

# **Terapia sistémica primaria en cáncer de mama HER2 positivo: factores pronósticos y predictores de respuesta, datos de eficacia, cardiotoxicidad y seguimiento a largo plazo**

**Autora: Silvia Antolín Novoa**

---

**Tesis doctoral UDC / Año 2019**

**Programa de doctorado en Ciencias de la Salud**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

# Terapia sistémica primaria en cáncer de mama HER2 positivo: factores pronósticos y predictores de respuesta, datos de eficacia, cardiotoxicidad y seguimiento a largo plazo

Autora: Silvia Antolín Novoa

---

Tesis doctoral UDC / Año 2019

Directores: Luis Miguel Antón Aparicio  
Lourdes Calvo Martínez

Tutor: Luis Miguel Antón Aparicio

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Luis Miguel Antón Aparicio**, Profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de A Coruña y jefe de servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

**Lourdes Calvo Martínez**, Doctora en Medicina y Oncóloga Médica en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

Certifican que la tesis titulada:

**“Terapia sistémica primaria en cáncer de mama HER2 positivo: factores pronósticos y predictores de respuesta, datos de eficacia, cardiotoxicidad y seguimiento a largo plazo”**

Ha sido realizada bajo su dirección por Silvia Antolín Novoa y es apta para ser defendida ante un tribunal para lograr el grado de doctora.

A Coruña, 5 de Julio 2019

Luis Miguel Antón Aparicio

Lourdes Calvo Martínez

Fdo:.....

Fdo:.....

A mis padres

A Jaime, Carmela y María

## **AGRADECIMIENTOS**

A Lourdes Calvo, por su enorme ayuda, generosidad infinita, perseverancia, cariño y amistad durante tantos años.

A Luis Antón Aparicio por su empuje, total libertad y confianza en mi tanto a nivel profesional como personal.

A Tomás García-Caballero, por su ilusión, disposición, rigurosidad y capacidad de trabajo.

A todo el servicio de Oncología Médica, amigos y compañeros que de una manera u otra contribuís a que la vida, dentro y fuera de la oncología sea más fácil y agradable.

Al servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña por facilitar el llevar a cabo este proyecto.

Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Santiago de Compostela por su trabajo en tiempo récord.

A todos los miembros de la unidad de mama del Hospital Universitario de A Coruña por el trabajo en equipo.

A todas las pacientes, por dejarse llevar y colaborar activamente en éste y otros proyectos que supongan avances en el conocimiento del cáncer.

## **RESUMO**

### **Obxectivos**

Avaliar a eficacia, cardiotoxicidade e beneficio a longo prazo do tratamento neoadxuvante nas pacientes con cancro de mama HER2 positivo en estadio precoz.

### **Métodos**

Incluíronse 142 pacientes diagnosticadas entre os anos 2005-2016. O tratamento consistiu nunha secuencia de taxanos e antraciclina con trastuzumab. Avaliouse a resposta clínica e patolóxica e correlacionouse con factores clínicos e biolóxicos. Analizouse a cardiotoxicidade e o seu beneficio na supervivencia.

### **Resultados**

A mediana de idade foi 49 anos. O 6%, 68% e 28% das pacientes tiñan un estadio I, II e III respectivamente, mentres que o 10% presentaban un cancro inflamatorio ó diagnóstico. O receptor hormonal (RH) foi negativo no 43% e 62% dos tumores eran grao III. A taxa de resposta completa clínica medida por ecografía e resonancia foi do 49% e do 63% respectivamente e isto permitiu unha elevada taxa de cirurxía conservadora (66%).

A taxa de resposta completa patolóxica (pCR) foi do 51% e esta resultou maior en pacientes con RH negativo (64%) que en RH positivo (41%). Elevados niveis do cociente HER2/CEN ou do número de copias do xene HER2 correlacionáronse cunha maior taxa de RCp. As pacientes que alcanzaron RCp tiveron unha mellor supervivencia libre de enfermidade e unha tendencia para mellorar a supervivencia global. O 2% das pacientes sufriu un descenso da fracción de execución do ventrículo esquerdo por baixo do 50% durante o tratamento. Todas as pacientes agás unha recuperaron a mesma tras suspender o trastuzumab.

### **Conclusións**

A administración secuencial de taxanos e antraciclina con trastuzumab foi efectiva, cunha elevada taxa de RCp, beneficio a longo prazo e un bo perfil de cardiotoxicidade.

## **RESUMEN**

### **Objetivos**

Evaluar la eficacia, cardiotoxicidad y beneficio a largo plazo del tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en estadio precoz.

### **Métodos**

Se incluyeron 142 pacientes diagnosticadas entre los años 2005-2016. El tratamiento consistió en una secuencia de taxanos y antraciclinas con trastuzumab. Se evaluó la respuesta clínica y patológica y se correlacionó con factores clínicos y biológicos. Se analizó la cardiotoxicidad y beneficio en supervivencia.

### **Resultados**

La mediana de edad fue 49 años. El 6%, 68% y 28% de las pacientes tenían un estadio I, II y III respectivamente, mientras que el 10% presentaban un cáncer inflamatorio al diagnóstico. El receptor hormonal (RH) fue negativo en el 43% y el 