la axila

#### 4.5 Valoración patológica después de HTN y cirugía

En la tabla 14 se recoge la distribución numérica y porcentual del ypT del ypN.

ypT1	43 (36,1)
ypT2	64 (53,8)
ypT3	7 (5,9)
ypT4	5 (4,2)
ypNX	28 (23,5)
ypN0	34 (28,6)
ypN1	27 (22,7)
ypN2	16 (13,4)
ypN3	14 (11,8)

Tabla 14: Distribución de la valoración patológica tras HTN (ypTN) numérica y porcentual

La tabla 15 recoge la estadificación según **ypTNM**. En comparación con la estadificación cTNM previa a la HTN, destaca la disminución de estadios III que pasan a ser de un 60% a un 31% y el aumento de estadios I que pasan del 0,8% al 21%.

Estadio post HTN	n (%)
Estadio IA	25 (20,9)
Estadio IIA	44 (37)
Estadio IIB	15 (12,6)
Estadio IIIA	17 (14,3)
Estadio IIIB	6 (5)
Estadio IIIC	14 (11,7)

Tabla 15: Estadio según ypTNM

El patólogo reportó **ILV** en 18 casos (15%) y afectación focal de los márgenes quirúrgicos en 13 casos (11%). Tabla 16

Otros Factores AP	n (%)
Invasión Linfovascular: Si	18 (15,1)
Invasión Linfovascular: No	98 (82,4)
Invasión Linfovascular: Desconocido	3 (2,5)
Márgenes quirúrgicos: Libres (>2mm)	103 (86,6)
Márgenes: Afectado (< 1mm)	13 (10,9)
Márgenes: 1-2mm	2 (1,7)
Márgenes: Desconocido	1 (0,8)

Tabla 16: Otros Factores Anatomo-patológicos

Después de la HTN, 3 tumores seguían presentando sobreexpresión +++ de HER 2 (2,5%).

La mediana de **fibrosis** valorada por las patólogas fue del 20%, media de 26,2% (0-98%). La distribución porcentual queda reflejada en la figura 27

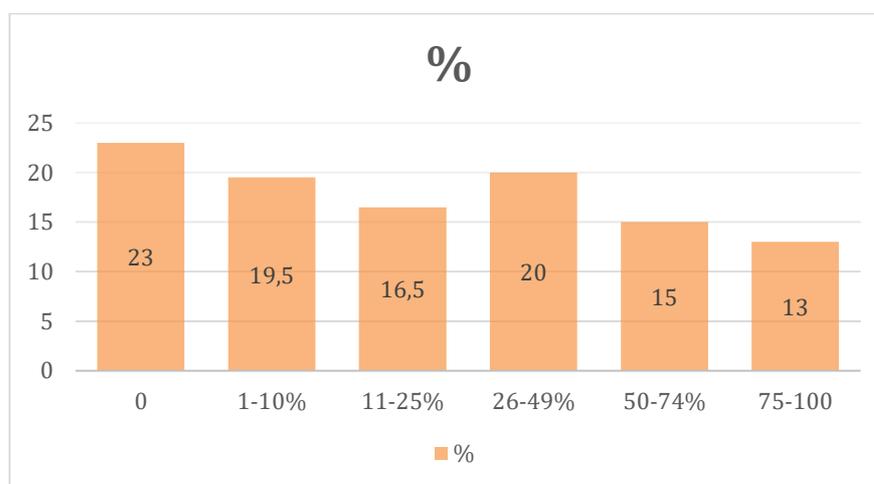


Figura 27: Distribución porcentual de la fibrosis postquirúrgica por tramos

Por medio de un TMA, se analizaron los RE, RP y Ki-67 en la pieza quirúrgica y comparamos estos resultados con los de la biopsia basal.

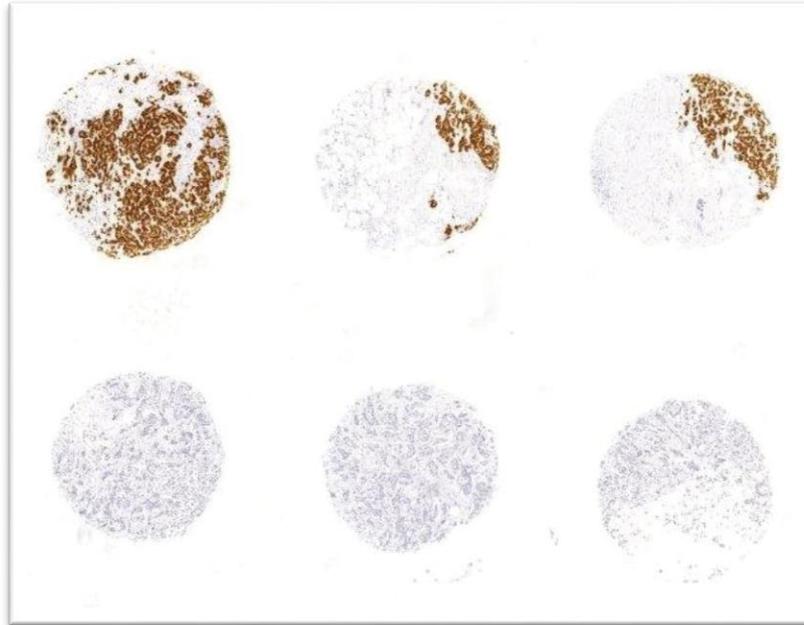


Figura 28: Tinción de RE en TMA

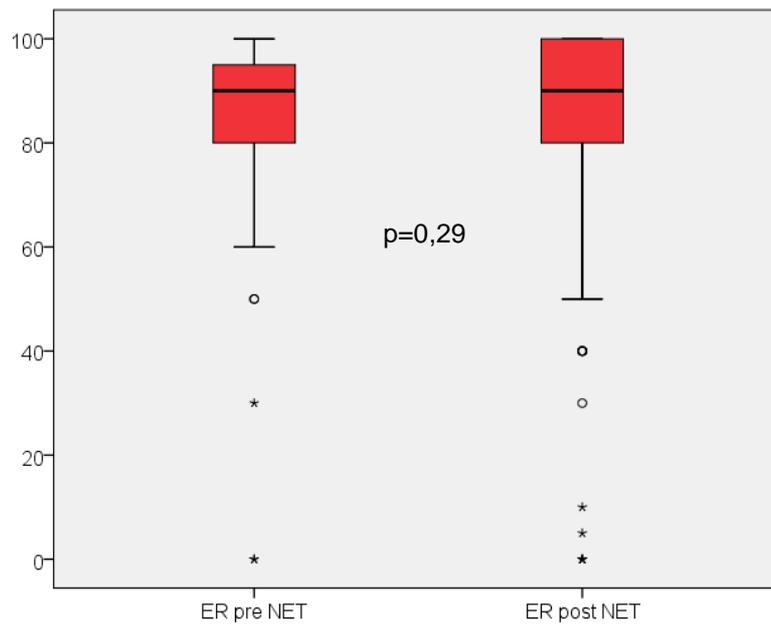
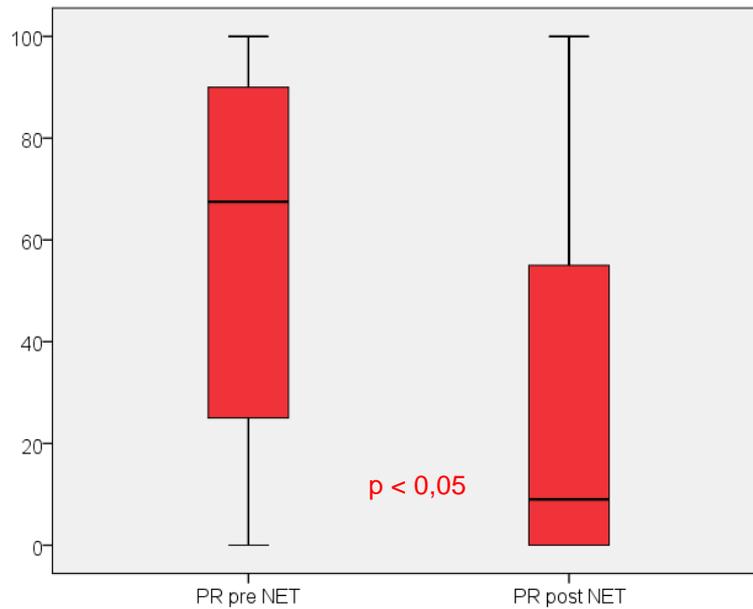
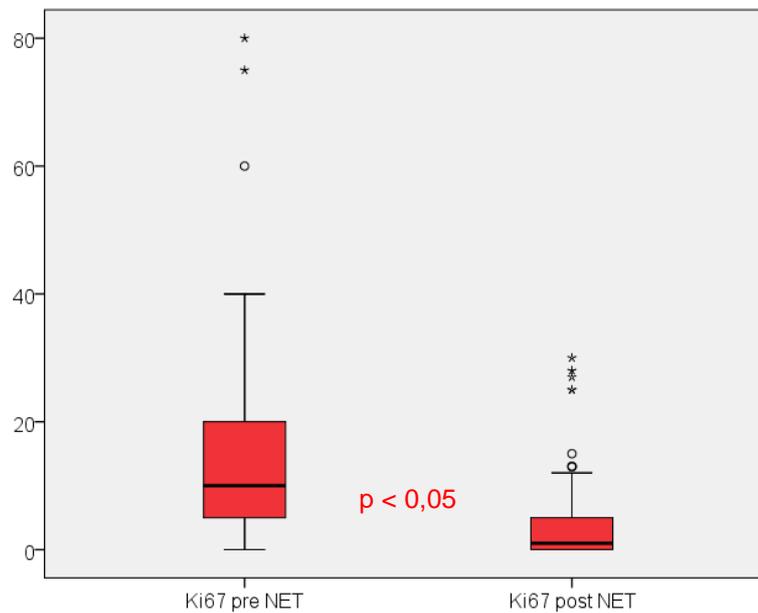


Figura 29: % de RE positivos en muestras pre y post HTN



*Figura 30: %RP positivos en muestras pre y post HTN*



*Figura 31: % Ki67 en muestras pre y post HTN*

**El análisis de RP y de Ki-67 pre y post HTN** mostró un descenso estadísticamente significativo tras HTN. En cambio, no hubo diferencias en el nivel de positividad de los RE pre y post HTN (figuras 29 a 31).

El **PEPI score** de nuestra serie queda reflejado en la tabla 17.

<b>PEPI</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>0</b>	50	42
<b>1-2</b>	2	1,7
<b>3</b>	44	37
<b>4-6</b>	21	17,6
<b>&gt;6</b>	2	1,7
<b>Total</b>	119	100

*Tabla 17: Resultado PEPI score de la serie*

#### 4.6 Tratamiento postquirúrgico (adyuvante).

Todas las pacientes con cirugía conservadora (84 casos) recibieron RTP sobre la glándula mamaria y todos los casos pT3, pT4 o pN2-3 (42 casos) recibieron RTP sobre pared y cadenas ganglionares. Únicamente 28 pacientes (23,5%) no recibieron RTP. Recibieron tratamiento hormonal adyuvante 113 casos (95%) durante una mediana de 52 meses (11-105). Solo 7 pacientes (5,8%) recibieron QT adyuvante. (Tabla 18)

<b>Tratamiento Adyuvante</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Letrozol</b>	52	43,7
<b>Exemestano</b>	23	19,3
<b>Toremifeno</b>	31	26
<b>Tamoxifeno</b>	7	5,9
<b>Quimioterapia</b>	7	5,9

*Tabla 18: Tratamiento sistémico adyuvante administrados*

## 4.7 Análisis de Supervivencia

Con un seguimiento medio de 112 meses tras la cirugía (9,3 años), 31 pacientes presentaron recaída, 26 de ellas a distancia (en dos de ellas, además hubo recaída loco-regional), 3 pacientes presentaron solo una recaída local y 2 casos recaída ganglionar. Por tanto, solo el 21,8% de las pacientes desarrollaron recaída a distancia y el **74% de las pacientes estaban libres de recaída a 10 años.** (figura 32). No se alcanzó la mediana del ILRD ni de ILR. La media del ILR desde el momento de la cirugía fue 180 meses (IC 95%: 162-197,6) y la media del ILRD fue de 189,25 meses (IC 95%: 172,35-206,15)

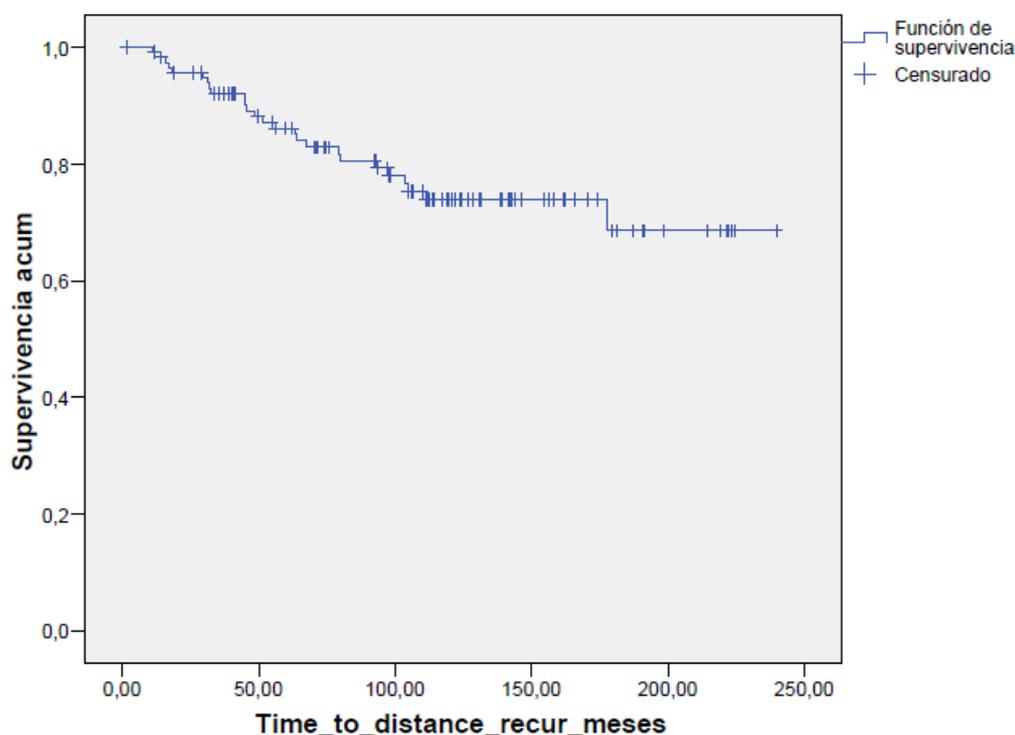


Figura 32: Curva del Intervalo Libre de Recaída a Distancia en meses

Se observaron 73 muertes: 49 (41,2%) sin cáncer y 24 (20,2%) por cáncer (tabla 19).

Estado en el último control,	n (%)
Muerta por cancer	24 (20.2%)
Muerta por otra causa	49 (41.2%)
Perdida de seguimiento	7 (5.9%)
VCE	1 (0.8%)
VSE	38 (31.9%)

Tabla 19: Estado de la paciente en último control

La SG media desde el momento de la cirugía fue de 127 meses (IC 95% 101-152) es decir 10,6 años, la media fue de 111,7 meses. (figura 33)

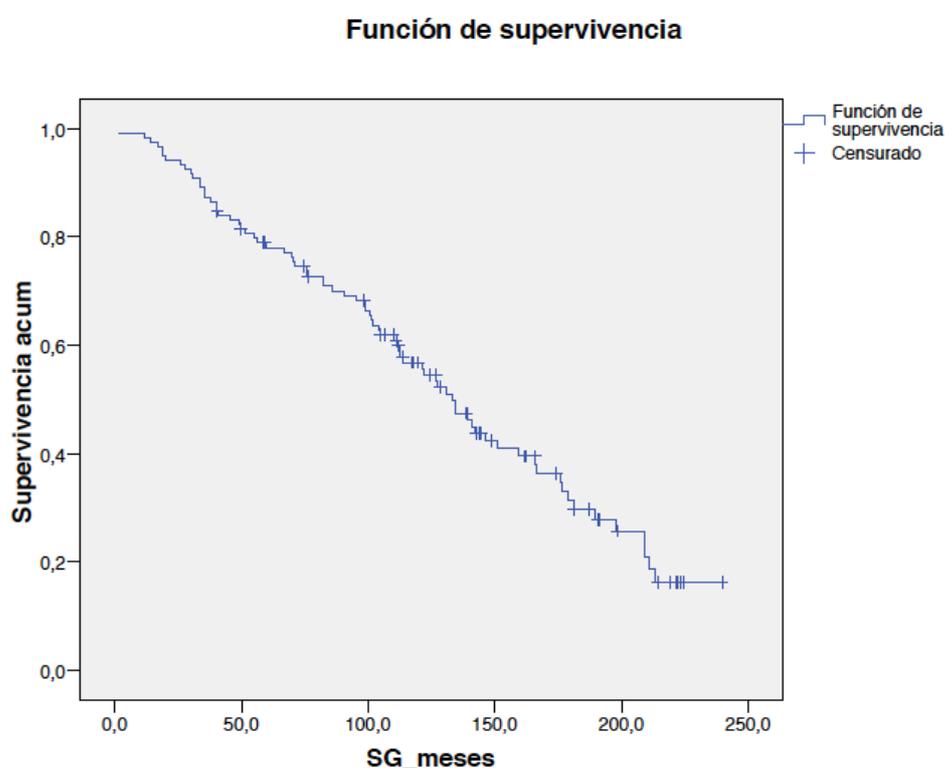


Figura 33: Supervivencia Global en meses

Hay que tener en cuenta que, en el momento de la cirugía, la edad mediana era de 74 años, por lo que también hemos calculado la SECM (figura 34) y la SRCM a 5 años global (figura 35) y por estadios (figura 36).

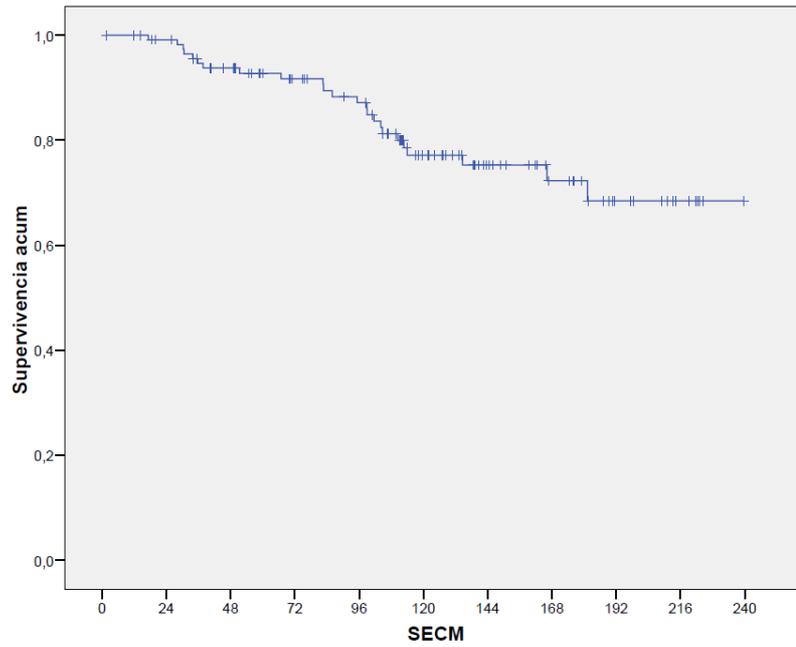


Figura 34: Curvas de Supervivencia específica por Cáncer de mama

La SG observada a los 5 años fue del 78,7% (71,6-86,5) y la SRCM fue de 91% (82,4-100,53)

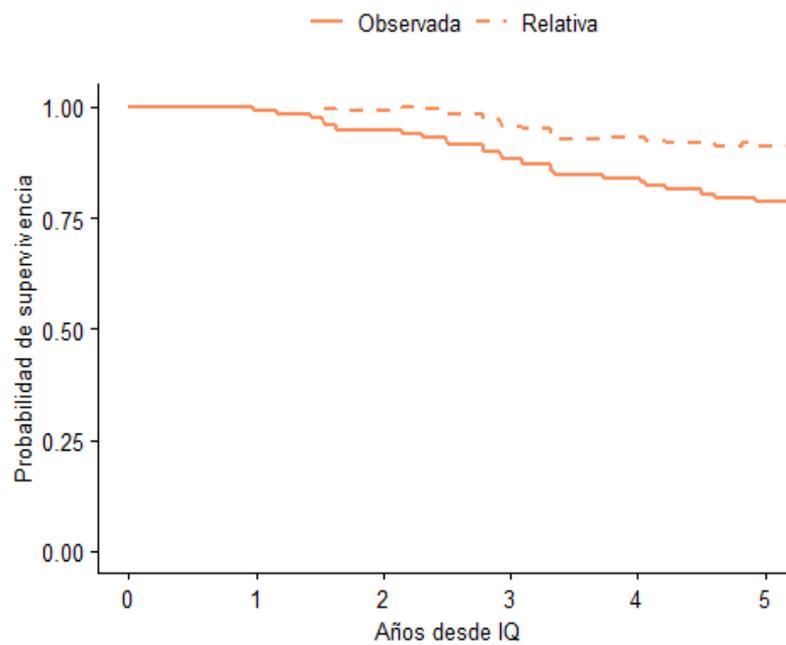


Figura 35: Curvas de Supervivencia observada y relativa

Para el estadio II, la SG observada a los 5 años fue del 83,1% (74,0-93,2) y la SRCM de 94,8% (84,2-106,77). Para el estadio III, la SG observada a los 5 años, fue del 74,2% (63,8-86,4) y la SRCM fue de 85,8% (73,0-100,77).

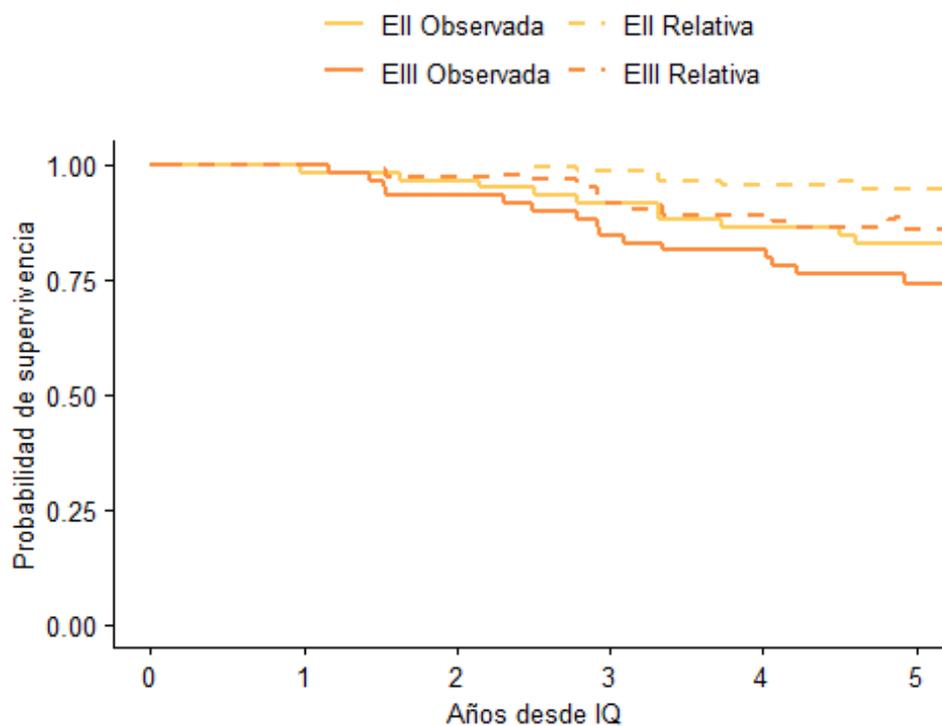


Figura 36: Curvas de Supervivencia observada y relativa según estadio tumoral.

#### **4.8 Análisis univariante de Factores de Pronóstico clínicos y biológicos determinados por IHQ.**

Se utilizó el método de Chi-cuadrado de Pearson o Log Rank (Mantel-Cox) test para llevar a cabo un análisis univariante de la asociación estadística **entre ILRD y las siguientes variables al diagnóstico:** edad, estadio, tamaño clínico, estado de la axila, GH, RE, RP, Ki-67. Entre ILRD y las siguientes **variables después de la HTP:** respuesta, progresión, tipo de cirugía, el estado patológico de la axila, ILV, GH, RE en el tumor residual, RP en el tumor residual, RA, Ki-67 en el tumor residual, diferencias entre Ki-67 basal y post HTN, PEPI score, CD1, pRB, p16 negativa, p53 mutada, BCL-2, pS6 en citoplasma de la célula tumoral y en el de la célula estromal, SOX 9, VAV3, sinaptofisina y CD44.

Se observó que las **variables con significación estadística** de peor ILRD fueron: **Estadio Clínico III** con HR 2,29 (IC95%: 1,02-5,13)  $p=0,03$ ; **GH 3 al diagnóstico** con HR 2,65 (IC95%: 1,22-5,8)  $p=0,012$ ; **cN1-2** con HR 2,66 (IC95%: 1,21-5,86)  $p=0,012$ ; **RP al diagnóstico  $\leq 50\%$**  con HR 2,49 (IC95%: 1,1-5,62)  $p=0,024$ ; **Mastectomía** vs cirugía conservadora con HR 19,9 (IC95%: 3,86-103,1)  $p < 0,001$ ; **RE en el tumor residual  $\leq 50\%$**  con HR 2,99 (IC95%: 1,12-8,01)  $p=0,025$ ; **ypN1-2** con HR 3,4 (IC95%: 1,43-8,09)  $p=0,003$ ; **ILV** con HR 2,75 (IC95%: 1,19-6,36)  $p=0,014$ ; **GH 3 en el tumor residual tras HTN** con HR 2,65 (IC95%: 1,22-5,8)  $p=0,014$ ; **PEPI score  $\geq 3$**  con HR 3,69 (IC95%: 1,26-10,78)  $p=0,004$ ; **16 negativa** en el núcleo con HR 4,73 (IC95%: 1,42-15,75)  $p=0,005$ ; **p53 mutada** con HR 2,88 (IC95%: 1,12-7,37)  $p=0,026$ ; **BCL-2  $\leq 50\%$**  en el tumor residual con HR 2,79 (IC95%: 1,24-6,25)  $p=0,05$ ; **pS6 negativo en citoplasma de la célula tumoral** con HR 2,61 (IC95%: 1,19-

5,75)  $p=0,013$  y  $pS6 < 25\%$  en el citoplasma de la célula estromal con HR=  
2,61 (IC95%: 2,61-5,75)  $p= 0,05$ ). Ver figuras 37-51 y tabla 20

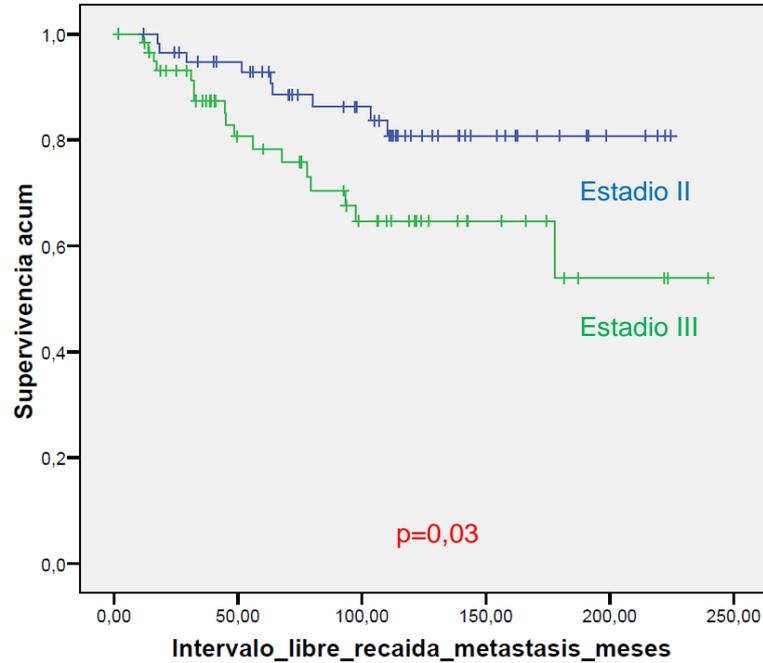


Figura 37: Curvas de ILRD de estadio II vs III

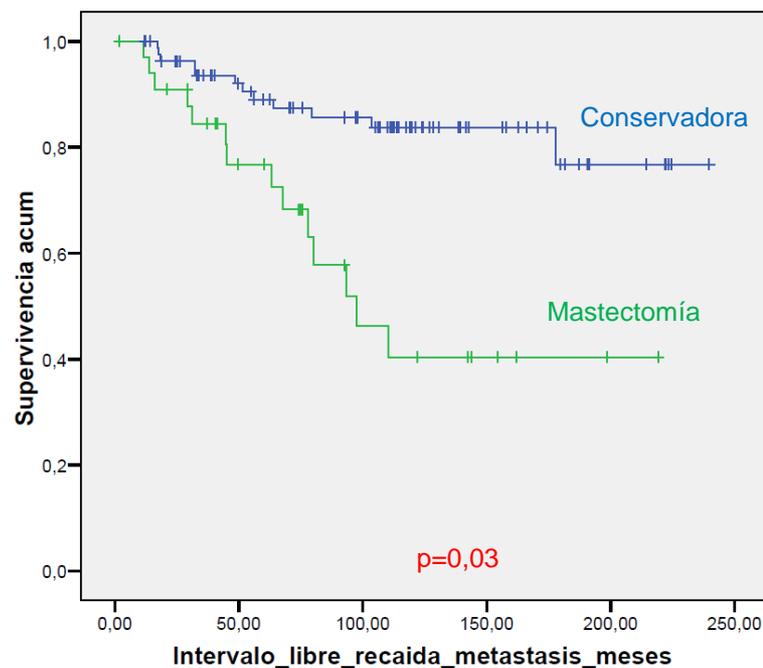


Figura 38: Curvas de ILRD comparando cirugía conservadora vs mastectomía

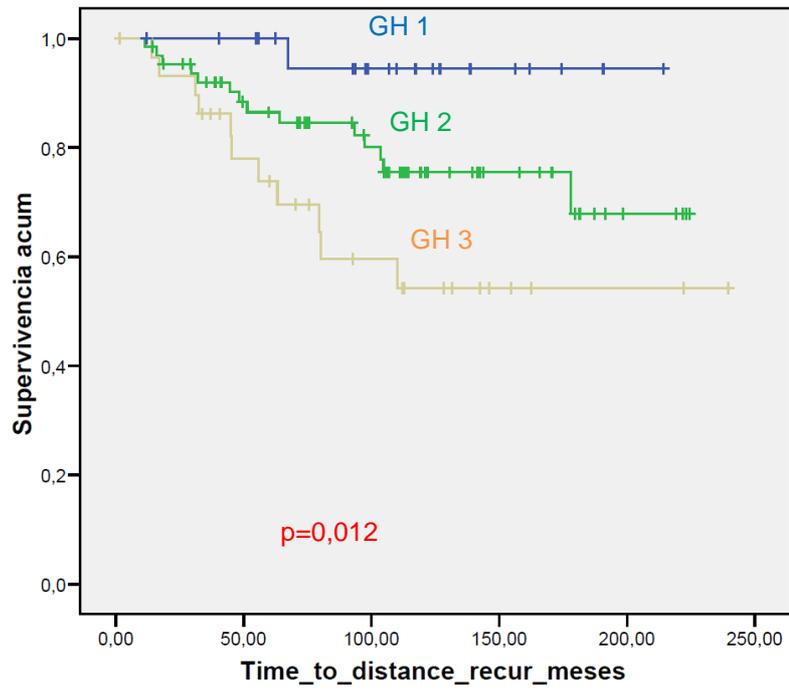


Figura 39: Curvas de ILRD por GH

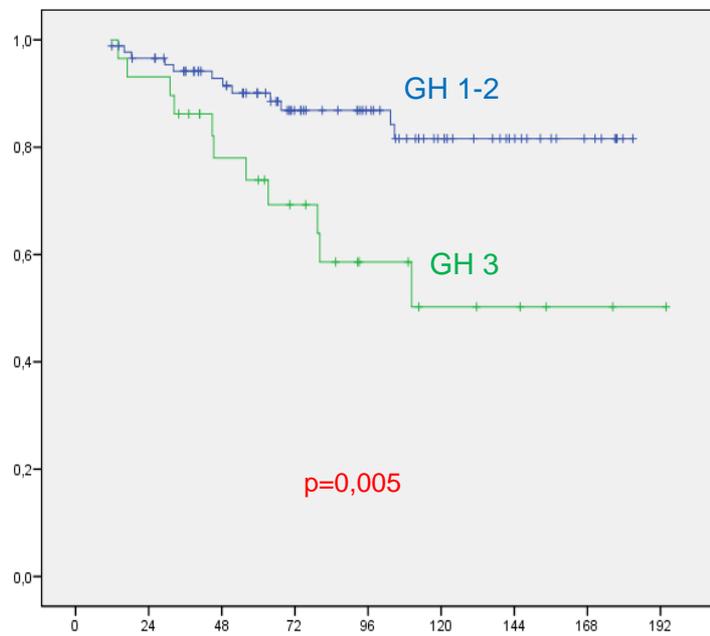


Figura 40: Curvas de ILRD comparando GH 1-2 vs GH 3

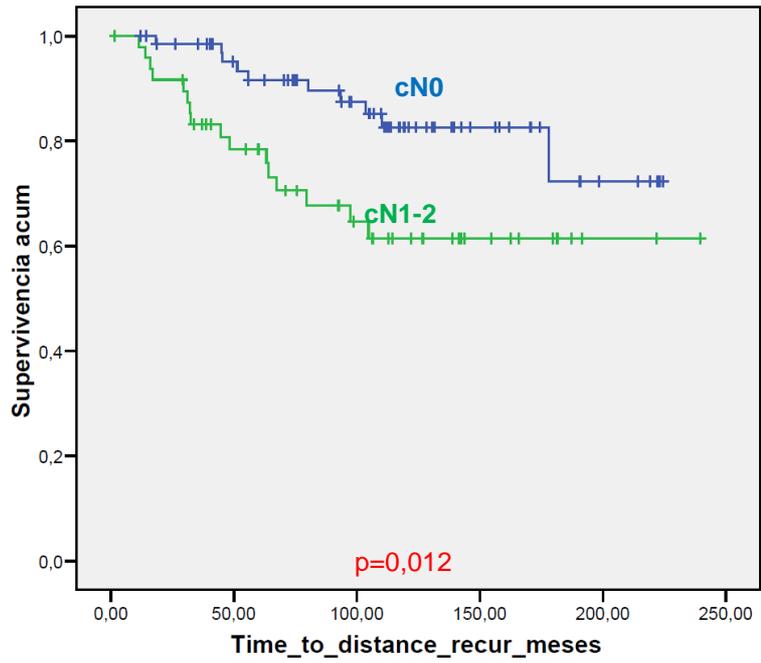


Figura 41: Curvas de ILRD según estado ganglionar al diagnóstico

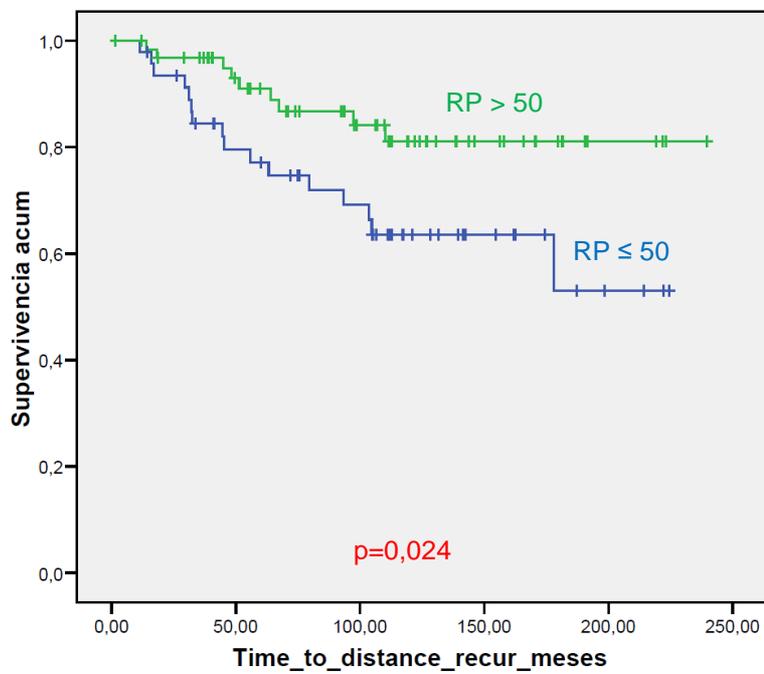


Figura 42: Supervivencia comparada según % de células RP positivo al diagnóstico

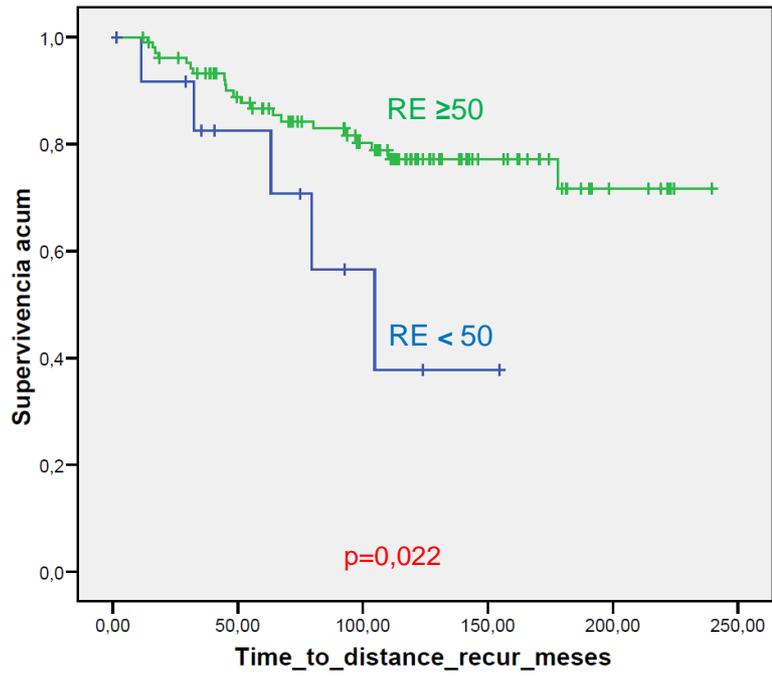


Figura 43: Curvas de ILRD según % de células RE positivas en la pieza quirúrgica

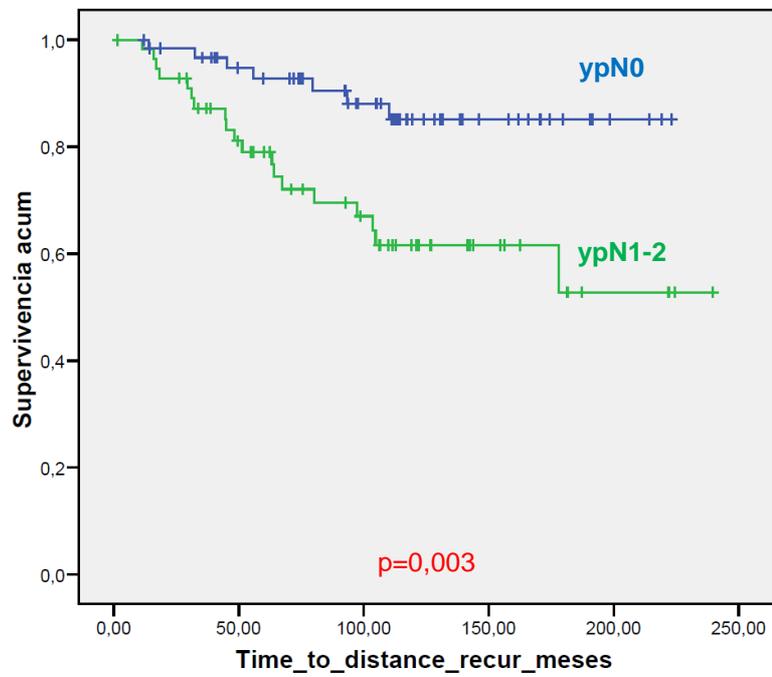


Figura 44: Curvas de ILRD según ypN

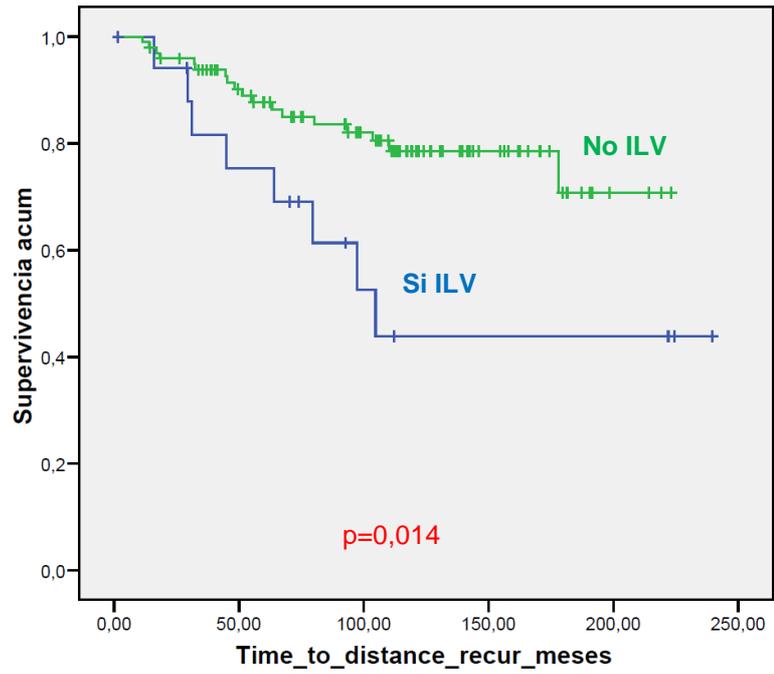


Figura 45: Curvas de ILRD en función de la presencia o no de ILV

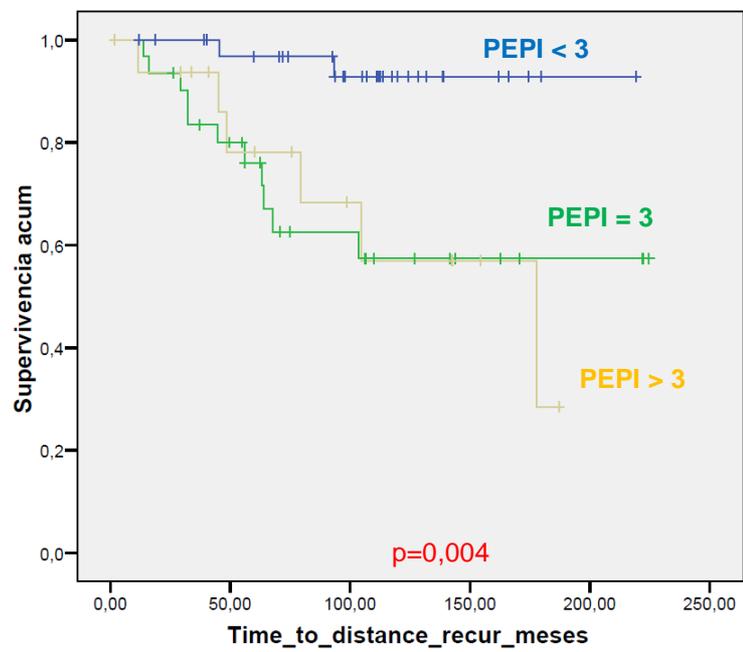


Figura 46: Curvas de ILRD por PEPI score

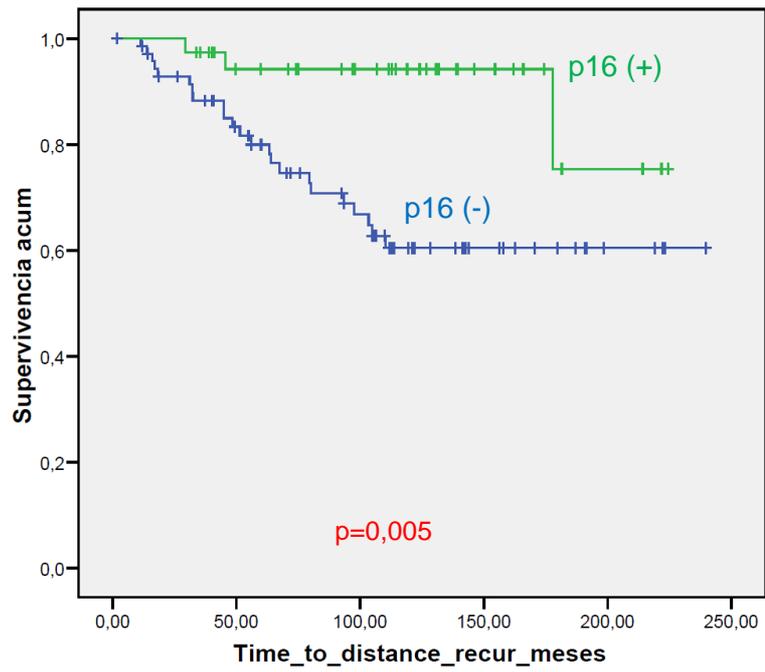


Figura 47: Curvas de ILRD en función de status p16 nuclear

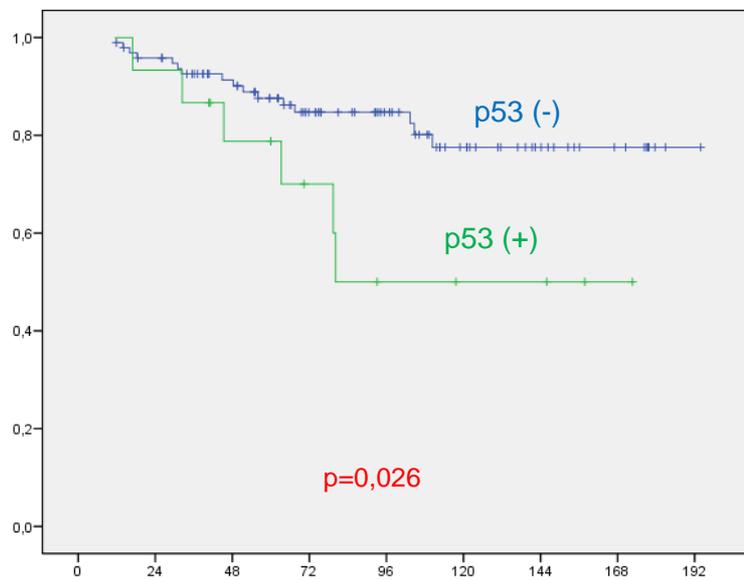


Figura 48: Curvas de ILRD en función de status p53

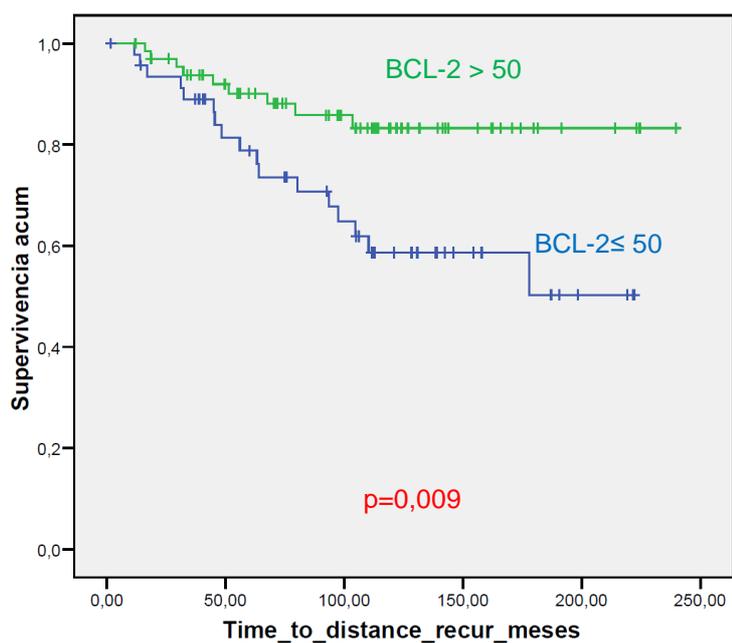


Figura 49: Curvas de ILRD en función del status BCL-2

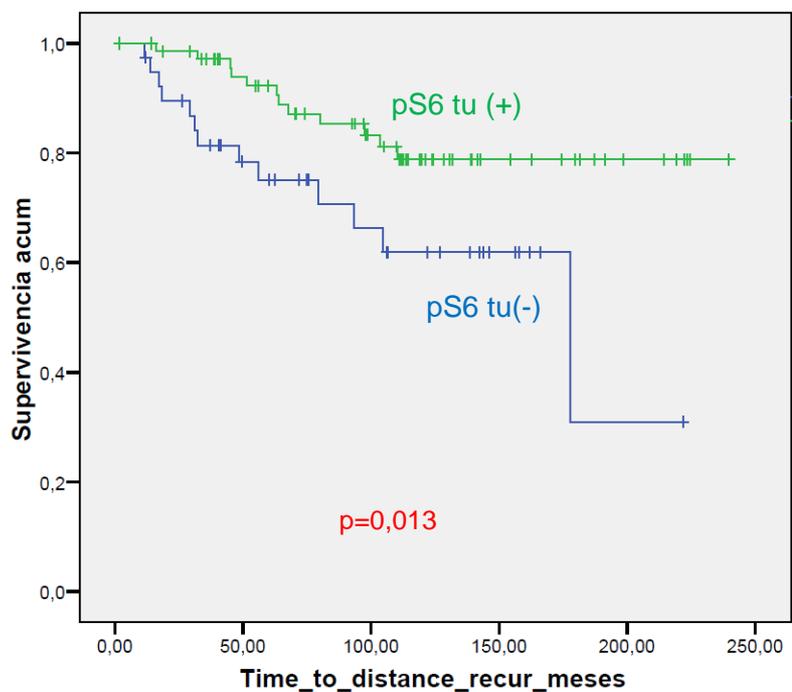


Figura 50: Curvas de ILRD en función de pS6 tumoral

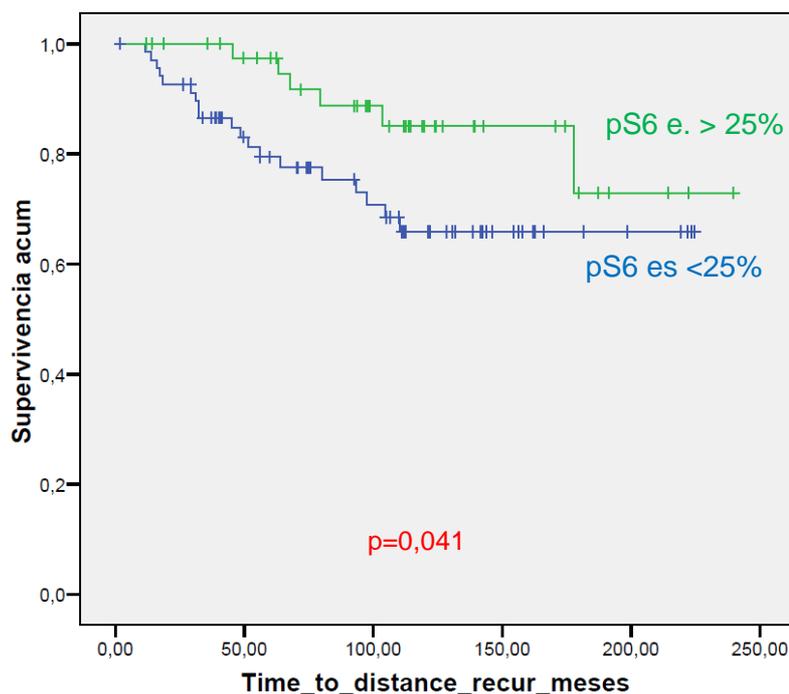


Figura 51: Curvas de ILRD en función de pS6 estromal

No mostraron una asociación estadística significativa de tener un mayor riesgo de recaída a distancia las siguientes variables: edad, tamaño tumoral (aunque cT4 vs cT1-T3 mostró tendencia,  $p= 0,054$ ) (figura 52); Ki-67 en el diagnóstico  $\geq 25\%$ , Ki67  $\geq 5\%$ , Ki-67  $\geq 3\%$ , aunque Ki-67 basal  $\geq 15$  mostró una tendencia a la significación ( $p= 0,059$ ) (figura 53) RP  $< 0$  o  $\geq 20\%$  ni en el diagnóstico ni en el tumor residual; Tipo de HTN (SERM vs IA); Respuesta clínica por calibrador; Respuesta radiológica; Progresión vs RO + enfermedad estable. En la pieza de tumor residual tampoco mostraron significación estadística de peor ILRD: HER2 positivo (figura 54), aunque solo 3 casos presentaban HER2 sobre-expresado; Ki-67 aumentado en la pieza tumoral con respecto al Ki-67 basal con HR 2,73 (IC95%: 0,88-8,47)  $p= 0,059$  (figura 55); RP en el tumor residual  $\leq 50\%$  ( $p = 0,066$ ) (figura 56); intensidad de pS6 en la

célula del estroma 0 vs 1-3+ ( $p= 0,051$ ); VAV3 ni evaluado en intensidad 0-1+ vs 2-3+ ( $p=0,07$ ) (figura 57) ni en porcentaje de células; % de fibrosis en el tumor (analizada con cortes en  $> 20\%$  y en  $> 50\%$ ); CD1 en el núcleo; pRB (ni en % ni en intensidad); p16 en el citoplasma de célula tumoral, p16 en célula del estroma; CD44 en la membrana de las células tumorales; RA en núcleo de células tumorales; Sinaptofisina en el citoplasma de las células tumorales ni SOX9 valorada en intensidad y porcentaje, tanto en el núcleo como en el citoplasma celular.

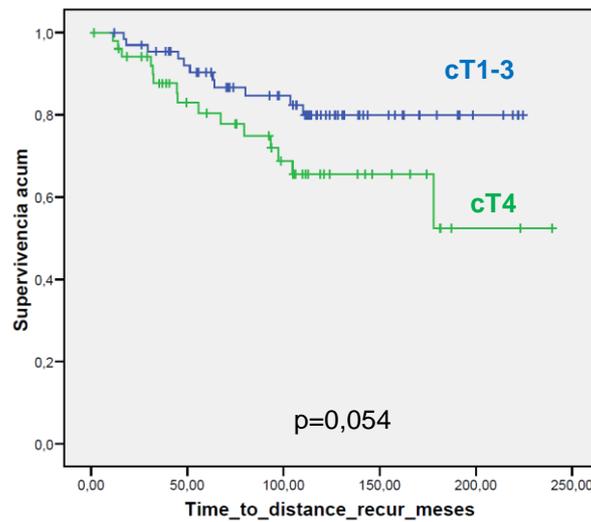


Figura 52: Curvas de ILRD comparadas entre cT4 vs cT1-3

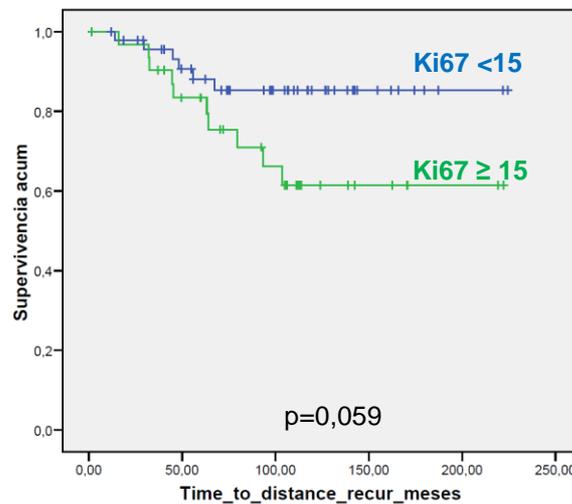


Figura 53: Curvas de ILRD en función del Ki-67 basal

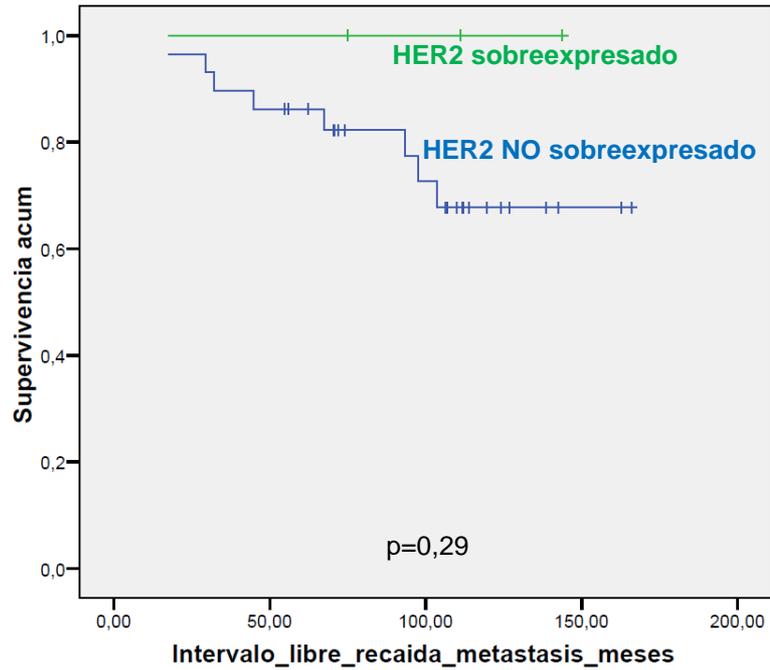


Figura 54: Curvas de ILRD en función de amplificación de HER2 en el tumor residual

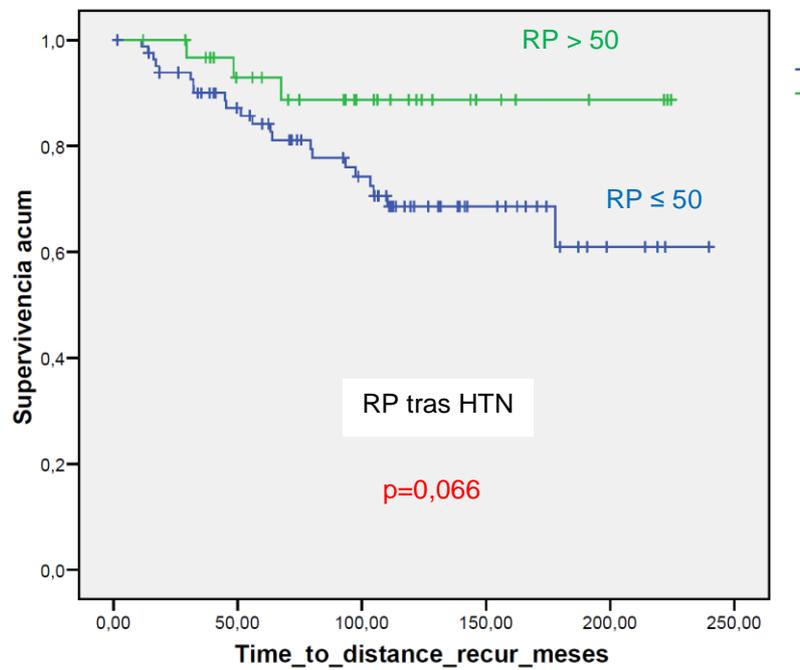


Figura 55: Curvas de ILRD en función del % de positividad del RP en la pieza quirúrgica

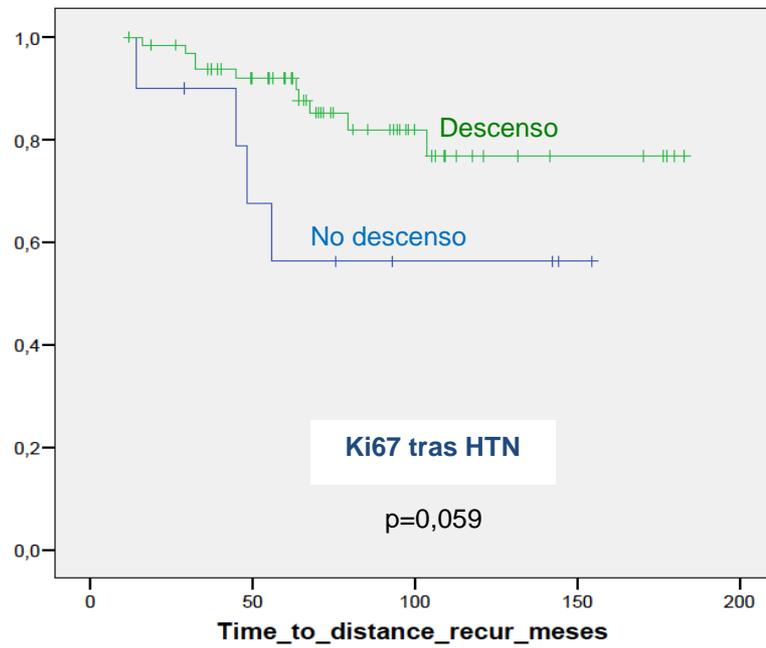


Figura 56: Curvas de ILRD en función si Ki-67 descendió o no tras HTN

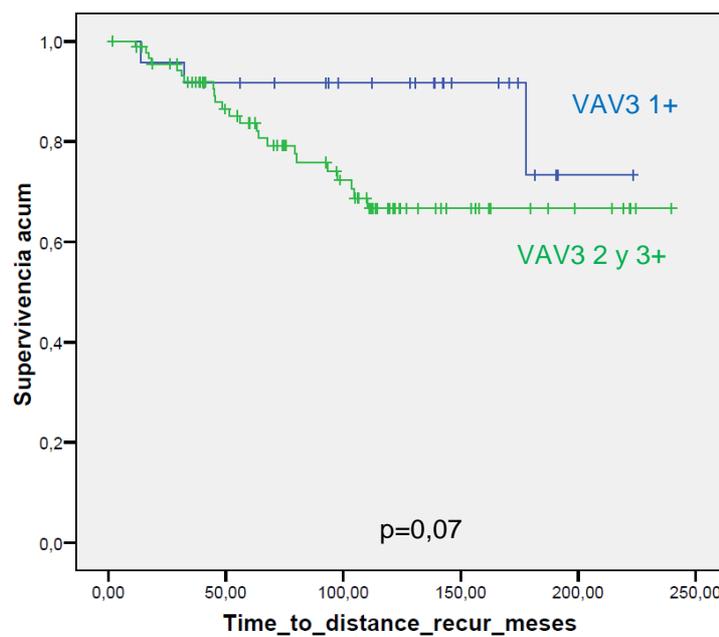


Figura 57: Curvas de ILRD en función de VAV-3 leve vs moderado y alto

Variable	N	Valor	N	Eventos (%)	P	HR	IC95%
cN	119	0 vs N1-2	70 49	11 (15,7) 16 (32,6)	0,012	2,66	1,21-5,86
cT	119	1-3 vs 4	67 52	11 (16,4) 15 (28,8)	0,054		
Estadio	119	II vs III	59 60	9 (15,2) 17 (28,3)	0,03	2,29	1,02-5,13
Ki67 inicial	79	<15 vs ≥ 15	47 32	6 (12,7) 10 (31,2)	0,059		
Grado histológico Inicial	119	1 vs 2 vs 3	24 65 30	1 (4,1) 4 (6,1) 11(36,6)	0,011	2,65	1,22-5,8
RP iniciales	111	≤50 vs >50%	47 64	16 (34) 9 (14)	0,04	2,42	1,1-5,62
Cirugia Mama	116	Conser Mastec	82 34	12 (14,6) 14 (41,1)	0,001	19,9	3.86-103
ypN	119	ypN0 ypN1-3	62 57	7 (11,3) 19 (33,3)	0,024	3,4	1,43-8,09
ILV post HTN	116	Si vs No	18 98	8 (44,4) 18 (18,3)	0,014	2,75	1,19-6,36
Grado Histo. Post HTN	118	G1,2 vs G3	89 29	12 (13,4) 11 (38)	0,014	2,65	1,22-5,8
RE post HTN	119	<50 vs ≥50%	13 106	5 (38,4) 21 (19,8)	0,022	2,99	1,12-8,01
RP post HTN	115	<50 vs ≥50%	83 32	22 (26,5) 3 (9,3)	0,066		
Ki67 postHTN vs Ki67 preHTN	79	Sube Baja	10 69	4 (40) 12 (17,4)	0,059		
PEPI score	101	0 vs ≥ 3	38 62	3 (7,9) 19 (30,6)	0,018	3,69	1,26-10,8
p16 núcleo	110	(-) vs (+)	72 38	23 (32) 3 (7,9)	0,005	4,73	1,4-15,7
p53	112	(-) vs (+)	98 14	19 (16,3) 6 (42,8)	0,026	2,88	1,12-7,37
BCL-2	113	<25 vs ≥25%	39 74	15 (38,4) 11 (14,8)	0,009	2,79	1,24-6,25
pS6 estroma	113	<25 vs ≥25	69 44	19 (27,5) 6 (13,6)	0,041	2,61	1,19-5,75
pS6 núcleo tumoral	106	(-) vs (+)	37 69	11 (29,7) 11 (15,9)	0,051		
pS6 citoplasma tumoral	106	(-) vs (+)	81 25	17 (21) 5 (20)	0,013	2,44	1,02-5,84
VAV-3	115	1+ vs 2 y 3 +	24 91	3 (13,5) 23 (25,3)	0,07		
R Andrógeno por nCounter	103	< -2 vs ≥ -2	55 48	19 (34,5) 4 (8,3)	0,007	3,72	1,27-11
ROR-S	103	Bajo vs Medio	66 31	10 (15,2) 12 (35,1)	0,021	2,7	1,16-6,25
CD8A	103	< -3,5 vs ≥ -3,5	38 65	12 (31,5) 11 (16,9)	0,086		

Tabla 20: Variables analizadas como factor pronóstico de recaída metastásica con significación o tendencia (< 0,07) a la significación estadística.

Las variables estudiadas que no mostraron ni siquiera tendencia en el análisis univariado están resumidas en la tabla 21.

Variable	Casos en cada grupo	HR (IC95%)	P
Tipo de HTN AI /SERM	76/43	0,98 (0,4-2,37)	0,96
Respuesta Clínica (no vs si)	48/69	0,49 (0,19-1,26)	0,14
Resp. Radiológica (no vs si)	45/62	0,21(0,03-1,58)	0,13
Fibrosis (<20% vs ≥20%)	66/52	1,3 (0,55-3,05)	0,56
RP post NET (<20% vs ≥20%)	68/46	0,67 (0,273-1,645)	0,37
RP bajan tras HTN (no vs si)	113 / 6	0,66 (0,27-1,65)	0,37
RA post NET (+ vs -)	26/83	1,791 (0,527-6,084)	0,34
Ki67 post NET (< 5% vs ≥ 5%)	73/45	1,4 (0,618-3,198)	0,41
HER2 (3+ vs 0-1-2+)	3/116	0,967 (0,431 -1,567)	0,29
CD1 < 25% vs ≥ 25%	49/60	1,349 (0,564-3,223)	0,43
pRB <10% vs ≥ 10%)	98/16	0,913 (0,277-3,146)	0,4
CD44 (0, 1+ vs 2+,3+)	76/34	0,85 (0,332-2,174)	0,96
Sinaptofisina (+ o -)	15/96	0,886 (0,263-2,986)	0,76
SOX9 Citoplasma 0,1+ vs 2+,3+	47/66	0,767 (0,331 -1,777)	0,15

Tabla 21: Variables analizadas sin significación estadística ni tendencia ( $p > 0,07$ ) s como factor pronóstico de recaída metastásica con significación o tendencia a la significación.

#### 4.9 Resultados del análisis génico por ncounter®

En el laboratorio traslacional del IDIBAPS, se extrajo el ARN de las células tumorales de las muestras de tumor extirpado tras HTN y archivado en parafina. Se obtuvo material viable en 103 de los 119 casos (86,9%) y se analizó la expresión de un panel de 55 genes relacionados con el cáncer de mama, incluyendo los de la plataforma PAM50, para realizar una clasificación por subtipos, una puntuación predefinida del riesgo de recurrencia (ROR) sin genes de proliferación (ROR-S) y una ROR predefinida incluyendo 11 genes de proliferación celular (ROR-P), además de secuenciación de genes relacionados con RA, con RE, con HER y de genes de inmunidad (CD8A, CD4, PDL1 and PD1). Se realizó, primero un análisis univariable y después un análisis multivariable por el modelo de Cox para demostrar la asociación de cada variable con el ILRD. (Anexo III) (161).

La clasificación por **subtipos moleculares por PAM50** de los tumores después de HTN se puede ver en la tabla 22.

<b>Subtipo molecular</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Luminal A</b>	59	49,6
<b>Luminal B</b>	1	0,8
<b>Normal</b>	25	21
<b>HER2 enriquecido</b>	17	14,3
<b>Basal</b>	1	0,8
<b>Total</b>	103	100

*Tabla 22: Clasificación por subtipos según PAM50*

No se evidenciaron diferencias significativas entre subtipos moleculares por PAM50 e ILRD, aunque hay que considerar que, tras HTN, solo un caso era Luminal B y que, al ser los tumores basales motivo de exclusión de la HTN, solo un caso era de tipo basal en el tumor residual (figura 58).

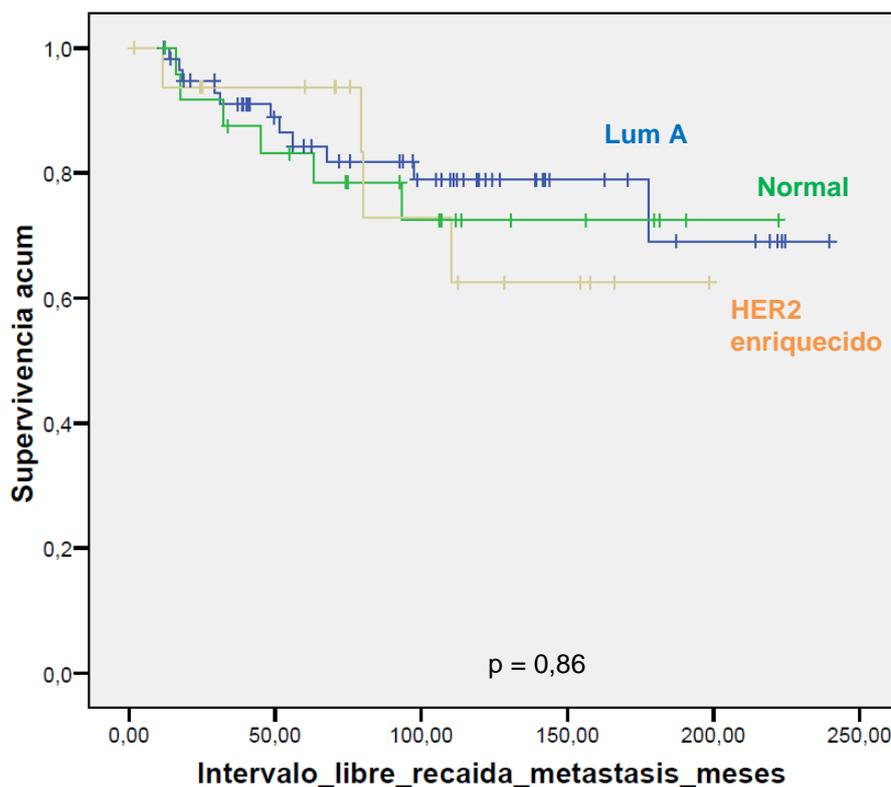


Figura 58: ILMD en función de subtipo histológico por PAM50

Al analizar el porcentaje de celularidad tumoral por subtipos, observamos que existía una significativa menor tasa de celularidad tumoral en las muestras del subtipo Normal con respecto a los subtipos Luminal A ( $p < 0,001$ ) y HER2 enriquecido ( $p = 0,045$ ), ver figura 59 y tabla 23.

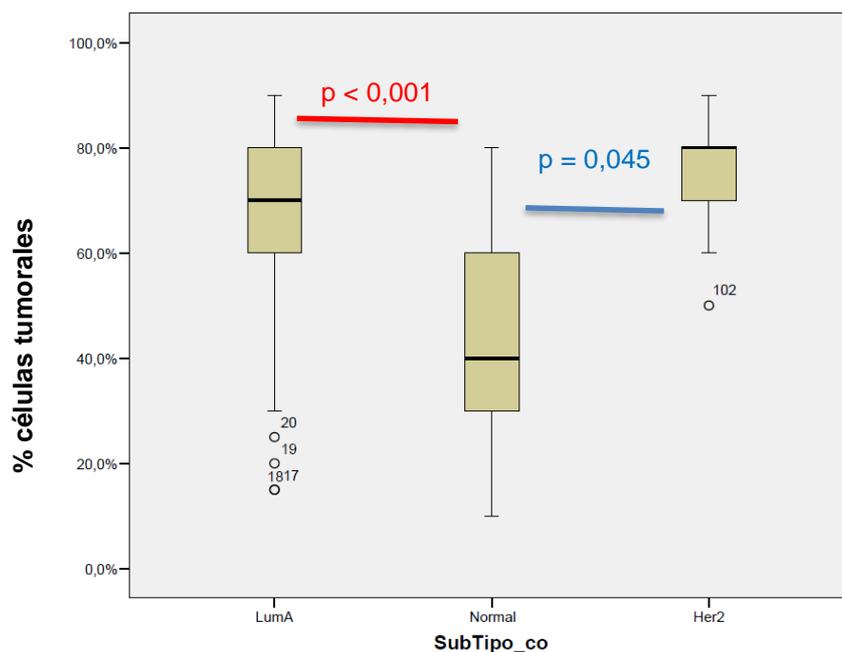


Figura 58: Porcentaje de celularidad tumoral por muestra seleccionada para PAM50

Subtipo	N	Mediana
Luminal A	59	70 (15-90)
Normal	25	40 (10-80)
HER2 enriquecido	17	80 (50-90)

Tabla 23: % de células tumorales en la muestra por subtipo

**El análisis de ROR-S** clasificó a 66 casos (64%) como de bajo riesgo (< 40), 31 casos (30%) de riesgo intermedio (41-60) y solo 6 casos (5,8%) como alto riesgo (>60) (Tabla 24). Esta clasificación mostró diferencias estadísticamente significativas con mejor pronóstico para los tumores de bajo riesgo con respecto a los de riesgo intermedio con una HR de 0,39 (IC95%: 0,17-0,91)  $p = 0.001$ ; No mostró peor ILRD para los 6 tumores de alto riesgo (figura 60).

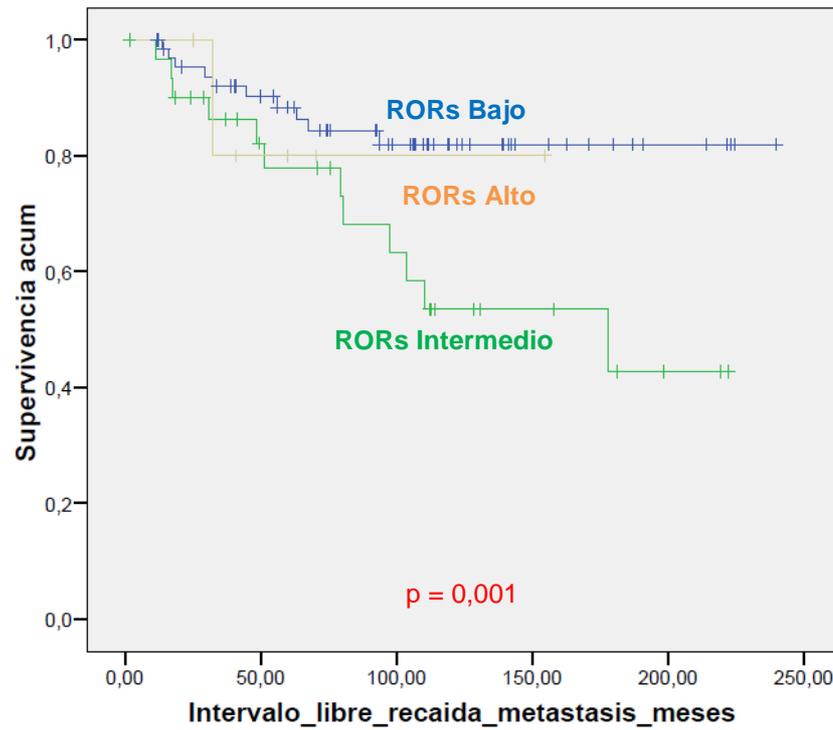


Figura 60: Curvas de ILRD en función de la puntuación ROR

Después de ajustar con o sin el subtipo tumoral Normal, ROR-S continuó mostrando significación estadística (Figura 61).

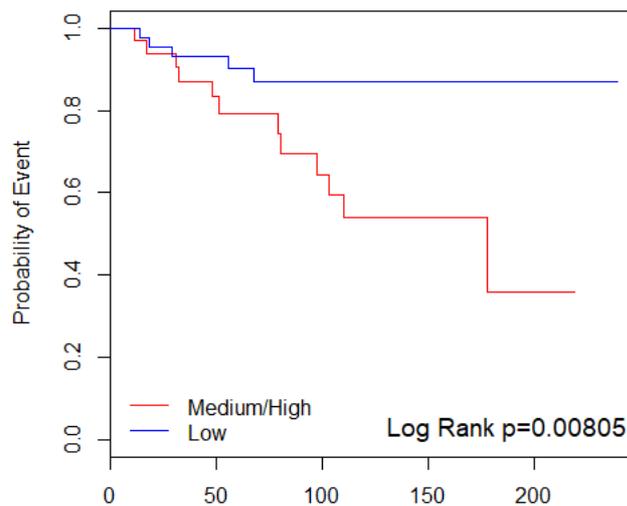


Figura 61: Curvas ILRD por ROR-S excluyendo subtipo Normal

El resultado del análisis ROR-P clasifico como de riesgo bajo a 52 casos (50,48%), riesgo medio a 44 (42,71%) y riesgo alto a 7 casos (6,8%) (Tabla 22). En nuestra serie ROR-P no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a ILRD. (Figura 62)

Puntuación	ROR-S n de casos (%)	ROR-P n de casos (%)
<b>Baja &lt; 40</b>	66 (64%)	52 (50,5)
<b>Intermedia 40-60</b>	31 (30%)	44 (42,7)
<b>Alta &gt;60</b>	6 (5,8%)	7 (6,8%)

Tabla 24: número de casos por ROR-S y ROR-P

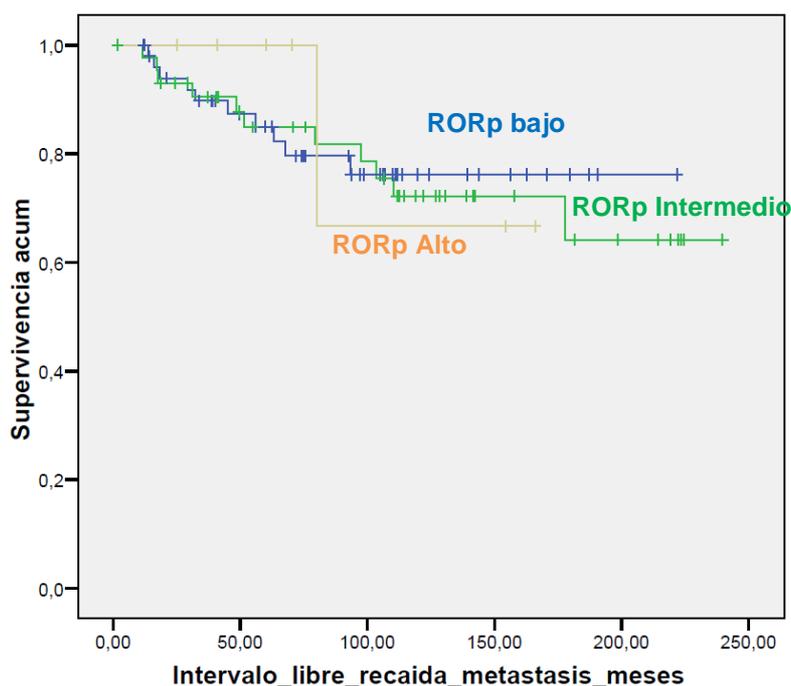


Figura 61: Curvas de ILRD en función de nivel ROR con genes de proliferación

También se analizó mediante técnica de ncounter® la expresión del gen del RA y de genes relacionados con la inmunidad como el ligando 1 de la muerte programada (PDL1), la proteína 1 de la muerte celular programada

(PD1), el cúmulo de diferenciación 4 (CD4) que es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y el antígeno CD8A que es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de la mayoría de linfocitos T citotóxicos, que media interacciones eficientes de las células del sistema inmunológico. Solo una expresión muy baja ( $< -2$ ) del gen del RA mostró un mayor riesgo con significación estadística de peor ILRD en el análisis univariable con HR 3,72 (IC95% 1,27-10,96) (figura 63)

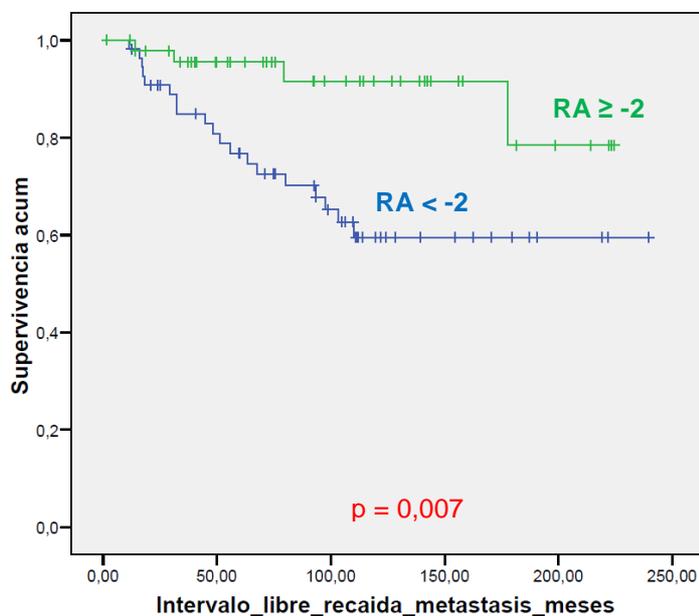


Figura 63: Curvas de ILRD en función de la expresión RA por ncounter

Después de ajustar sin subtipo tumoral Normal, la expresión de RA continuó mostrando significación estadística.

La expresión de CD8A mostró una tendencia, no significativa ( $p=0,062$ ), a peor ILRD si el CD8A era  $<$  de  $-4$  (Figura 64)

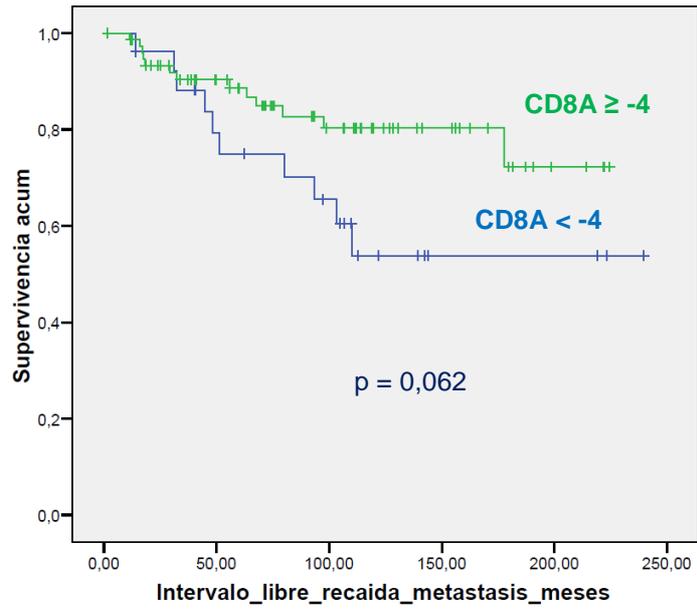


Figura 63: Curvas de ILRD en función de la expresión de CD8A



#### 4.10 Análisis multivariable de factores del pronóstico

En primer lugar, hicimos un análisis **de todos los factores** clínicos y patológicos (valorados mediante tinción de H&E o por IHQ) y que habían mostrado significación estadística en el análisis univariado: GH, cN, estadio clínico, RP basal, tipo de cirugía en la mama, ypN, ILV, RE post HTN, p16 en núcleo, p53, BCL2, pS6 en célula tumoral y pS6 en estroma (tabla 20). Se observó que el modelo mostraba significación como factores relacionados con peor ILRD en 3 variables que eran:

1º **p53 mutada** HR 7,08 (IC 95%: 2,29-21,88)

2º **Mastectomía**: HRI 2,71 (IC 95%: 1,12-6,63)

3º **Estadio III**: HR 2,67 (IC 95%: 1-7,13)

Después llevamos a cabo otro análisis multivariado con **solo las variables de IHQ**, sin las variables clínicas (estadio, tipo de cirugía, ypN) ni el GH. Encontramos como variables significativas de peor ILRD 3 variables:

1º **p53 mutada** HR 2,74 (IC 95%: 1,06-7,34)

2º **p16 negativa** en el núcleo: HR 4,38 (IC95%: 1,01-18,92)

3º **BCL2 < 50%** HR 2,86 (IC 95%: 1,22-6,74)

Posteriormente se efectuó un análisis multivariable con las variables IHQ **añadiendo PEPI score y las determinaciones del análisis génico** mediante técnica de ncounter®, que habían mostrado significación en el análisis univariante (ROR-S y RA). El modelo mostró significación en 4 variables:

1º **p53 mutada** HR 3,86 (IC 95%: 1,19-12,51)

2º **pS6 (-)** en citoplasma de célula tumoral HR 4,92 (IC 95%: 1,86-13,03)

3º **RA > -2** HR 5,34 (IC 95%: 1,59-17,89)

4º **ROR-S** intermedio HR 3,21 (IC 95%: 1,15-9,01)

Por último, llevamos a cabo un análisis multivariable con las variables de IHQ más ROR-S y RA secuenciado por ncounter® y **sin el PEPI score**, quedando entonces otras cuatro variables significativas independientes:

1º **Grado Histológico 3** HR 2,66 (IC 95%: 1,03-2,85)

2º **pS6 (-)** en citoplasma de célula tumoral HR 6,83 (IC 95%: 2,46-18,98)

3º **RA** HR 4,33 (IC 95%: 1,42-13,22)

4º **ROR-S** HR 3,66 (IC 95%: 1,39-9,69)

Como se puede apreciar en los diversos análisis multivariable realizados, algunas variables mantenían o perdían significación, por lo que se intentó analizar la posible correlación entre algunas de ellas mediante prueba de Chi-cuadrado de Pearson:

Se observó que **p53 mutada correlaciona con ROR-S** de riesgo intermedio o alto ( $p = 0,019$ ) (tabla 25).

			P53 co		Total
			Negativo	Positivo	
ROR.S.Group. .Subtype.Only.	Low	Recuento	60	3	63
		% de ROR.S.Group.. Subtype.Only.	95,2%	4,8%	100,0%
	Medium	Recuento	24	6	30
		% de ROR.S.Group.. Subtype.Only.	80,0%	20,0%	100,0%
	High	Recuento	4	2	6
		% de ROR.S.Group.. Subtype.Only.	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Recuento	88	11	99
		% de ROR.S.Group.. Subtype.Only.	88,9%	11,1%	100,0%

*Tabla 25: Tabla de contingencia entre ROR-S y p53 mutada*

p53 y BCL-2 también mostraron una correlación estadísticamente significativa ( $p= 0,017$ ) (tabla 26)

**Tabla de contingencia BCL2\_co50 \* P53\_co**

			P53_co		Total
			Negativo	Positivo	
BCL2_co50	< = 50	Recuento	37	10	47
		% de BCL2_co50	78,7%	21,3%	100,0%
	> 50	Recuento	61	4	65
		% de BCL2_co50	93,8%	6,2%	100,0%
Total	Recuento		98	14	112
	% de BCL2_co50		87,5%	12,5%	100,0%

*Tabla 26: Tabla de contingencia entre p53 y BCL2*

En cambio, no se detectó correlación entre p53 y p16 ( $p= 1$ ) como se puede observar en la tabla 27

**Tabla de contingencia P53\_co \* P16TMNUC\_co**

			P16TMNUC_co		Total
			Negativo	Positivo	
P53_co	Negativo	Recuento	62	33	95
		% de P53_co	65,3%	34,7%	100,0%
	Positivo	Recuento	9	5	14
		% de P53_co	64,3%	35,7%	100,0%
Total	Recuento		71	38	109
	% de P53_co		65,1%	34,9%	100,0%

*Tabla 27: Contingencia entre p53 y p16 en núcleo célula tumoral*

p16 y ROR-S no mostraron correlación ( $p=0,697$ ), tampoco p16 con pS6, ( $p= 0,28$ ), pero sí encontramos **asociación entre p16 negativo y RA**  $<$  de -2 ( $p=0,029$ ) ver tabla 28

			P16TMNUC_co		Total
			Negativo	Positivo	
AR_co2 < -2	Recuento	40	12	52	
	% de AR_co2	76,9%	23,1%	100,0%	
	% de P16TMNUC_co	62,5%	38,7%	54,7%	
>= -2	Recuento	24	19	43	
	% de AR_co2	55,8%	44,2%	100,0%	
	% de P16TMNUC_co	37,5%	61,3%	45,3%	
Total	Recuento	64	31	95	
	% de AR_co2	67,4%	32,6%	100,0%	
	% de P16TMNUC_co	100,0%	100,0%	100,0%	

*Tabla 28: Contingencia RA y p16 en núcleo célula tumoral*

ROR, además de con p53, mostró correlación estadísticamente significativa con BCL-2 ( $p= 0,004$ ) (Tabla 29) y con GH ( $p<0,0001$ ) (Tabla 29)

**Tabla de contingencia BCL2\_co50 \* ROR.P.Group..Subtype...Proliferation.**

			ROR.P.Group..Subtype...Proliferation.			Total
			Low	Medium	High	
BCL2_co50 <= 50	Recuento	14	22	6	42	
	% de BCL2_co50	33,3%	52,4%	14,3%	100,0%	
> 50	Recuento	35	20	1	56	
	% de BCL2_co50	62,5%	35,7%	1,8%	100,0%	
Total	Recuento	49	42	7	98	
	% de BCL2_co50	50,0%	42,9%	7,1%	100,0%	

*Tabla 29: Contingencia entre BCL2 y ROR-S*

**Tabla de contingencia Grado\_post\_co1 \* ROR.P.Group..Subtype...Proliferation.**

			ROR.P.Group..Subtype...Proliferation.			Total
			Low	Medium	High	
Grado_post_co1	G1 + G2	Recuento	44	30	1	75
		% de Grado_post_co1	58,7%	40,0%	1,3%	100,0%
	G3	Recuento	8	14	6	28
		% de Grado_post_co1	28,6%	50,0%	21,4%	100,0%
Total		Recuento	52	44	7	103
		% de Grado_post_co1	50,5%	42,7%	6,8%	100,0%

*Tabla 30: Contingencia entre GH y ROR*

BCL-2 mostró correlación, además de con ROR, con GH ( $p= 0,001$ ) (tabla 31) pero no hubo correlación entre BCL-2 y RA ( $p= 0,17$ )

**Tabla de contingencia BCL2\_co50 \* Grado\_post\_co1**

			Grado_post_co1		Total
			G1 + G2	G3	
BCL2_co50	< = 50	Recuento	27	20	47
		% de BCL2_co50	57,4%	42,6%	100,0%
	> 50	Recuento	56	10	66
		% de BCL2_co50	84,8%	15,2%	100,0%
Total		Recuento	83	30	113
		% de BCL2_co50	73,5%	26,5%	100,0%

*Tabla 31: Contingencia entre GH y BCL2*



## **5. DISCUSIÓN:**



En esta serie de 119 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama RE-positivo tratadas de forma homogénea, confirmamos que **el tratamiento con HTN es seguro** y altamente **efectivo** puesto que, incluso después de excluir el 2,2% de pacientes que alcanzaron una pRC, 93 pacientes (78%) no presentaron recaída a distancia tras un seguimiento medio de casi 10 años. Además, este tratamiento es **eficiente**, al no incrementar el gasto sanitario porque: 1) el mismo tratamiento hormonal hubiera estado indicado en forma adyuvante, 2) no ha habido toxicidad severa por HTN y 3) se ha evitado la QT en muchos casos de cáncer de mama estadio III. De esta forma, se ha ahorrado consumo de recursos sanitarios y evitado la aparición de los efectos secundarios que la QT comporta.

La edad media de las pacientes incluidas es alta (74 años) y más de 15% de las pacientes tenían 80 o más años de edad en el momento del diagnóstico, por lo que muchas pacientes presentaban comorbilidad y contraindicación a tratamientos muy agresivos. La edad avanzada justifica en parte, que en más del 65% de los casos, la causa de muerte no fuese debida al cáncer de mama. Este aspecto ya fue observado en un estudio con 6186 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama incluidas en el ensayo ATAC y que fueron aleatorizadas a un tipo u otro de tratamiento hormonal adyuvante. En este estudio las pacientes  $\geq 70$  años de edad, tuvieron mayor riesgo de recaída que las de edad  $< 70$  (HR 1,21; IC95%: 1,08-1,37). Pero a su vez, también presentaban mayor riesgo de morir sin recaída de cáncer de mama (HR 4,13; IC95%: 3,53-4,83). El estudio también demostró que el riesgo de morir sin cáncer aumentaba con la comorbilidad (162). Pero además de la elevada edad media de nuestra serie, el 50% de

las pacientes presentaba un carcinoma de mama estadio III, por lo que la supervivencia observada del 78,7% a los 10 años, se ha de considerar como un excelente resultado. De hecho, la SRCM fue del 91%. La SRCM es una medida del exceso de riesgo de mortalidad por cáncer con respecto a una cohorte de pacientes de su misma área y con sus mismas características, pero sin diagnóstico de cáncer. Se calcula mediante el cociente entre la supervivencia observada en la serie y la supervivencia esperada de la cohorte en función de la mortalidad de la población general a la que pertenecen. En nuestro caso fue escogida de las tablas de la población española en el año 2014 y reportadas por la Human Mortality Database (163). Así que parece que, en general, las pacientes incluidas en nuestro estudio no tuvieron una expectativa de vida inferior a la esperable para su edad.

El hecho de que la esperanza de vida de la población de nuestro medio esté aumentando de forma constante, hace que sea muy importante llevar a cabo estudios sobre esta grupo de población añosa. Sabemos que actualmente, más 30% de los nuevos cánceres de mama son diagnosticados en mujeres mayores de 70 años (2).

Nuestro estudio confirma los resultados de los primeros estudios aleatorizados que mostraron que la SG de estas pacientes no empeora usando TAM como HTN (64-69). El hecho de que la causa de muerte por cáncer de nuestra serie representara tan solo el 34,6% de los casos, hizo que consideráramos el **ILRD** como **el parámetro más objetivo para llevar a cabo el análisis de factores de pronóstico** del presente estudio.

La TR clínica del 58% y radiológica 52% de esta serie, está en concordancia con la mayoría de estudios publicados (60-70, 73-83). Remarcar que, además, solo en un 4% de los casos se objetivó progresión de la enfermedad durante la HTN.

La mastectomía, con independencia de la edad, siempre representa una mutilación y causa un gran impacto emocional en la paciente. Muchos trabajos aleatorizados, han demostrado que la HTN permite aumentar la tasa de CCM y esto es otra buena razón para indicar HTN. Es importante destacar que en el 73% de los casos de nuestra serie se pudo practicar una cirugía conservadora y que en solo 7 casos (6%) se observó una recaída loco-regional tras el largo seguimiento efectuado. Esta tasa de CCM está en la línea de los ensayos ACOSOG Z1031 (83) y STAGE (84) y muy por encima de los ensayos P024 (80), IMPACT (81) y PROACT (82) que solo practicaron CCM en poco más del 40% de los casos incluidos (tabla 4).

Por otro lado, nuestra serie demuestra la capacidad de la HTN en producir una **disminución del estadio** entre el momento del diagnóstico (cTNM) y el postquirúrgico (ypTNM). Se pasó de un 50% de casos estadio III en el diagnóstico al 34% patológico y de un 0,8% de estadios I en el momento del diagnóstico al 20% postcirugía. Ellis y cols. (156) destacan que en los 30 casos del estudio PO-24 en los que se observó disminución desde estadio clínico II-III a estadio patológico 0-I, la SLR fue del 100%, frente al 70% de los 175 casos con estadio patológico II o III ( $p < 0.001$ ). Por tanto, esta disminución del estadio tiene impacto en la supervivencia.

Pero **el objetivo principal de este estudio**, no era demostrar la eficacia, eficiencia y seguridad del HTN, si no el **descubrir los factores**

**biológicos** que, tras HTN, tienen la capacidad de identificar aquellas pacientes **con alto riesgo de presentar recaída a distancia** y, por tanto, podrían ser de utilidad para seleccionar aquellas pacientes tributarias de añadir algún otro tratamiento adyuvante a la hormonoterapia  $\pm$  RTP.

La pCR no es un buen factor pronóstico en HTN porque es un evento raro, menos del 3% en casi todas las series (51, 76-88, 91-97), incluido nuestro estudio, en el que la pCR fue del 2,2%. Aunque la pCR con HTN es casi anecdótica, es habitual que el patólogo observe fibrosis, presencia de macrófagos y parches de infiltrados inflamatorios, junto con persistencia de nidos de células neoplásicas viables. Estos hallazgos podrían ser otro método de valoración de la eficacia del tratamiento. El problema se suscita en cómo medir el grado de la respuesta patológica parcial. Llegar a un acuerdo de consenso para evaluar este punto es muy difícil. De hecho, no se ha conseguido del todo para la QT y menos aún para la HTN. En consecuencia, es muy importante identificar el subgrupo de pacientes que han sido altamente sensibles a la HTN y por tanto con pocas probabilidades de obtener algún beneficio con la adición de QT adyuvante.

En el estudio univariado de nuestra serie, se identificaron como factores de pronóstico significativos asociados a un mayor riesgo de recaída a distancia: estadio clínico III vs estadio II, mastectomía vs cirugía conservadora, GH 3 vs GH 1-2, cN1-2 vs cN0, RP al diagnóstico  $\leq$  50% vs  $>$  50%; RE en el tumor residual  $\leq$  50% vs  $>$  50%, ypN+ vs yN0, presencia de ILV, PEPI score  $\geq$ 3 vs  $<$ 3, p16 negativa vs positiva en núcleo de células tumorales, p53 mutada vs no; BCL-2  $\leq$  50% vs  $>$  50%, pS6 negativo en vs

positivo en el citoplasma de la célula tumoral y pS6 < 25% vs > 25% en la célula del estroma (figuras 38-51 y tabla 20).

En nuestro estudio el Ki-67 basal elevado no supuso peor ILRD. Realizamos análisis univariante con cortes de Ki-67 en  $\geq 25\%$ ,  $\geq 15\%$  y  $\geq 5\%$  y  $\geq 3\%$ , no hubo diferencias significativas en ninguno de ellos y solo el corte  $\geq 15\%$  vs < 15% mostró una tendencia a peor ILRD ( $p = 0,059$ ). (Figura 52)

Los RP en la BAG < 20% vs  $\geq 20\%$  tampoco mostraron significación estadística de peor ILRD. Recordemos que este es un criterio para considerar el tumor como luminal B “like”. En cambio si fue un factor significativo adverso que los RP en la BAG fuesen < 50% vs  $\geq$  ( $p = 0,022$ ) (figura 42).

Como era lógico el estadio avanzado fue un factor de mal pronóstico, así como la mastectomía frente a la cirugía conservadora. Porque evidentemente la mastectomía iba ligada a mayor estadio y a peor respuesta radiológica. De igual manera la afectación de los ganglios axilares ha sido clásicamente un factor de mal pronóstico de supervivencia y no descubrimos nada nuevo con el presente estudio. También en el estudio del grupo de Edimburgo, el número de ganglios axilares con invasión patológica fue un factor claramente adverso ( $p < 0,0001$ ) en el análisis multivariable (113); igual ocurre en el estudio de Ellis ( $p < 0,001$ ) y por ello es uno de los cuatro factores que puntúan en el PEPI score (156).

En nuestro estudio, también fue significativa como factor adverso en el estudio univariado la ILV ( $p = 0,014$ )

Por otra parte, nuestra serie confirma el valor del “PEPI score” como un factor de pronóstico tras HTN, así, aquellas pacientes que presentaron un PEPI score  $\geq 3$  tuvieron 3,69 más riesgo de presentar metástasis ( $p = 0,004$ ) que las

que tuvieron un PEPI score < 3. Es necesario resaltar que en las publicaciones previas en las que se evaluó el papel de PEPI como factor pronóstico, se basaron en estudios con un seguimiento medio de 5 años (98, 156) y en nuestro trabajo las pacientes han sido seguidas durante casi 10 años. Creemos que nuestras observaciones tienen un valor añadido, especialmente en tumores del tipo Luminal A, en donde en general, las recaídas a distancia se producen más allá de los 5 primeros años de seguimiento.

Quiero recordar aquí, que el PEPI score es único factor pronóstico actualmente establecido post HTN. Se basa en una serie de puntos adjudicados valorando cuatro variables. Dos de estas variables son anatómicas (ypT e y pN) y dos biológicas (aumento de Ki-67 y RE en la pieza quirúrgica < 3 según Allred score). Se escogieron estas cuatro variables y no otras, porque en el estudio de Ellis y col; basado en 158 casos del ensayo PO-24, fueron estas cuatro variables las únicas que mostraron significación estadística asociado a SLE y a SECM en el análisis multivariable (156): pT1-2 vs. pT3-4; ( $p < 0,001$ ); afectación patológica de la axila ( $p < 0,009$ ); expresión de RE (Allred <3) ( $p = 0,03$ ) y elevación del Ki67 > de 2.7% veces con respecto al basal ( $p = 0,01$ ).

En nuestra serie destaca que ni la respuesta clínica ni la respuesta radiológica mostraron significación estadística. En el estudio de Cameron y col; (113) las pacientes que presentaron una respuesta parcial presentaron una mejor evolución ( $p < 0,05$ ). En el estudio de Ellis y col; (156) la respuesta clínica sí alcanzó la significación en el análisis univariado ( $p = 0,002$ ), pero no en el análisis multivariable: HR 2,72 (0,95-7,8);  $p = 0,06$ . Por este motivo no forma parte de la puntuación en el PEPI score. Quizás, uno de las causas por el que la respuesta no es un buen factor de pronóstico es por la falta de correlación

entre la respuesta valorada mediante medición física, en relación con la imagen radiológica y la realizada por el patólogo

En nuestro estudio, la presencia de fibrosis, con cortes en 30% y 50%, no mostró ninguna tendencia hacia un mayor o menor ILRD ( $p = 0,83$  y  $p = 0,84$  respectivamente). Tampoco el tamaño del tumor en la pieza quirúrgica (ypT) fue significativo en nuestra serie. Sin embargo, éste si ha sido un factor relevante en otros estudios, como en un estudio retrospectivo italiano efectuado con 144 pacientes en el que un tamaño del tumor residual inferior a 2 cm, se relacionó de forma significativa con mejor SLR ( $p = 0,005$ ) (157), así como en el trabajo de Ellis para el desarrollo del PEPI score, en donde ypT3 o ypT4 eran un factor pronóstico adverso frente a los tumores ypT1-T2 ( $p < 0,001$ ), (156).

Al analizar el porcentaje de células positivas para RP y de Ki-67 en las muestras pre y post HTN, se observó un descenso estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) entre ambas muestras (figuras 29 y 30). Este fenómeno está descrito en la mayor parte de la literatura (83, 103, 108, 112-114). En cambio, no observamos diferencias significativas en el nivel de positividad de los RE pre y post HTN (figura 31). La disminución de Ki-67 en la pieza tumoral con respecto a la biopsia inicial ha mostrado ser un factor significativo de mejor SLR en muchas publicaciones de HTN (103, 113, 114). Pero ni el descenso de Ki-67 ni del RP de nuestra serie, mostraron diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de recaída a distancia. Los 10 casos de nuestra serie que presentaron un aumento del Ki-67 en la pieza quirúrgica con respecto al Ki-67 de la BAG, mostraron una tendencia no significativa a un peor ILRD ( $p =$

0,059) (Figura 55). Quizás con una muestra mayor, esta variable podría haber alcanzado la significación estadística.

En la literatura un valor de Ki-67 basal elevado tampoco marca una menor posibilidad de respuesta a la HTN, en cambio un valor de Ki-67 superior al 10% a las 2-4 semanas de iniciada la HTP, predice por un lado, un mayor valor de Ki-67 en la pieza quirúrgica ( $p= 0,001$ ) y por otro lado, una menor posibilidad de tener un PEPI score 0 ( $p= 0,004$ ) y una peor SLR ( $p= 0,003$ ) (112). En el trabajo para desarrollar el PEPI score, la elevación de Ki-67 por encima de 2.7 veces respecto al valor basal fue otro factor adverso ( $p< 0,001$ ) y fue escogido para puntuar en el citado índice (156) También en el estudio de Grassadonia y colaboradores, el presentar un Ki-67 inferior al 13% en la pieza quirúrgica fue un factor significativo de mejor SLR y SG ( $p = 0,002$ ), aunque en el análisis multivariable perdió la significación estadística a favor de GH y CCM (157).

En todos los trabajos publicados, la pérdida de expresión de RE representa es un claro factor de mal pronóstico ( $p=0,022$ ) e igual ocurre en nuestro estudio. Pero es infrecuentemente que las pacientes que han sido tratadas con HTN durante un tiempo limitado, pierdan la expresión de los RE. e hecho, solo 13 casos de las pacientes del presente estudio presentaban RE por debajo de 50% en la muestra del tumor post HTN. En los 153 casos de la serie que Ellis y colaboradores usaron para validar el PEPI score, solo 16 casos presentaron una valoración de RE post HTN con Allred score inferior a 3, pero estos 16 casos fueron suficientes para demostrar peor SLR de forma estadísticamente significativa ( $p< 0,03$ ), por tanto, aunque poco frecuente es claramente adverso. Lo que pasa es que dado la poca frecuencia con que se

presenta esta disminución en la expresión del RE con HTN, a nivel práctico, el nivel de RE post HTN de pocos meses, no suele ser de gran utilidad.

Como ya he comentado, algo parecido pasa con el aumento de Ki-67. Es poco frecuente que el Ki-67 aumente con HTN, por lo que la mayor parte de puntos adjudicados mediante el PEPI score  $\geq$  a 3 son, habitualmente, debidos al ypT y al ypN y es más raro que sean debidos a la negatividad de los RE o a la elevación del Ki-67. Por estos motivos consideramos de gran importancia encontrar otros biomarcadores en el análisis de los restos de tumor tratado previamente con HTN.

En el estudio ACOSOG Z1031B, se practicaba una determinación de Ki-67 a las 2-4 semanas de iniciar la HTN y, en aquellos pacientes en que el Ki-67 seguía  $>$  10%, se cambiaba la HTN por QT: Solo en 2 de las 38 pacientes que cambiaron se obtuvo pCR (98). Es decir, que no se demuestre sensibilidad precoz a la hormonoterapia, no significa que el tumor sea más sensible a la QT. De hecho, en un estudio sobre 13939 pacientes que recibieron QT neoadyuvante recogidas en el National Cancer Database de los Estados Unidos, el 19% alcanzó la pCR. Pero al analizar por subtipos, la pCR solo ocurrió en el 0,3% de los tumores luminal A (52). Sin embargo, la SG de las pacientes con tumor Luminal A que no alcanzan la pCR es relativamente buena. Por estos motivos, la pCR no es un marcador adecuado para valorar el beneficio o el riesgo a largo plazo para las pacientes con tumores de tipo luminal A.

En nuestro estudio, tanto el GH basal ( $p= 0,002$ ) como post HTN (grado I vs grado II o III;  $p<0,001$ ) fue significativo. En el estudio de Ellis un GH 1 del tumor también fue significativo en el análisis univariado ( $p< 0,001$ ), pero sin

embargo, en el análisis multivariable perdió la significación: HR 4,62 (0,6-35,0). Por este motivo, finalmente fue desestimado para ser incluido en el PEPI score (156). Observamos un leve aumento, no significativo, del número de tumores de grado histológico 3 (una diferencia absoluta del 6%) entre la biopsia inicial a la de la pieza quirúrgica (tabla 10). Paralelamente observamos un descenso absoluto del 5% de tumores de GH 1.

En el análisis multivariable de todos los factores clínicos y anatómopatológicos por H&E y por IHQ, se observó que solo tres variables tuvieron una significación estadística independiente: dos eran clínicas; el estadio III vs II y la mastectomía vs cirugía conservadora. Estas dos variables no aportan ninguna novedad, puesto que ya sabemos que a mayor estadio hay mayor riesgo de recaída y que la tasa de mastectomías aumenta a mayor tamaño tumoral. La otra variable era biológica, era la presencia de una mutación de p53. La mutación del gen de p53 es la mutación más frecuente en el cáncer de mama (30-35%), pero es mucho más frecuente en tumores RE negativos (80%) que positivos. Tal como se comentó ampliamente en la introducción, la proteína p53 es una proteína supresora tumoral que está involucrada en el ciclo celular regulando el paso G1 a S. Si p53 está activa, detiene el ciclo celular en el punto de control G1/S o G2/M para iniciar la reparación del DNA, y si esta reparación no es posible, inicia el proceso de apoptosis. Pero p53 presenta isoformas, algunas de las cuales funcionan como activadoras, mientras que otras funcionan como negativas dominantes. Aunque la p53 mutada ha demostrado ser un factor pronóstico adverso en varios tumores, incluido el cáncer de mama, su papel sigue siendo controvertido, porque los estudios han mostrado tasas de incidencia dispares, y porque no suele ser un

factor de pronóstico independiente. Por ello, actualmente en la práctica asistencial, no es recomendado como un factor pronóstico ni predictivo. Un estudio del grupo IBCSG sobre muestras 1113 muestras tumorales incluidos en dos ensayos clínicos aleatorios en cáncer de mama con ganglios negativos demostró que la expresión de p53 fue significativamente más frecuente cuando el RE estaba ausente (59%) que cuando el RE estaba presente (19%),  $p < 0,0001$ . Pero lo más interesante es que se observó una interacción cualitativa significativa, de modo que la expresión de p53 se asoció con una mejor SLE y SG entre los pacientes cuyos tumores no expresaron RE, pero peor SLR y peor SG entre pacientes cuyos tumores expresaron RE. Por tanto, la interpretación sobre la influencia que ejerce la expresión de p53 en el pronóstico requiere el conocimiento de la expresión concurrente de RE (164). En nuestro estudio p53 estuvo correlacionada significativamente con BCL-2 ( $p = 0,017$ ) y con ROR-S ( $p = 0,019$ ).

Los tumores que presentan una mutación de p53 tendrán problemas para activar la entrada en apoptosis y permitirán que las células anormales proliferen. La acción inhibidora de la proliferación celular de p53 se produce a través de p21 (figura 12). p21 actúa inhibiendo las CDK y evitando la fosforilación de RB, de manera que el factor de transcripción E2F permanece inactivo y se impide la progresión de la célula hacia la fase S. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente a p53 humana que pueden utilizarse para realizar estudios de IHQ sobre tejidos incluidos en parafina y, aunque todavía no disponemos en la clínica de un fármaco específico contra p53, se están desarrollando diversos compuestos que han mostrado actividad en modelos de cáncer de mama, como PRIMA-1, APR-246, PK11007 y COTI-2

(165). Pero hay que tener en cuenta que, al actuar p53 a nivel del ciclo celular inhibiendo CDK4-6 a través de p21, es posible que los fármacos inhibidores de CDK 4-6 puedan ser más activos en pacientes con p53 mutada. Esto no está demostrado, de hecho no se ha podido encontrar ningún biomarcador ligado a la eficacia de los inhibidores CDK 4-6 en pacientes con cáncer de mama avanzado.

Además de p53, otros biomarcadores ligados al ciclo celular fueron estadísticamente significativos en el análisis univariado del presente estudio como la p16 negativa en núcleo y BCL2, tanto con corte inferior a 25% como inferior a 50% de células. En cambio ni CD1 ( $p = 0,96$ ), ni pRB ( $p = 0,93$ ) mostraron ninguna diferencia. La mutación inicial del gen de RB es muy rara en el cáncer de mama y las mutaciones adquiridas tardan mucho en desarrollarse, por lo que no es sorprendente el resultado negativo en los estudios. En cáncer de mama metastásico, ninguno de estos factores ha demostrado significación con respecto a mayor o menor eficacia del tratamiento con inhibidores de CDK 4-6. Los datos de dos ensayos clínicos aleatorizados, PALOMA-1, PALOMA-2, MONALEESA y MONARCH tampoco mostraron ninguna correlación entre los niveles de CD1 ni de la proteína p16 y la posibilidad de respuesta o de mejor supervivencia a palbociclib, ribociclib o abemaciclib (166-169).

Una novedad que aporta el presente estudio, es el valor como factor pronóstico adverso de la p16 negativa en el núcleo de la célula tumoral. Como ya se expuso en la introducción, p16 es un gen supresor que actúa frenando las CDK 4-6 y bloquea la división celular. Pero lo más atractivo de este hallazgo es que actualmente disponemos de fármacos dirigidos contra CDK4-6, que ya han mostrado impacto en supervivencia libre de progresión y SG en el

tratamiento del cáncer de mama avanzado (166-169) y hay estudios Fase III en adyuvancia y de fase II en neoadyuvancia, pendiente de publicar resultados. Nuestro estudio demuestra que la negatividad de p16 es un signo de hormono-resistencia. Podemos hipotetizar que la administración de inhibidores de CDK 4-6 en los casos con p16 negativa y/o p53 mutada tras HTN podría mejorar el pronóstico de estas pacientes, especialmente en casos PEPI score > 3 o ypN1-2. Por ello, creemos que sería oportuno poner en marcha estudios prospectivos para refrendar esta hipótesis.

BCL2, es otra de las proteínas que regulan el ciclo celular, en este caso por inducción de la apoptosis. Algunos estudios asociaron expresión de BCL-2 a una mejor respuesta a la hormonoterapia y a una mejor SLR y SG (107), pero esto no se confirmó en otros estudios. Otros autores aseguran que la apoptosis, no es un predictor útil del beneficio de la HTN (145). Por el contrario, en nuestro estudio, BCL2 < 50% fue un claro factor adverso en el análisis univariado y se mantuvo como un factor independiente en el estudio multivariable de los factores evaluados por IHQ. Desafortunadamente no disponemos de un fármaco que actúe de forma específica a este nivel. Al analizar la correlación de BCL2 con otros biomarcadores encontramos que está correlacionado con p53 ( $p = 0,017$ ) con GH ( $p = 0,001$ ) y con ROR ( $p = 0,004$ )

En cuanto a marcadores que evalúan la vía de señal intracelular PI3K/AKT/mTOR, se observó en el análisis univariante que la pS6 negativa en citoplasma de la célula tumoral y la expresión de pS6 inferior a 25% en las células del estroma eran factores significativos con respecto a peor ILRD. También en los análisis multivariable que incluyeron ROR de PAM50 y RA, pS6 negativo en la célula tumoral fue un factor adverso significativo. Sabemos que

la vía PI3K-AKT-mTOR está frecuentemente alterada en tumores que muestran hormono-resistencia, sobre todo de tipo adquirido. La proteína quinasa ribosomal S6K (pS6) es un efector del complejo mTORC1. mTORC1 fosforila y activa las proteínas S6K1 y S6K2, cuyo primer sustrato es pS6. Todavía no se conoce del todo bien, el papel fisiológico del complejo mTOR. Sabemos que el eje mTOR-pS6 controla procesos celulares fundamentales, incluida la transcripción, la traducción, la síntesis de proteínas y el crecimiento y el metabolismo celular. La desregulación de este eje de señal, contribuye al desarrollo de la enfermedad y se cree que pS6 promueve la proliferación celular y la supervivencia celular y puede producir la activación de los RE con independencia de su ligando (147).

Nuestros resultados son paradójicos, puesto que, si pS6 es negativa, la vía mTOR debería ser menos activa y por tanto se suele asociar positividad de pS6 con peor SG y resistencia al tratamiento. Pero como ya comenté en la introducción, aunque se cree que pS6 promueve la proliferación y la supervivencia celular y puede producir la activación de los RE con independencia de su ligando (148), en realidad, los detalles moleculares por los que se produce proliferación por el complejo mTORC1 siguen siendo poco conocidos, y la sobreexpresión de rapamicina-proteína pS6 puede conferir un fenómeno contrario por retroalimentación negativa mediada el complejo mTORC1 y así niveles bajos de pS6 provocarían la progresión celular. Estudios realizados durante la última década han descubierto una serie de sustratos S6K1 adicionales (148).

Actualmente disponemos de fármacos activos en esta vía, como por ejemplo alpelisib, tselisib y sobre todo everolimus, un inhibidor de específico

de mTOR (figura 13). Según nuestros resultados, no parece que el everolimus debiera jugar un papel importante en el tratamiento de las pacientes tratadas con HTN y con pS6 negativo en el tumor residual, puesto que aunque han tenido peor ILRD, tienen inactivada la vía mTOR. Por tanto sería mejor explorar otro tipo de tratamientos en futuros ensayos con este tipo de pacientes.

Otros factores, en parte relacionados con la vía PI3K-AKT mTOR, como VAV3 ( $p = 0,07$ ) o SOX9 (0,76) no se mostraron significativos en nuestro estudio.

CD44, un factor de adherencia y migración celular, tampoco mostró ninguna tendencia en nuestro estudio ( $p = 0,84$ ). Pero en cuanto a factores de microambiente y estroma, encontramos que pS6 < 25% era un factor significativo de pero ILRD ( $p = 0,041$ ).

La sinaptofisina, como un marcador de tumores neuroendocrinos, tampoco se mostró significativa ( $p = 0,76$ ).

Con respecto a la expresión de HER2 hemos de decir que aunque en nuestro estudio no fue significativa ( $p = 0,33$ ), pero debemos considerar que este resultado no es valorable puesto que en solo tres casos se objetivo sobreexpresión de HER2.

Al realizar un análisis multivariable con PEPI score junto a otros valores significativos en el análisis univariante, pero que no puntúan para PEPI score, como GH, p16 y p53, encontramos que p16 con una HR 5 (IC95%: 1,17-21,9) y p53 con HR 0,22 (IC95% 0,08-0,59) son valores significativos independientes. En un análisis Chi cuadrado de GH frente a PEPI score no encontramos una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables. Podemos decir que, en nuestro estudio, las proteínas que regulan el ciclo celular juegan

un papel importante en la resistencia a la hormonoterapia y que la evaluación de p16, p53 y BCL-2 aporta un valor añadido a PEPI score.

Otro aspecto novedoso de este estudio es el análisis de expresión de ARN mediante la técnica de ncounter®, que incluye la plataforma PAM50. Los resultados mostraron que el 50% de los tumores eran del subtipo luminal A, 21% del subtipo Normal y 14% HER-2 enriquecido y solo un caso era luminal B (0,8%) y otro caso era basal (0,8%). Llama la atención la práctica inexistencia de tumores del tipo luminal B. Con toda seguridad, hubo un sesgo deliberado en la selección de pacientes para este tipo de tratamiento (pacientes postmenopáusicas añosas que presentaban tumores con receptores hormonales positivos y casi todas con HER2 negativo en la BAG). Pero no hubo discriminación por GH, Ki-67 o estado del RP. De hecho, si atendemos a la presencia de GH3, Ki-67 >20 o RP <20, al menos un 22% de los casos eran del tipo luminal B “like” en la BAG diagnóstica. Un reciente estudio “real-world data” holandés, ha demostrado que la discordancia en la evaluación de GH, RE, RP y HER-2 por IHQ entre la BAG y la pieza tumoral es poco frecuente (170). Otro estudio reciente sobre 16 muestras apareadas, ha confirmado que hay una correlación muy fuerte entre la valoración de la expresión de proteínas por IHQ y por el sistema ncounter® (171). Por todo esto, creemos que la ausencia de tumores de tipo luminal B, aunque en parte es debido a la selección inicial, también puede ser debido a la evolución de un tumor heterogéneo sometido a un tratamiento. Esta hipótesis podrá ser contestada con diversos ensayos como el estudio Coraleen que analiza las variaciones de ROR entre la BAG inicial y la del tumor residual tras HTN y ribociclib y cuyos primeros resultados van a ser comunicados en el próximo simposio de San

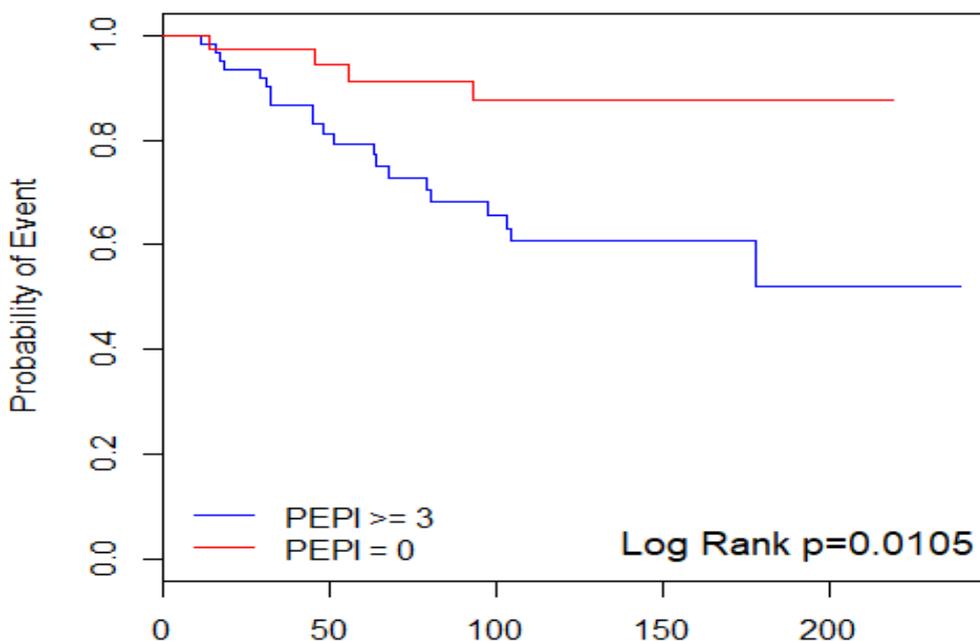
Antonio; o el estudio DxCartes que analizará las variaciones del RS de Oncotype entre la BAG inicial y la cirugía post HTN más palbociclib.

Desafortunadamente, en la mayoría de los casos de nuestra serie hemos agotado el material de la BAG diagnóstica con diferentes estudios, por lo que no es posible llevar a cabo un estudio de muestras apareadas. Esta es una de las limitaciones de este estudio.

En esta serie no se han evidenciado diferencias en ILRD entre los 59 casos del subtipo luminal A, los 25 Normal y los 17 de HER2 enriquecido. A pesar de que ninguna paciente recibió terapia específica anti HER2, los 17 pacientes con tumores HER2 enriquecido identificados mediante PAM 50, no mostraron peor ILRD. Es probable que estos tumores HER2 enriquecido tras HTN, mantengan una dependencia con la vía del RE y que la vía HER2 juega un papel menor. Nuestros resultados difieren de los de Guerrero y colaboradores, que comunicaron en una serie de solo 57 casos de mujeres postmenopáusicas tratadas con letrozol neoadyuvante, que las pacientes con tumores de tipo luminal A mostraron una mejor SLR que las pacientes con HER2 enriquecido (172).

Un 21% de tumores fueron clasificados como de tipo Normal por PAM50. Observamos que los tumores de tipo Normal correlacionaban de forma significativa con una menor tasa de células tumorales en la muestra en comparación con los subtipos Luminal A ( $p < 0,001$ ) y HER2 enriquecido ( $p = 0,045$ ). Pero creemos que en la mayor parte de los casos, el tumor estaba bien clasificado porque en casi todos los casos el porcentaje de células tumorales en la muestra era mayor del 30% y porque, además, cuando realizamos un análisis del PEPI score, excluyendo los tumores de tipo Normal, las curvas de

ILRD mantuvieron la significación estadística en la misma proporción que cuando se incluyeron los tumores de tipo Normal (figura 65).



*Figura 65: Curvas de ILRD sin tumores tipo Normal*

ROR de PAM50 ha demostrado valor pronóstico y de predicción a la quimioterapia adyuvante en cáncer de mama precoz con unos valores predeterminados de riesgo bajo (<40), intermedio (40-60) y alto (>60) (37). En nuestro estudio el resultado de ROR-S mostró diferencias estadísticamente significativas con un mejor pronóstico para los tumores de riesgo bajo con respecto a los de riesgo intermedio, con HR 0.39 (95%CI 0.17-0.91) y  $p = 0.001$ . Los 6 casos ROR-S alto no fueron significativamente

peor que los ROR-S intermedio. El relativo buen pronóstico de los ROR-S de alto riesgo de nuestra serie no se puede atribuir al efecto de la QT adyuvante, puesto que ninguna de las 7 pacientes que recibieron QT adyuvante presentaba un ROR-S alto (tabla 30).

		ADY Quimioterapia		Total
		Sí	No	
ROR.S.Group.	Low	5	61	66
.Subtype.Only.	Medium	2	29	31
	High	0	6	6
Total		7	96	103

*Tabla 30: Quimioterapia adyuvante y nivel ROR*

Pensamos que la muestra de casos de PAM50 de alto riesgo es tan escasa, que es muy poco representativa.

En cambio, ROR-P no mostró ninguna diferencia en cuanto a ILRD.

Se han publicado los resultados de algunos estudios que valoran el papel Oncotype®, la plataforma con 21 genes, como predictor de la respuesta a la HTN (97,118) pero hemos de destacar que este, es el primer trabajo que demuestra el valor de ROR de PAM50 como factor del pronóstico después de HTN.

Otra novedad que aporta el presente estudio es que una expresión muy baja (<-2) del gen RA medida por ncounter®, mostró una relación significativa con el ILRD en el análisis univariante y multivariable HR de 3,72 (IC95 1,27-10,96) y p = 0,007 (Figura 63). Curiosamente la expresión de RA valorada por IHQ no mostró ninguna significación (figura 66).

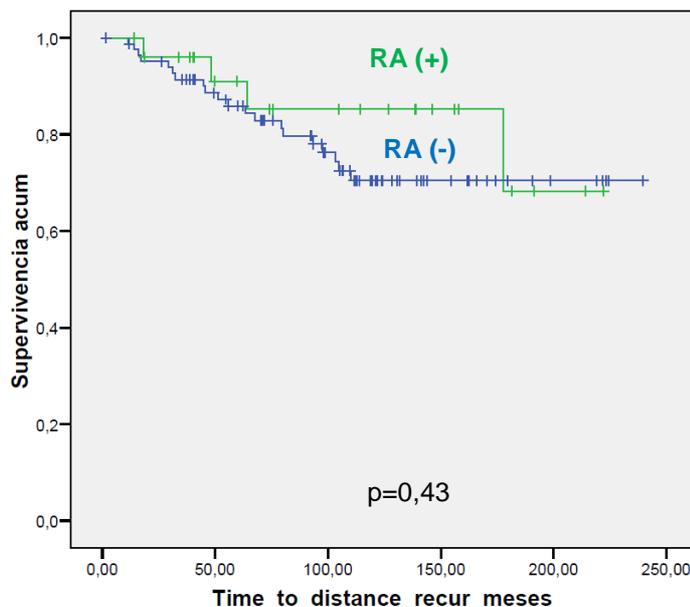


Figura 66: Curvas de ILRD en función del RA valorado por IHQ

Los estudios epidemiológicos son inconsistentes en cuanto al valor pronóstico de los RA, pero varios artículos han informado que la presencia de RA es un factor de buen pronóstico en el cáncer de mama (173-175). Los RA están expresado en el 60-80% de los cánceres de mama, con mayor prevalencia en los tumores que también expresan RE. Los tratamientos con andrógenos inhiben la señal de la vía RE y de hecho antiguamente se usaba como una cuarta línea de tratamiento hormonal en cáncer de mama avanzado pero dejó de usarse por sus efectos secundarios. Lo que es queda más en duda en la literatura es su papel como factor de predicción a un tipo de tratamiento hormonal u otro. Recientemente un subanálisis del ensayo fase III adyuvante BIG 1-98, ha reportado datos negativos del RA como factor predictivo con respecto a la eficacia de la hormonoterapia, tanto con TAM como con LET (176). Quizás los datos negativos del RA valorado mediante IHQ de nuestro estudio sean debidos a que la determinación de los RA por IHQ solo

fue positiva en 26 casos (23,6%), que contrasta con el 60-80% reportada en la literatura. Entre los 26 casos con expresión de RA hubo solo 4 eventos en forma de metástasis (15,4% de los casos). La determinación del gen RA con un punto de corte en -2 dividió los casos en 48 casos que tenían  $RA \geq -2$ , entre los cuales solo se dieron 4 eventos de metástasis (8,3%) y en 55 casos que tenían  $RA < -2$ , entre los que hubo 19 eventos (34,5%). Todo ello sugiere que el análisis de secuenciación del RA por técnica de ncounter® clasifica con mayor precisión RA en los tumores que la IHQ.

Ninguno de los genes ligados a la inmunidad que analizamos por secuenciación de ncounter® mostró significación (PDL-1, PD1 y CD4) Solo CD8a mostro una tendencia no significativa (figura 63). Esto no nos debe extrañar, teniendo en cuenta que los tumores luminal A, hasta son los que han mostrado menos actividad inmune y que no administramos ningún tipo de inmunoterapia

Cuando se incluyó en el análisis multivariable ROR-S y RA medido por secuenciación de ARN, las variables con significación estadística fueron p53 mutada HR 3,86 (IC 95%: 1,19-12,51), pS6 (-) en citoplasma de célula tumoral HR 4,92 (IC 95%: 1,86-13,03),  $RA > -2$  HR 5,34 (IC 95% 1,59-17,89) y ROR-S intermedio HR 3,21 (IC 95%: 1,15-9,01), perdiendo p16 la significación estadística. Realizamos una prueba de Chi cuadrado para valorar si p16 y RA eran variables independientes y encontramos que están correlacionadas  $p=0024$  (tabla 27).

Este análisis multivariable demuestra que **ROR-S y AR** son factores de pronóstico independientes, y por tanto, **añaden información a PEPI score** y

podrían ser valorados a la hora de decidir el tratamiento adyuvante más oportuno para cada paciente.

Mediante el análisis de Chi cuadrado de Pearson ( $p=0,019$ ), observamos que p53 y ROR-S son variables correlacionadas (Tabla 24). En cambio, p16 es independiente de ROR-S (Chi Cuadrado: 0,697) y pS6 es independiente tanto de ROR-S como de RA. También evidenciamos mediante prueba de Chi cuadrado que BCL-2 esta correlacionado con p53 ( $p=0,017$ ), con GH ( $p=0,001$ ) y con ROR-S ( $p=0,004$ ) y que GH también correlaciona con ROR-S ( $p=0,001$ ).

## **6. CONCLUSIONES:**



1. **La Hormonoterapia neoadyuvante (HTN) es una alternativa eficaz y eficiente** en las pacientes con cáncer de mama de tipo luminal en estadio II o III.
2. Este estudio **confirma el valor pronóstico del “PEPI score” en una serie con largo seguimiento.**
3. Como factores pronóstico valorados mediante IHQ en el tumor residual mostraron significación estadística 3 variables relacionadas con el control del ciclo celular (**p53 mutada** HR 3,63 (IC 95%: 1,39-19,63); **p16 negativa** HR 3,21 (IC 95%: 1,12-12-79) y **BCL2 < 25%** HR 2,86 (IC 95%: 1,22-6,74) y una con la vía mTOR (**pS6**)
4. **ROR-S de PAM50 y expresión de Receptor de Andrógeno (RA) medido por secuenciación de ARN, después de HTN tiene valor pronóstico significativo independiente** y aportan información pronóstica independiente a PEPI score.
5. Aquellas pacientes tratadas con HTN, con **PEPI score  $\geq 3$**  y que presenten en el tumor residual **p53 mutada, p16 negativa en el núcleo, pS6 negativa en citoplasma, BCL2 < 50%, ROR-s de riesgo intermedio/alto o una expresión de RA < -2** medido por secuenciación de RNA, presentan mayor riesgo de presentar metástasis a distancia y

por tanto, **son tributarias de añadir algún tratamiento adyuvante a la hormonoterapia convencional a fin de mejorar su pronóstico**

## **7. LINEAS DE FUTURO**



## 7. Líneas de Futuro

Los resultados del presente estudio sustentan el llevar a cabo estudios en, al menos, dos líneas de actuación:

1. Estudios de adyuvancia tras HTN con inhibidores de CDK 4-6 junto a hormonoterapia en los casos con p16 negativa o p53 mutada.
2. Estudios de neoadyuvancia hormonal junto con inhibidores de CDK 4-6. En esta línea hay estudios fase II en marcha que por el momento han demostrado una mayor disminución estadísticamente significativa de Ki-67, pero sin un aumento de la tasa de respuestas. Es necesario un seguimiento más prolongado de estas pacientes para demostrar que la mayor disminución del Ki-67 significa un mejor control de la enfermedad a largo plazo. Pero probablemente necesitaremos de los datos de estudios de fase III para llegar a una conclusión definitiva de que tipo de pacientes se beneficiarán de los inhibidores de CDK4-6 en adyuvancia. Creemos que una buena manera para seleccionar o estratificar a las pacientes en estos estudios sería el análisis de ROR de PAM50 y secuenciación del RA por ncounter® o de p16, p 53 y BCL-2 por IHQ.



## **8. BIBLIOGRAFIA**



1. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer*. 2001; 8(1):47–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350726>
2. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799–825.
3. Smith BD, Smith GL, Hurria A, Hortobagyi GN, Buchholz TA. Future of cancer incidence in the United States: Burdens upon an aging, changing nation. *J Clin Oncol*. 2009;27(17):2758–65.
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Reprint of: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2015;51(9):1201–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
5. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: Results of EURO CARE-5 - A population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):23–34.
6. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver MJ. WHO classification of tumours of the breast (World Health Organization Classification of Tumours). En: World Health Organization 2012, editor. 4th ed.
7. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H K-VJ, McMichael JF, et al. Network CGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; 490(7418):61–70.
8. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100(14):8418–23.
9. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100(18):10393–8.
10. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367–74.
11. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.
12. McCafferty MPJ, Healy NA, Kerin MJ. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathol*. 2009;15(10):485–9.
13. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*. 2007;25(10):1239–46.
14. Jenkins EO, Deal AM, Anders CK, Prat A, Perou CM, Carey LA, et al. Age-Specific Changes in Intrinsic Breast Cancer Subtypes: A Focus on Older Women. *Oncologist*. 2014;19(10):1076–83.
15. Prat A, Parker JS, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(1):301–6.
16. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer.[erratum appears in JAMA. 2006; 295(14):1658–67.
17. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, et al. Chemotherapy Is More Effective in Patients with Breast Cancer Not Expressing

- Steroid Hormone Receptors : A Study of Preoperative Treatment. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6622–8.
18. Precht LM, Lowe KA, Atwood M, Beatty JD. Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Cancer: Tumor Markers as Predictors of Pathologic Response, Recurrence, and Survival. *Breast J.* 2010.
  19. De Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, Mulder L, Straver ME, Vrancken Peeters MJTFD, et al. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(1):119–26.
  20. Esserman LJ, Berry DA, Cheang MCU, Yau C, Perou CM, Carey L, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in Neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: Results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):1049–62.
  21. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5678–85.
  22. Beatson G. On the treatment on inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet.* 1896;2:58–62.
  23. Klijn JGM, Beex LVAM, Mauriac L, Zijl JA Van, Wildiers J, Jassem J, et al. Combined Treatment With Buserelin and Tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: A randomized study. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(11): p.903-911
  24. Nabholz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A et al. Anastrozole Is Superior to Tamoxifen as First-Line Therapy for Advanced Breast Cancer in Postmenopausal Women : Results of a North American Multicenter. *J Clin Oncol.* 2000;18(22):3758–67.
  25. Mouridsen H, Gershonovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol.* 2001;19(0732–183X SB–IM):2596–606.
  26. Paridaens R. Mature results of a randomized phase II multicenter study of exemestane versus tamoxifen as first-line hormone therapy for postmenopausal women with metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14(9):1391–8.
  27. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011; 378(9793):771–84.
  28. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC ( Arimidex , Tamoxifen , Alone or in Combination ) trial after completion of 5 years ' adjuvant. *Lancet.* 2005;365:60–2.
  29. Jakesz R, Jonat W, Gnani M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG Trial 8 and the ARNO 95 Trial. *The Lancet.* 2005; 366:455–62.
  30. Coates AS, Keshaviah A, Thürlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer:

- Update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):486–92.
31. Coombes R, Kilburn L, Snowdon C, Paridaens R, Coleman R, Jones S, et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369(9561):559–70.
  32. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1134–50.
  33. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(8):717–29.
  34. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2005–14.
  35. Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G, Price KN, Crivellari D, Snyder RD, et al. Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: Results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol*. 2013; 31(25): 3083-3090.
  36. Ribelles N, Perez-Villa L, Jerez JM, Pajares B, Vicioso L, Jimenez B, et al. Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. *Breast Cancer Res*. 2013;15(5).
  37. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar;27(8):1160–7.
  38. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(18);6012–20
  39. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, et al. Recommendations From an International Expert Panel on the Use of Neoadjuvant ( Primary ) Systemic Treatment in Primary Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2012; 19(5): 1508–1516
  40. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2147–59.
  41. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2003;21(22):4165–74.
  42. Krishnamurthy S, Sneige N, Bedi DG, Edieken BS, Fornage BD, Kuerer HM, et al. Role of ultrasound-guided fine-needle aspiration of indeterminate and suspicious axillary lymph nodes in the initial staging of breast carcinoma. *Cancer*. 2002; 95(5):982-8.
  43. Sabel MS, Schott AF, Kleer CG, Merajver S, Cimmino VM, Diehl KM, et al. Sentinel node biopsy prior to neoadjuvant chemotherapy. *Am J Surg*. 2003; 40 (2): 60-6
  44. Mamounas EP, Brown A, Anderson S, Smith R, Julian T, Miller B, et al. Sentinel

- node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: Results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2005; 23(12):2694-702
45. Dixon JM, Anderson TJ, Miller WR. Neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer: a surgical perspective. *Eur J Cancer.* 2002;38(17):2214–21.
  46. Duch J, Fuster D, Muñoz M, Fernández PL, Paredes P, Fontanillas M, et al. 18F-FDG PET/CT for early prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009; 36 (10): 1551–1557
  47. Linden HM, Stekhova SA, Link JM, Gralow JR, Livingston RB, Ellis GK, et al. Quantitative fluoroestradiol positron emission tomography imaging predicts response to endocrine treatment in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2793–9.
  48. Boughey JC, McCall LM, Ballman K V., Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, et al. Tumor biology correlates with rates of breast conserving surgery and pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer findings from the ACOSOG Z1071 (alliance) prospective multicenter clinical trial. In: *Annals of Surgery.* 2014; 260(4): 608-616.
  49. Straver ME, Rutgers EJT, Rodenhuis S, Linn SC, Loo CE, Wesseling J, et al. The relevance of breast cancer subtypes in the outcome of neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(9): 2411–2418
  50. Von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for Her2-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2008;366(4):299–309.
  51. Alba E, Calvo L, Albanell J, De la Haba JR, Arcusa Lanza A, Chacon JI, et al. Chemotherapy (CT) and hormonotherapy (HT) as neoadjuvant treatment in luminal breast cancer patients: Results from the GEICAM/2006-03, a multicenter, randomized, phase-II study. *Ann Oncol.* 2012;23(12):3069–74.
  52. Chen R, Ye Y, Chengcheng Y, Peng Y, Zong B, Qu F, et al. Assessment of the predictive role of pretreatment Ki-67 and Ki-67 changes in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy according to the molecular classification: a retrospective study of 1010 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 170: 35-43.
  53. Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res and Treat.* 2018; 170 (3):559–567
  54. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau S, Broglio K, Hortobagyi GN. Invasive Lobular Carcinoma Classic Type: Response to Primary Chemotherapy and Survival Outcomes. *J Clin Oncol* 2005; 23(1): 41-48.
  55. Huober J, Von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: Overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 124(1): 133–140
  56. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2012; 30(15):1796-804.
  57. Chiba A, Hoskin TL, Heins CN, Hunt KK, Habermann EB, Boughey JC. Trends in neoadjuvant endocrine therapy use and impact on rates of breast conservation in hormone receptor-positive breast cancer: A National Cancer Data Base Study. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(2):418–24.

58. Yancik R, Reis LG, Yates JW. Breast cancer in aging women. *Cancer*. 1989; 63:976–81.
59. Pierga JY, Girre V, Laurence V, Asselain B, Diéras V, Jouve M, et al. Characteristics and outcome of 1755 operable breast cancers in women over 70 years of age. *Breast*. 2004; 13(5):369-75
60. Preece PE, Wood RA, Mackie CR CA. Tamoxifen as initial sole treatment of localised breast cancer in elderly women: a pilot study. *Br Med J*. 1982;284:869–72.
61. Horobin JM, Preece PE, Dewar JA, Wood RAB, Cuschieri A. Long-term follow-up of elderly patients with locoregional breast cancer treated with tamoxifen only. *British Journal Cancer*. 1991; 72(5): 1251–1255.
62. Bergman L, Dongen JA Van, Ooijen B Van, Leeuwen EE Van. Should Tamoxifen be a primary-treatment choice for elderly breast-cancer patients with locoregional disease. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;34(1):77–83.
63. Akhtar SS, Allan SG, Rodger A, Chetty UD, Smyth JF LR. A 10-year experience of tamoxifen as primary treatment of breast cancer in 100 elderly and frail patients. *Eur J Surg Oncol*. 1991;17(1):30-35.
64. Gazet JC, Ford HT, Coombes RC, Bland JM, Sutcliffe R, Quilliam J LS. Prospective randomized trial of tamoxifen vs surgery in elderly patients with breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 1994;20:207–214.
65. Robertson JF, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Mastectomy or tamoxifen as initial therapy for operable breast cancer in elderly patients: 5-year follow-up. *Eur J Cancer*. 1992;28A(4–5):908–10.
66. Fentiman IS, Christiaens M-R, Paridaens R, Van Geel A, Rutgers E, Berner J, et al. Treatment of operable breast cancer in the elderly: a randomised clinical trial EORTC 10851 comparing tamoxifen alone with modified radical mastectomy. *Eur J Cancer*. 2003;39:309–16. Available from: [www.ejconline.com](http://www.ejconline.com)
67. Bates T, Riley DL, Houghton J, Fallowfield L. Three hundred and eighty-one women with operable breast cancer aged over 70 years were randomly allocated to 40 mg tamoxifen daily and optimal surgery or to tamoxifen. *Brit J Surg*. 1999; 78: 591–594.
68. Mustacchi G, Ceccherini R, Milani S, Pluchinotta A, De Matteis A, Maiorino L, et al. Tamoxifen alone versus adjuvant tamoxifen for operable breast cancer of the elderly: Long-term results of the phase III randomized controlled multicenter GRETA trial. *Ann Oncol*. 2003;14(3):414–20.
69. Fennessy M, Bates T, MacRae K, Riley D, Houghton J, Baum M. Late follow-up of a randomized trial of surgery plus tamoxifen versus tamoxifen alone in women aged over 70 years with operable breast cancer. *Br J Surg*. 2004;91(6):699–704.
70. Hind D, Wyld L, Beverley CB, Reed MW. Surgery versus primary endocrine therapy for operable primary breast cancer in elderly women (70 years plus). *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(1):CD004272.
71. Buzdar AU, Hortobagyi GN. Tamoxifen and toremifene in breast cancer: Comparison of safety and efficacy. *J Clin Oncol [Internet]*. 1998;16(1):348–53.
72. Holli K, Valavaara R, Blanco G, Kataja V, Hietanen P, Flander M et al. Safety and efficacy results of a randomized trial comparing adjuvant toremifene and tamoxifen in postmenopausal patients with node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(20):3487–94.
73. Gil JM. Tratamiento hormonal primario del cáncer de mama. *FMC Oncol*. 2009;4(11):15–28.
74. Dixon JM, Renshaw L, Bellamy C, Stuart M, Hoctin-boes G, Miller WR. The

- Effects of Neoadjuvant Anastrozole ( Arimidex ) on Tumor Volume in Postmenopausal Women with Breast Cancer : A Randomized , Double-Blind , Single-Center Study 1. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:2229–35.
75. Dixon JM, Love CD, Bellamy CO, Cameron D a, Leonard RC, Smith H, et al. Letrozole as primary medical therapy for locally advanced and large operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001; 66(3):191–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11510690>
  76. Baselga J, Semiglazov V, Van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J, et al. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(16):2630–7.
  77. Mlineritsch B, Tausch C, Singer C, Luschin-Ebengreuth G, Jakesz R, Ploner F, et al. Exemestane as primary systemic treatment for hormone receptor positive post-menopausal breast cancer patients: A phase II trial of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSG-17). *Breast Cancer Res Treat.* 2008;112(1):203–13.
  78. Barnadas A, Gil M, González S, Tusquets I, Muñoz M, Arcusa A, et al. Exemestane as primary treatment of oestrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: A phase II trial. *Br J Cancer.* 2009;100(3):442–9.
  79. Takei H, Suemasu K, Inoue K, Saito T, Okubo K, Koh J, et al. Multicenter phase II trial of neoadjuvant exemestane for postmenopausal patients with hormone receptor-positive, operable breast cancer: Saitama Breast Cancer Clinical Study Group (SBCCSG-03). *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(1):87–94.
  80. Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J, Llombart-Cussac A, Eremin J, Vinholes J et al. Letrozole in the neoadjuvant setting: the P024 trial. *Ann Oncol.* 2001;12:1572–1532.
  81. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: The Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined With Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):5108–16.
  82. Cataliotti L, Buzdar AU, Noguchi S, Bines J, Takatsuka Y, Petrakova K, et al. Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: The Pre-Operative “Arimidex” Compared to Tamoxifen (PROACT) trial. *Cancer.* 2006;106(10):2095–103.
  83. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Lin L, Snider J, Prat A, et al. Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: Clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based int. *J Clin Oncol.* 2011;29(17):2342–9.
  84. Masuda N, Sagara Y, Kinoshita T, Iwata H, Nakamura S, Yanagita Y, et al. Neoadjuvant anastrozole versus tamoxifen in patients receiving goserelin for premenopausal breast cancer (STAGE): A double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(4):345–52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70373-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70373-4)
  85. Lerebours F, Rivera S, Mouret-Reynier MA, Alran S, Venat-Bouvet L, Kerbrat P, et al. Randomized phase 2 neoadjuvant trial evaluating anastrozole and fulvestrant efficacy for postmenopausal, estrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer patients: Results of the

- UNICANCER CARMINA 02 French trial. *Cancer* 2016; 122: 3032–3040
86. Spring LM, Gupta A, Reynolds KL, Gadd MA, Ellisen LW, Isakoff SJ, et al. Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer a systematic review and meta-Analysis. *JAMA Oncol.* 2016;2(11):1477–86.
  87. Dixon JM, Renshaw L, MacAskill EJ, Young O, Murray J, Cameron D, et al. Increase in response rate by prolonged treatment with neoadjuvant letrozole. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(1):145–51.
  88. Llombart-Cussac A, Guerrero Á, Galán A, Carañana V, Buch E, Rodríguez-Lescure Á, et al. Phase II trial with letrozole to maximum response as primary systemic therapy in postmenopausal patients with ER/PgR[+] operable breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2012;14(2):125–31.
  89. Sandison CAJR, Park R, Green FO, Uk TTN. Breast conservation or mastectomy: Treatment choice of women aged 70 Years and Older. *British Journal of Surgery*; 1996;994–6.
  90. Merchant TE, McCormick B, Yahalom J, Borgen P. The influence of older age on breast cancer treatment decisions and outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;34(3):565–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621279>
  91. Carpenter R, Doughty JC, Cordiner C, Moss N, Gandhi A, Wilson C, et al. Optimum duration of neoadjuvant letrozole to permit breast conserving surgery. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144(3):569–76.
  92. Allevi G, Strina C, Andreis D, Zanoni V, Bazzola L, Bonardi S, et al. Increased pathological complete response rate after a long-term neoadjuvant letrozole treatment in postmenopausal oestrogen and/or progesterone receptor-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(8):1587–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.151>
  93. Krainick-Strobel UE, Lichtenegger W, Wallwiener D, Tulusan AH, Jänicke F, Bastert G, et al. Neoadjuvant letrozole in postmenopausal estrogen and/or progesterone receptor positive breast cancer: A phase IIb/III trial to investigate optimal duration of preoperative endocrine therapy. *BMC Cancer.* 2008;8: 62 doi: 10.1186/1471-2407-8-62.
  94. Fontein DBY, Charehbili A, Nortier JWR, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Kroep JR, Putter H, et al. Efficacy of six month neoadjuvant endocrine therapy in postmenopausal, hormone receptor-positive breast cancer patients - A phase II trial. *Eur J Cancer [Internet].* 2014;50(13):2190–2200.
  95. Semiglazov VF, Semiglazov V V., Dashyan GA, Ziltsova EK, Ivanov VG, Bozhok AA, et al. Phase 2 randomized trial of primary endocrine therapy versus chemotherapy in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer.* 2007;110(2):244–54.
  96. Palmieri C, Cleator S, Kilburn LS, Kim SB, Ahn SH, Beresford M, et al. NEOCENT: a randomised feasibility and translational study comparing neoadjuvant endocrine therapy with chemotherapy in ER-rich postmenopausal primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(3):581–90.
  97. Bear HD, Wan W, Robidoux A, Rubin P, Limentani S, White RL, et al. Using the 21-gene assay from core needle biopsies to choose neoadjuvant therapy for breast cancer: A multicenter trial. *J Surg Oncol.* 2017;115(8):917–23.
  98. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Goncalves R, Sanati S, Creighton CJ, et al. Ki67 proliferation index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: Results from the American college of surgeons oncology group Z1031 trial (alliance). *J Clin*

- Oncol. 2017;35(10):1061–9.
99. Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Makris A, Gregory RK, et al. Prediction of clinical outcome from primary tamoxifen by expression of biologic markers in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(2):616–21.
  100. Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *J Clin Oncol.* 2008;26(7):1059–65.
  101. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature.* 2015;523(7560):313–7.
  102. Tubiana-Hulin M, Becette V, Bieche I, Mauriac L, Romieu G, Bibeau F, et al. Exemestane as neoadjuvant hormone therapy for locally advanced breast cancer: results of a phase II trial. *Anticancer Res [Internet].* 2007;27(4C):2689–96.
  103. Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Boeddinghaus I, et al. Biomarker changes during neoadjuvant anastrozole, tamoxifen, or the combination: Influence of hormonal status and HER-2 in breast cancer - A study from the IMPACT trialists. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2477–92.
  104. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet.* 2007;39(5):655–60.
  105. Brown LA, Hoog J, Chin SF, Tao Y, Zayed AA, Chin K et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Genet Nat.* 2008;40(7):809.
  106. Reis-Filho JS, Drury S, Lambros MB, Marchio C, Johnson N, Natrajan R et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Genet Nat.* 2008;40(7):810.
  107. Keen JC, Dixon JM, Miller EP, Cameron DA, Chetty U, Hanby A, et al. The expression of Ki-S1 and BCL-2 and the response to primary tamoxifen therapy in elderly patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;44(2):123–4.
  108. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Tao Y, Llombart-cussac A, Ja F, et al. Letrozole Inhibits Tumor Proliferation More Effectively than Tamoxifen Independent of HER1 / 2 Expression Status 1. 2003;(17):6523–31.
  109. Trihia H, Murray S, Sc D, Price K, Gelber RD, Ph D, et al. Ki-67 Expression in Breast Carcinoma Its Association with Grading Systems , Clinical Parameters , and Other Prognostic Factors — A Surrogate Marker ? *Cancer.* 2003;97:1321–31.
  110. Haerslev T JG& ZK. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen ( PCNA ) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Cancer Res Treat.* 1996;37:101–13.
  111. Urruticochea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7212–20.
  112. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(2):167–70.
  113. Cameron DA, Anderson EDC, Levack P, Hawkins RA, Anderson TJ, Leonard RCF, et al. Primary systemic therapy for operable breast cancer - 1 Oyear survival data after chemotherapy and hormone therapy. *Br J Cancer.*

- 1997;76:1099–105.
114. Robertson J, Dowsett M, Bliss J, Morden J, Wilcox M, Evans A et al. Peri-Operative Aromatase Inhibitor treatment in determining or predicting long-term outcome in early breast cancer. The POETIC Trial (CRUK/07/015). [www.sabcs.org/Portals/SABCS2016/Documents/SABCS-2017](http://www.sabcs.org/Portals/SABCS2016/Documents/SABCS-2017). 2017.
  115. Dixon JM, Renshaw L, Dixon J, Thomas J. Invasive lobular carcinoma: Response to neoadjuvant letrozole therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(3):871–7.
  116. Akashi-Tanaka S, Shimizu C, Ando M, Shibata T, Katsumata N. 21-Gene expression profile assay on core needle biopsies predicts responses to neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer patients. *The Breast [Internet]*. 2009;18(3):171–4.
  117. Ueno T, Masuda N, Yamanaka T, Saji S, Kuroi K. Evaluating the 21-gene assay Recurrence Score  $\bar{O}$  as a predictor of clinical response to 24 weeks of neoadjuvant exemestane in estrogen receptor-positive breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2013; 19 (4) 607–613
  118. Iwata H, Masuda N, Yamamoto Y, Fujisawa T, Toyama T, Kashiwaba M, et al. Validation of the 21-gene test as a predictor of clinical response to neoadjuvant hormonal therapy for RE+, HER2-negative breast cancer: the TransNEOS study. *Breast Cancer Research and Treatment* 2019; 173: 123-133
  119. Whitworth P, Beitsch P, Mislowsky A, Pellicane J V., Nash C, Murray M, et al. Chemosensitivity and Endocrine Sensitivity in Clinical Luminal Breast Cancer Patients in the Prospective Neoadjuvant Breast Registry Symphony Trial (NBRST) Predicted by Molecular Subtyping. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(3):669–75.
  120. Iwata H, Masuda N, Sagara Y, Kinoshita T, Nakamura S, Yanagita Y, et al. Analysis of Ki-67 expression with neoadjuvant anastrozole or tamoxifen in patients receiving goserelin for premenopausal breast cancer. *Cancer*. 2013;119(4):704–13.
  121. Yu Q, Niu Y, Liu N, Zhang JZ, Liu TJ, Zhang RJ, et al. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol*. 2018;(November 2010):1288–94.
  122. Osborne CK, Shou J, Massarweh S, and Schiff R. Crosstalk between Estrogen Receptor and Growth Factor Receptor Pathways as a Cause for Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Clin Can Res*; 2005; 11: 865-870
  123. Glück S. Consequences of the Convergence of Multiple Alternate Pathways on the Estrogen Receptor in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2017;17(2):79–90.
  124. Hoefnagel LDC, Moelans CB, Meijer SL, Slooten H Van, Wesseling P, Wesseling J, et al. Prognostic Value of Estrogen Receptor  $\alpha$  and Progesterone Receptor Conversion in Distant Breast Cancer Metastases. *Cancer*. 2012;1–7.
  125. Herynk MH, Fuqua SAW. Estrogen Receptor Mutations in Human Disease. *Endocrin Rev*. 2014;25(June):869–98.
  126. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-bernstam F, Soussan-gutman L, et al. Emergence of Constitutively Active Estrogen Receptor- $\alpha$  Mutations in Pretreated Advanced Estrogen Receptor – Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;1757–68.
  127. Kim C, Tang G, Katherine L. Estrogen Receptor (ESR1) mRNA Expression and Benefit From Tamoxifen in the Treatment and Prevention of Estrogen Receptor – Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(31): 4160–4167.

128. Cancer T, Atlas G. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;1–10.
129. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:353–61.
130. Alkner S, Jensen MB, Rasmussen BB, Bendahl PO, Fernö M, Rydén L and Mouridsen H. Prognostic and predictive importance of the estrogen receptor coactivator AIB1 in a randomized trial comparing adjuvant letrozole and tamoxifen therapy in postmenopausal breast cancer: the Danish cohort of BIG 1-98 Breast Cancer Res Treat 2017; 166: 481-490. DOI 10.1007/s10549-017-4416-0
131. Aguilar H, Urruticoechea A, Halonen P, Kiyotani K, Mushiroda T, Barril X, et al. VAV3 mediates resistance to breast cancer endocrine therapy. *Breast Cancer Res*. 2014;1–16.
132. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC. Expression of oestrogen receptor- $\beta$  in oestrogen receptor- $\alpha$  negative human breast tumours. *Br J Cancer*. 2006;95(5):616–26.
133. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*. 2000;89(2):111–7.
134. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, Daly RJ, L R. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 1:323–35.
135. Barbareschi M, Pelosio P, Caffo O, Buttitta F, Pellegrini S, Barbazza R, et al. Cyclin-D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: Relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product. p53 and p21(WAF1) immunohistochemical expression. *Int J Cancer*. 1997;74(2):171–4.
136. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J cancer*. 1996;69(2):92–9.
137. Jirström K, Stendahl M, Rydén L, Kronblad Å, Bendahl P-O, Stål O, et al. Adverse Effect of Adjuvant Tamoxifen in Premenopausal Breast Cancer with *Cyclin D1* Gene Amplification. *Cancer Res*. 2005;65(17):8009–16.
138. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, et al. Formation and activation of a cyclinE-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. 1992; 257(5077):1689–94.
139. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(20):1566–1575.
140. Smith ML SY. Sensitivity of cyclin E-overexpressing cells to cisplatin/taxol combinations. *Anticancer Res*. 2000;20:2537–2539.
141. Akli S, Keyomarsi K. Low-molecular-weight cyclin E: The missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Res*. 2004;6(5):188–91.
142. Vallmanya Llena FR, Laborda Rodríguez A, Lloreta Trull J, Cortadella Ángel R, Placer Santos J, Gelabert Mas A. Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y Ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray. *Actas Urol Esp*. 2006;30(8):754–62.
143. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30(18):2087–97.

144. Gavressea T, Kalogeras KT, Koliou G, Zagouri F, Lazaridis G, Gogas H, et al. The Prognostic Value of the Immunohistochemical Expression of Phosphorylated RB and p16 Proteins in Association with Cyclin D1 and the p53 Pathway in a Large Cohort of Patients with Breast Cancer Treated with Taxane-based Adjuvant Chemotherapy. *Anticancer Res.* 2017;37(6):2947–57.
145. Yeo B, Dowsett M. Neoadjuvant endocrine therapy: Patient selection, treatment duration and surrogate endpoints. *The Breast.* 2015;24:78–83.
146. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):224.
147. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, Brodt ZN, Murphy CJ, Holz MK. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor  $\alpha$  in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem.* 2009;284(10):6361–9.
148. Magnuson B, Ekim B and Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks *Biochemical Journal* Jan 01, 2012, 441 (1) 1-21.
149. Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treat Rev.* 2017;59:93–101.
150. Mateo F, Arenas EJ, Aguilar H, Serra-Musach J, De Garibay GR, Boni J, et al. Stem cell-like transcriptional reprogramming mediates metastatic resistance to mTOR inhibition. *Oncogene.* 2017;36(19):2737–49.
151. Zhang Y, Moerkens M, Ramaiahgari S, de Bont H, Price L, Meerman J et al. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):1–16.
152. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70(5):2085–94.
153. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: An overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):1–13.
154. Jeanne M.V. Louderbough and Joyce A. Schroeder. Understanding the Dual Nature of CD44 in Breast Cancer Progression. *Mol Cancer Res* 2011;9(12): 1573-1586.
155. Dixon JM. Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New J Sci.* 2014;2014(10):1–27.
156. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R, Evans DB, Bhatnagar AS, et al. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(19): 1380–1388.
157. Grassadonia A, Di Nicola M, Grossi S, Noccioli P, Tavoletta S, Politi R, et al. Long-term outcome of neoadjuvant endocrine therapy with aromatase inhibitors in elderly women with hormone receptor-positive breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(5):1575–82.
158. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5222–32.
159. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S, Gao D, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-

- embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*. 2014;14(1):177.
160. Cleries R, Ameijide A, Buxó Pujolràs M, Vilardell M, Martínez JM, Alarcón F, et al. (2018). WebSurvCa: estimación vía web de las probabilidades de fallecimiento y de supervivencia de una cohorte. *Gaceta Sanitaria*. 2018; 32. 10.1016/j.gaceta.2017.10.015.
  161. Gil Gil MJ, Perez FJ, Soler Monso T, Pascual T, Galván P, Pare L, et al. Prognostic value of PAM50 in residual breast cancer following neoadjuvant endocrine therapy (NET): A retrospective analysis with long follow-up. *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl; abstr 575)
  162. Ring A, Sestak I, Baum M, Howell A, Buzdar A, Dowsett el. Influence of Comorbidities and Age on Risk of Death Without Recurrence: A Retrospective Analysis of the Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4266-4272.
  163. Human Mortality Database (<http://www.mortality.org>.)
  164. Coates AS, Millar EKA, O'Toole SA, Molloy TJ, Viale G, Goldhirsch A, et al. Prognostic interaction between expression of p53 and estrogen receptor in patients with node-negative breast cancer: results from IBCSG Trials VIII and IX. *Breast Cancer Res* 2012; 14:R143 <https://doi.org/10.1186/bcr3348>
  165. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res Treat*. 2018; 170: 213-219.
  166. Finn, R, Jiang Y, Rugo, H, Moulder SL, Im SA, Gelmon KA, et al. Biomarker analyses from the phase 3 PALOMA-2 trial of palbociclib (P) with letrozole (L) compared with placebo (PLB) plus L in postmenopausal women with ER + /HER2– advanced breast cancer (ABC). *Ann Oncol* 2016, 27. (revisar cita)
  167. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer, K, Bondarenko I, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): A randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 25–35.
  168. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Simon S, et al. Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2016;375: 1738–1748.
  169. Goetz MP, Toi M, Campone M, Sohn J, Sohn J, Paluch-Simon S, Huober J. et al. MONARCH 3: Abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2017; 35:3638–3646.
  170. Berghuis AMS, van Deurzen CHM, Koffijberg H, Terstappen LWM, Sleijfer S and Ijzerman MJ. Real-world data o discordance between estrogen, progesterone and HER2 receptor expression on diagnostic tumor biopsy versus tumor resection material. *Breast Cancer Res Treat*. 2019; 175:451-458.
  171. Ferreira Leal M, Haynes BP, MacNeill FA, Dodson A and Dowsett M. Comparison of protein expression between formalin-fixed core-cut biopsies and surgical excision specimens using a novel multiplex approach. *Breast Cancer Res Treat*. 2019; 175: 317-326.
  172. Guerrero-Zotano A, Stricker T, Hutchinson KE, Formisano L, Giltnane J, Ruiz A, et al. Genomic profiling of ER+ breast cancers treated with prolonged neoadjuvant letrozole novel alterations in clinically resistent tumors. *Cancer Res*. 2016; 76. 4508-4508.
  173. Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Jindal S, Butler LM, Leung S, McNeil CM, et al. The magnitude of androgen receptor positivity in breast cancer is critical for reliable prediction of disease outcome. *Clin Cancer Res*. 2018; 24 (10): 2328–41.

174. Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohee S, Ameye L, Fumagalli D, Ades F, et al. The prognostic role of androgen receptor in patients with early-stage breast cancer: a meta-analysis of clinical and gene expression data. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(11): 2702–12.
175. Elebro K, Bendahl PO, Jernstrom H, Borgquist S. Androgen receptor expression and breast cancer mortality in a population-based prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 165(3): 645–57
176. Kensler KH, Regan MM, Heng YJ, Baker GM, Pyle ME, Schnitt SJ et al. Prognostic and predictive value of androgen receptor expression in postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer. Results from the Breast International Group Trial 1-98. *Breast Cancer Res.* 2019; 21(30): 1-11



# Anexo I



## INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA SOBRE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

El Dr. Enric Sospedra Martínez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge,

### CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge, en su reunión de fecha 5 de Marzo de 2015 (Acta 05/15), tras examinar toda la documentación presentada sobre el proyecto de investigación con nuestra ref. **PR048/15**, titulado:

**“PROYECTO DE RE-EVALUACIÓN DE FACTORES DE PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA DESPUÉS DE HORMONOTERAPIA PRIMARIA (HTP)”, código FPHTP2015.**

Presentado por el Dr. Miguel Gil Gil del Servicio de Oncología Médica del ICO, como investigador principal y promovido por Institut Català d'Oncologia (ICO), ha acordado emitir INFORME FAVORABLE al mencionado proyecto.

Que la composición actual del Comité Ético de Investigación Clínica es la siguiente:

Presidente	Dr. Francesc Esteve Urbano	Médico-Medicina Intensiva
Vicepresidente	Dra. Pilar Hereu Boher	Médico-Farmacología Clínica
Secretario	Dr. Enric Sospedra Martínez	Farmacia-Farmacia Hospitalaria
Vocales:	Dr. Josep M <sup>a</sup> Arnau de Bolós	Médico-Farmacología Clínica
	Dra. María Berdasco Menéndez	Bióloga-miembro no sanitario
	Dr. Enric Condom Mundo	Médico-Anatomía Patológica
	Sra. Consol Felip Farrás	Miembro laico-Docencia Investigación
	Dr. José Luis Ferreiro Gutiérrez	Médico-Cardiología
	Dra. Ana María Ferrer Artola	Farmacia-miembro sanitario
	Dr. Xavier Fulladosa Oliveras	Médico-Nefrología
	Dra. Margarita García Martín	Médico-Oncología Médica
	Dra. Laura Lladó Garriga	Médico-Cirugía General Digestiva
	Sra. Sonia López Ortega	Graduado Social-Atención Usuario
	Sra. Gemma Martínez Estalella	Enfermera-Enfermería
	Dra. Francesca Mitjavila Villeró	Medicina-Medicina Interna
	Dr. Sergio Morchón Ramos	Médico-Medicina Preventiva
	Dr. Joan Josep Queralt Jiménez	Jurista
	Dr. Ricard Ramos Izquierdo	Medicina-Cirugía Torácica
	Dra. Gemma Rodríguez Palomar	Farmacia – Atención Primaria
	Dra. Nuria Sala Serra	Bióloga-miembro no sanitario
	Dr. Petru Cristian Simon	Médico-Farmacología Clínica





## Anexo II

### 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium

**Publication Number:** P4-08-08

**Title:** Biomarkers to predict distant recurrence free survival after neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer. A long follow up retrospective study

Miguel Gil-Gil<sup>1</sup>, Idoia Morilla<sup>1</sup>, Anna Petit<sup>1</sup>, Teresa Soler<sup>1</sup>, Xavier Perez-Martin<sup>1</sup>, Anna Guma<sup>1</sup>, Maria Jesus Pla<sup>1</sup>, Raul Ortega<sup>1</sup>, Amparo Garcia-Tejedor<sup>1</sup>, Catalina Faló<sup>1</sup>, Robert Montal<sup>1,2</sup>, Luis Perez-Casanova<sup>1</sup>, Carolina Loayza<sup>1</sup> and Sonia Pernas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Institut Català d'Oncologia, Medical Oncology (ICO) - Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). Breast Cancer Unit, L'Hospitalet, Barcelona, Spain and <sup>2</sup>Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

#### **Body: Background:**

Neoadjuvant endocrine therapy (NET) is gaining more acceptances for the management of estrogen receptor (ER) positive breast cancer (BC). Rate of patients achieving pathological complete response is very low and Ki67 suppression and PEP1 score are the only prognostic factors associated with relapse free survival.

The aim of our study was to identify biomarkers of prediction of distant relapse risk that could help clinicians in the decision-making of systemic adjuvant treatment in patients previously treated with NET

#### **Material & Methods:**

Retrospective study of 119 postmenopausal women with ER or progesterone receptor (PR) positive BC treated with NET in ICO-HUB from 1997 to 2009. Clinical-pathological data and treatments administered were reviewed. IHC expression of ER, PR, Ki67, Androgen receptor (AR), BCL-2, Cyclin D1 (CD1), p16, p53, CD 44 and synaptophysin were analyzed in post-NET surgical formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples through a tissue microarray. Survival was calculated by Kaplan-Meier method. Univariate and multivariate analysis of variables associated with distant relapse free survival (DRFS) was evaluated by Cox proportional hazard model.

#### **Results:**

Mean age was 74 (63-88). cT: T2 5%, T3 6.5%, T4 43.5%. cN: N0 59%, N1 25%, N2-3 16%. Stage: I 21%, II 49.5%, III 29.5%. Histological subtype: ductal 84%, lobular 6%, others 10%. Histological grade: G1 20%, G2 55%, G3 25%. Vascular invasion 15%. NET: Aromatase Inhibitors 64%, SERM 36%. Median duration of NET 8.5 months. Clinical Response: Complete 4%, Partial 55%, Stable 37%, Progression 4%. Surgery: Lumpectomy 72%, Mastectomy 28%;Lymphadenectomy 70.5%, Sentinel lymph node biopsy 6%, No surgical approach of axilla 23.5%. Surgical specimen: ypT1 36%, ypT2 54%, ypT3 6%, ypT4 4%; ypN0 28%, ypN1 22%, ypN2 13.5%, ypN3 12% ypNx 23.5%. Surgical margins: Negative 89% Positive 11%. Median fibrosis rate 20% (0-95). PR and Ki67 showed a statistically significant decrease after NET (p<0,05) but no ER (p=0,29). Adjuvant treatment: chemotherapy 7%, radiotherapy 76%, endocrine therapy 96%. Median follow-up: 104 months. Only 21 patients developed distance relapse. Median OS was 139 months [95% CI = 98-181]. Univariate analysis for DRFS showed statistically significant differences in cN (HR=3), histological grade 3 (HR=3.61), ypN (HR=3.62), p16 (HR=6.1) and p53 (HR=2.79). Multivariate analysis of post-NET biomarkers showed that negative nuclear p16 expression (HR=4.79)and positive p53 (HR=2.83)were independently associated with worse DRFS. In multivariate analysis of all clinico-pathological and molecular factors, histological grade 3 (HR=2.82) was the sole DRFS independent factor.

#### **Conclusions:**

Negative nuclear p16 expression and positive p53 post-NET were associated with worseDRFS. Whenall clinico-pathological and molecular factors were analysed, G3 was the sole DRFS independent factor. Patients with G3, negative p16 or positive p53 after NET could probably benefit from adjuvant chemotherapy or CDK 4-6 inhibitors treatment. In our series, we did not find usefulness in analysing ER, PR and Ki67 post-NET changes to predict DRFS.

# Biomarkers to predict distant relapse free survival after neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer.

## A retrospective study with long follow up

Miguel-Gil<sup>1</sup>, I. Morillón<sup>1</sup>, A. Peñafiel<sup>2</sup>, J. Sole<sup>2</sup>, X. Perez-Martin<sup>3</sup>, A. Guma<sup>4</sup>, M.J. Pla<sup>5</sup>, R. Ortega<sup>4</sup>, A. Garcia-Tejedor<sup>3</sup>, C. Faló<sup>1</sup>, R. Morilla<sup>1,6</sup>, L. Pérez-Casanova<sup>2</sup>, C. Loayza and S. Pernas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Oncology, <sup>2</sup>Anatomical Pathology, <sup>3</sup>Clinical Investigation Unit, <sup>4</sup>Radiology, <sup>5</sup>Gynecology, Institut Català d'Oncologia - Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, L'Hospitalet, Barcelona, Spain



### BACKGROUND:

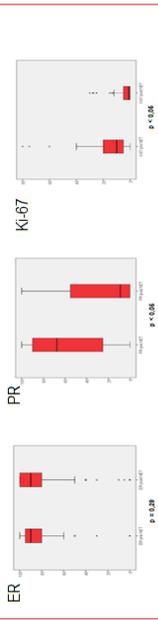
- Neoadjuvant endocrine therapy (NET) is gaining more acceptances for the management of estrogen receptor (ER) positive breast cancer (BC).
- The rate of patients achieving pathological complete response following NET is very low. To date, the decrease of Ki-67 [1] and PEP1 score [2] after NET are the only prognostic factors associated with relapse free survival and breast cancer specific survival.

### METHODS

- Retrospective study of 119 postmenopausal women with ER or progesterone receptor (PR) positive stage II-III BC treated with NET at Institut Català d'Oncologia - Hospital de Bellvitge from 1987 to 2009.
- 64% of patients received an Aromatase inhibitors and 38% a selective ER modulator (SERM)
- Median age was 74 (63-88)
- Histopathologic type: Ductal 84%, Lobular 6% Others 10%
- All patients underwent surgery. The median duration of NET was 8.5 months (4-34).
- Other patient & tumor characteristics in Table 1.

### PRIOR RESULTS

- Clinical-pathological factors (CTM), type of NET, clinical response, ypTMM, vascular invasion, % fibrosis and histological grade post NET, and PR and Ki67 pre and post NET were previously reported (ESMO 2015).
- Histological G3 after NET was the only significant factor of distant relapse free survival (DRFS) in the multivariate analysis [3].
- Assessment of ER, PR and Ki67 pre and post NET showed a statistically significant decrease of PR and Ki67 after NET but not ER.



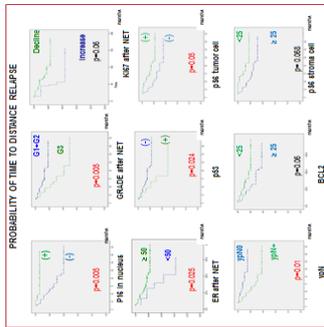
- 28 relapses (21 distant metastases) and 47 deaths were observed after 104 months of mean follow-up.
- Median OS was 139 months (95% CI = 98-180.7).
- Androgen receptor (AR), synaptophysin (SYN), Cyclin D1 (CD1), retinoblastoma protein (pRB), p16, p53, BCL-2, VAV3, CD 44, pS6 and SOX3 in cytoplasm and nucleus, were analyzed by IHC in tumor and stromal cells and measured by intensity (0 to 3+) and by % of cells, by two independent pathologists in the surgical specimen through a tissue microarray (TMA).
- Univariate analysis of prognostic factor was performed by logrank test in terms of distant relapse free survival (DRFS). Overall survival was calculated by Kaplan-Meier.
- Cox proportional hazard regression model was used to evaluate the independent prognostic relevance of each factor

### OBJECTIVE

The aim of our study was to find biomarkers in the surgery specimen after NET that could be useful for clinicians in the decision-making of systemic adjuvant treatment.

### RESULTS

- Univariate analysis for time to distant relapse showed statistically significant differences negative p16 in nucleus (p=0.003), grade 3 (p=0.005), post NET ER <50% (p=0.025), ypN + (p=0.01), negative pS6 in tumor cell (p=0.051), Ki-67 decline (p=0.06), BCL2 (p=0.06), Vascular invasion (p=0.07), and VAV3 (p=0.07) showed trend without reaching statistical significance.
- Multivariate analysis of IHC biomarkers showed that negative p16 (HR =5.02) in nucleus and p53 (HR = 2.41) were independently associated with worse DRFS.
- Multivariate analysis of clinical, pathological & and molecular factors showed that negative p16 (HR = 6.53), grade 3 (HR = 2.82), not clinical response (HR =2.64) and negative pS6 in tumoral cell (HR = 2.57) were factors independently associated with worse time to DRFS.



### CONCLUSIONS

1. Patients with negative p16 in nucleus, histological G3, non clinical response and negative pS6 in the surgical specimen after NET have a high risk of Distant Disease.
2. The presence of any of these adverse factors could be an indication of adjuvant chemotherapy
3. Negative p16 after NET may suggest which patients could benefit the most from adding a CDK 4-6 inhibitor to the adjuvant endocrine therapy.
4. In our study, changes in PR and Ki67 after NET do not predict distant relapses. Likewise expression of pRB, CD1, AR, SOX6, CD44 or SYP did not correlate with DRFS.

CT	Median (range) of patients	n (%)
CT1	4 (1-4)	15 (12.6)
CT2	5 (1-21)	35 (28.9)
CT3	2 (1-7)	12 (10.1)
CT4	25 (5-71)	102 (85.4)
CT5	2 (1-7)	70 (58.8)
CT6	1 (1-1)	1 (0.8)
CT7	1 (1-1)	1 (0.8)
CT8	1 (1-1)	1 (0.8)
CT9	1 (1-1)	1 (0.8)
CT10	1 (1-1)	1 (0.8)
CT11	1 (1-1)	1 (0.8)
CT12	1 (1-1)	1 (0.8)
CT13	1 (1-1)	1 (0.8)
CT14	1 (1-1)	1 (0.8)
CT15	1 (1-1)	1 (0.8)
CT16	1 (1-1)	1 (0.8)
CT17	1 (1-1)	1 (0.8)
CT18	1 (1-1)	1 (0.8)
CT19	1 (1-1)	1 (0.8)
CT20	1 (1-1)	1 (0.8)
CT21	1 (1-1)	1 (0.8)
CT22	1 (1-1)	1 (0.8)
CT23	1 (1-1)	1 (0.8)
CT24	1 (1-1)	1 (0.8)
CT25	1 (1-1)	1 (0.8)
CT26	1 (1-1)	1 (0.8)
CT27	1 (1-1)	1 (0.8)
CT28	1 (1-1)	1 (0.8)
CT29	1 (1-1)	1 (0.8)
CT30	1 (1-1)	1 (0.8)
CT31	1 (1-1)	1 (0.8)
CT32	1 (1-1)	1 (0.8)
CT33	1 (1-1)	1 (0.8)
CT34	1 (1-1)	1 (0.8)
CT35	1 (1-1)	1 (0.8)
CT36	1 (1-1)	1 (0.8)
CT37	1 (1-1)	1 (0.8)
CT38	1 (1-1)	1 (0.8)
CT39	1 (1-1)	1 (0.8)
CT40	1 (1-1)	1 (0.8)
CT41	1 (1-1)	1 (0.8)
CT42	1 (1-1)	1 (0.8)
CT43	1 (1-1)	1 (0.8)
CT44	1 (1-1)	1 (0.8)
CT45	1 (1-1)	1 (0.8)
CT46	1 (1-1)	1 (0.8)
CT47	1 (1-1)	1 (0.8)
CT48	1 (1-1)	1 (0.8)
CT49	1 (1-1)	1 (0.8)
CT50	1 (1-1)	1 (0.8)
CT51	1 (1-1)	1 (0.8)
CT52	1 (1-1)	1 (0.8)
CT53	1 (1-1)	1 (0.8)
CT54	1 (1-1)	1 (0.8)
CT55	1 (1-1)	1 (0.8)
CT56	1 (1-1)	1 (0.8)
CT57	1 (1-1)	1 (0.8)
CT58	1 (1-1)	1 (0.8)
CT59	1 (1-1)	1 (0.8)
CT60	1 (1-1)	1 (0.8)
CT61	1 (1-1)	1 (0.8)
CT62	1 (1-1)	1 (0.8)
CT63	1 (1-1)	1 (0.8)
CT64	1 (1-1)	1 (0.8)
CT65	1 (1-1)	1 (0.8)
CT66	1 (1-1)	1 (0.8)
CT67	1 (1-1)	1 (0.8)
CT68	1 (1-1)	1 (0.8)
CT69	1 (1-1)	1 (0.8)
CT70	1 (1-1)	1 (0.8)
CT71	1 (1-1)	1 (0.8)
CT72	1 (1-1)	1 (0.8)
CT73	1 (1-1)	1 (0.8)
CT74	1 (1-1)	1 (0.8)
CT75	1 (1-1)	1 (0.8)
CT76	1 (1-1)	1 (0.8)
CT77	1 (1-1)	1 (0.8)
CT78	1 (1-1)	1 (0.8)
CT79	1 (1-1)	1 (0.8)
CT80	1 (1-1)	1 (0.8)
CT81	1 (1-1)	1 (0.8)
CT82	1 (1-1)	1 (0.8)
CT83	1 (1-1)	1 (0.8)
CT84	1 (1-1)	1 (0.8)
CT85	1 (1-1)	1 (0.8)
CT86	1 (1-1)	1 (0.8)
CT87	1 (1-1)	1 (0.8)
CT88	1 (1-1)	1 (0.8)
CT89	1 (1-1)	1 (0.8)
CT90	1 (1-1)	1 (0.8)
CT91	1 (1-1)	1 (0.8)
CT92	1 (1-1)	1 (0.8)
CT93	1 (1-1)	1 (0.8)
CT94	1 (1-1)	1 (0.8)
CT95	1 (1-1)	1 (0.8)
CT96	1 (1-1)	1 (0.8)
CT97	1 (1-1)	1 (0.8)
CT98	1 (1-1)	1 (0.8)
CT99	1 (1-1)	1 (0.8)
CT100	1 (1-1)	1 (0.8)

### REFERENCES

1. Casellas M, Barthelemy E, Etxebarria JR, et al. J Natl Cancer Inst. 2007; 99: 1972-1979.
2. Ezzik M, Tuo J, Luo J, et al. J Natl Cancer Inst. 2000; 100: 1038-1042.
3. Morilla R, Rivas G, Peñafiel A, et al. BMC 1917 P106. ECCO-ESMO 2015

Clinical & Biological Factors post NET	Time to distant relapse	
	Univariate analysis	Multivariate analysis
ypN (No pathologic complete response)	HR (95% CI)	P
ypN +	2.07 (1.07-4.02)	0.027
ypN -	1.00	0.00
Clinical response (No vs Yes)	HR (95% CI)	P
Clinical response No	4.69 (2.49-8.45)	0.000
Clinical response Yes	1.00	0.00
Vascular invasion (No vs Yes)	HR (95% CI)	P
Vascular invasion No	1.00	0.00
Vascular invasion Yes	2.43 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM (G1 vs G2 vs G3)	HR (95% CI)	P
ypTMM G1	1.00	0.00
ypTMM G2	1.00	0.00
ypTMM G3	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G2	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17 & G18	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17 & G18 & G19	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17 & G18 & G19 & G20	2.41 (1.24-4.74)	0.009

Analysis of Biomarkers post NET	Time to distant relapse	
	Univariate analysis	Multivariate analysis
Factor	HR (95% CI)	P
ypN +	2.07 (1.07-4.02)	0.027
ypN -	1.00	0.00
Clinical response No	4.69 (2.49-8.45)	0.000
Clinical response Yes	1.00	0.00
Vascular invasion No	1.00	0.00
Vascular invasion Yes	2.43 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G2	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17 & G18	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17 & G18 & G19	2.41 (1.24-4.74)	0.009
ypTMM G3 vs G1 & G2 & G3 & G4 & G5 & G6 & G7 & G8 & G9 & G10 & G11 & G12 & G13 & G14 & G15 & G16 & G17 & G18 & G19 & G20	2.41 (1.24-4.74)	0.009

# Meeting Abstracts

### Prognostic value of PAM50 in residual breast cancer following neoadjuvant endocrine therapy (NET): A retrospective analysis with long follow-up.

Sub-category:  
Neoadjuvant Therapy

Category:  
Breast Cancer—Local/Regional/Adjuvant

Meeting:  
2019 ASCO Annual Meeting

Abstract No:  
575

Poster Board Number:  
Poster Session (Board #67)

Citation:  
J Clin Oncol 37, 2019 (suppl; abstr 575)

Author(s): Miguel J. Gil Gil, Francisco Javier Perez, Teresa Soler Monso, Tomas Pascual, Patricia Galván, Laia Pare, Anna Petit, Catalina Faló, Agostina Stradella, María Jesús Pla, Ramon Salazar, Aleix Prat; Breast Cancer Unit & Medical Oncology Department, Institut Català d'Oncologia, IDIBELL, Barcelona, Spain; Clinical Research Unit, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain; Breast Cancer Unit & Pathology Department, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain; Department of Medical Oncology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; Department of Medical Oncology, Hospital Clínic de Barcelona, Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain; Breast Cancer Unit & Pathology Department, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain; Breast Cancer Unit Medical Oncology Department, Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; Breast Cancer Unit, Department of Medical Oncology, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain; Breast Cancer Unit & Gynecology Department, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain; Medical Oncology Department, Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; Department of Medical Oncology, Hospital Clínic de Barcelona, Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), SOLTI Breast Cancer Cooperative Group, Barcelona, Spain

#### Abstract Disclosures

#### Abstract

**Background:** NET is gaining more acceptance for the management of hormonal receptors (HR)-positive breast cancer (BC). To date, the decrease of Ki-67 and PEPI score are the only prognostic factors associated with relapse-free survival after NET. PAM50 is a validated prognostic test in newly diagnosed BC; however, its value in residual tumors after NET is currently unknown. **Methods:** We took tumor tissues from patients of a retrospective study of 119 postmenopausal women with HR-positive stage II-III BC. Patients were diagnosed from 1997 to 2009 and were treated with NET for a median duration of 8.5 months. Median age was 74 (63-88). After NET all patients underwent surgery (73% conservative). Adjuvant treatment were endocrine therapy in 100%, radiotherapy in 76.5% and chemotherapy 7%. Median follow-up from surgery was 112 months. Median follow-up from surgery was 112 months. We observed 26 (24%) of distant relapses and 75 deaths (44 without cancer). Median overall survival was 134.8 months. RNA was extracted from FFPE tumor tissues of surgical specimens. A panel of 55 BC-related genes, including the research-based PAM50 assay (subtypes, ROR-S and ROR-P pre-defined cutpoints), androgen receptor (AR), immune genes (CD8A, CD4, PDL1 and PD1). Uni- and multi-variable Cox models were used to evaluate the association of each variable with distance recurrence free interval (DRFI). **Results:** PAM50 subtype distribution: Luminal A 54.3%, Normal-like 24.3%, HER2-enriched 16.5%, Luminal B 1% and basal 1%. Distribution of ROR-S groups was Low 64%, medium 30% and high 6%. Distribution of PEPI score was: 0 in 43%, 3 in 37% and 6 in 20%. Among the different variables explored, PEPI score 0 (HR 0.27 [95%CI 0.09-0.79] p=0.001), low ROR-S (HR 0.39 [95%CI 0.17-0.91] p=0.001) and high AR expression (HR 0.71 [95%CI 0.53-0.96] p=0.007) were significantly associated with lower DRFI in univariate analyses. After adjusting for PEPI (with or without Normal-like tumors), ROR-S and AR remained significantly associated with outcome. **Conclusions:** PAM50 ROR-S and AR expression in residual tumors after NET provide independent prognostic information beyond PEPI. With further validation, these biomarkers could help clinicians in the decision-making of adjuvant chemotherapy.

Attend this session at the  
2019 ASCO Annual Meeting!

Session: Breast Cancer—Local/Regional/Adjuvant

Type: Poster Session

Time: Sunday June 2, 8:00 AM to 11:00 AM

Location: Hall A

## #575 Prognostic value of PAM50 in residual breast cancer following neoadjuvant endocrine therapy (NET): A retrospective analysis with long follow-up.

Miguel Gil-Gil<sup>1,2</sup>, Xavier Perez-Martin<sup>3</sup>, Teresa Soler<sup>4</sup>, Tomàs Pascual<sup>5,6</sup>, Patricia Galván<sup>5,6</sup>, Ana Petit<sup>7</sup>, Laia Paré<sup>5,6</sup>, Catalina Fabó<sup>1,2</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Pla<sup>2,7</sup>, Ramón Salazar<sup>7</sup> & Alex Prat<sup>5,6</sup> Medical Oncology Department, Institut Català d'Oncologia (ICO) IDIBELL, L'Hospitalet, Barcelona <sup>1</sup> Breast cancer Unit, ICO- Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) IDIBELL<sup>2</sup> Statistic, Clinical Investigation Unit, ICO<sup>3</sup>, Pathology Department, ICO-HUB<sup>4</sup>, Hospital Clinic de Barcelona<sup>5</sup>, SOLTI cooperative group<sup>6</sup> Gynecology Department, HUB<sup>7</sup>

### BACKGROUND:

- NET is gaining more acceptances for the management of hormonal receptors (HR) positive breast cancer (BC).
- Rate of patients achieving pathological complete response are very low.
- To date, only the decrease of Ki-67 [1] and the PEPi score are prognostic factors associated with relapse and survival BC specific survival after NET [2].
- It is very important to find other independent prognostic factors.
- PAM50 is a validated prognostic test in newly diagnosed BC; however, its value in residual tumors after NET is currently unknown.

### OBJECTIVES:

- PRIMARY:** To demonstrate the value of PAM50 as a prognostic factor in the surgery specimen after NET.
- SECONDARY:** To find other independent biomarkers analyzed by routine technique.

### PATIENTS & METHODS:

- Retrospective study of 134 women treated with NET at ICO-HUB from 1997 to 2009.
- 10 cases were excluded due to poor quality of the paraffin sample; 3 because presented bifocal tumor and 2 cases because presented pCR (1,7%). Total Inclusion: 119 cases.
- Median age was 74 (63-88). See Figure 1
- 1 Stage I; 55 Stage II and 60 stage III
- Histopathologic type: Ductal 64%, Lobular 9%, Others 7%
- 64% of women received an Aromatase Inhibitors and 36% a selective ER modulator (SERM).
- All patients underwent surgery: 73% Lumpectomy & Mastectomy (27%)
- Median duration of NET was 8.5 months (4-54).
- Other tumor characteristics in Table 1-2 and Figure 2.
- Median follow-up: 112 months
- 31 relapses (26 distant metastases) and 75 deaths (44 without cancer) were observed.
- Median Distant Recurrence Free Interval (DRFI) was not reached (see figure 3) Only 21 % of patients presented relapse.
- Mean OS from surgery was 134.8 months [95% CI = 96-180.7]
- Clinical-pathological factors (GTNM, type of NET, clinical response, ypTNM, vascular invasion, % fibrosis and histological grade post NET, and ER, PR and Ki67 pre-and post NET) were previously reported at ESMO congress 2015 [3] and other immunohistochemically variables, like p16 and p53, were presented at SABCS 2017 [4]
- Assessment of ER, PR and Ki67 pre and post NET showed a statistically significant decrease of PR and Ki67 after NET but not ER.
- RNA was extracted from FFPE tumor sections from surgical specimens.
- A panel of 55 BC-related genes, including the research-based PAM50 assay (subtypes, ROR-S and ROR-P pre-defined cut points), androgen receptor (AR) and immune genes (CD8A, CD4, PDL1 and PD1).
- Univariate and multi-variate Cox models were used to evaluate the association of each variable with DRFI.
- Cox proportional hazard regression model was used to evaluate the independent prognostic relevance of each factor

### RESULTS:

- RNA suitable for the study was obtained in 103 cases (86.5%).
- PAM50 subtype distribution: Luminal A:54,3%, Normal-like:24,3%; HER2-enriched:16,5%, Luminal B:1% and basal:1% (Table 3)
- We observed a higher rate of low cellularity in the sample of tumors classified as Normal type (p = 0.001). (Figure 4)
- There were no significant differences between molecular subtype by PAM50 and DRFI. (Figure 5)
- HER2 enriched cases did not show a greater risk of distant relapse, despite the fact that no case received CT or specific therapy against HER2

Table 3

PAM50	n	%
Lum A	56	57,3
Lum B	1	0,8
Normal	25	24,3
HER2 enriched	17	16,5
Basal	1	0,8
Total	103	100%

Figure 4

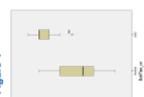


Figure 5



Figure 6



Figure 7



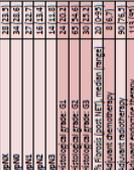
Figure 2: Distribution of basal IHC7 by %



Table 2

Gene	n	%
ER	119	100
PR	119	100
Ki67	119	100
HER2	119	100
CD8A	119	100
CD4	119	100
PDL1	119	100
PD1	119	100
AR	119	100
AR-high	119	100
AR-low	119	100
AR > 2	119	100
AR < 2	119	100

Figure 3



### CONCLUSIONS

- PAM50 ROR-S and AR expression in residual tumors after NET provide independent prognostic information beyond PEPi.
- With further validation, these biomarkers could help clinicians in the decision-making of adjuvant chemotherapy
- After adjusting for PEPi (with or without Normal-like tumors), ROR-S and AR remained significantly associated with outcome.

### REFERENCES

- Dowling M, Smith LC, Eusebi S, et al. J Her Cancer Res 2007; 86: 167-170
- Ellis MJ, Tao J, Luo J, et al. J Natl Cancer Inst 2008; 100: 1380-1388
- Montal R, Rive G, Petit A, et al. Ann 1939 P102. ECOEEMO 2015
- Gil M, Morilla I, Petit A, et al. Ann 1939 P102. SABCS 2017

Contact: migilgil@iconcologia.net

Printed by

CallPosters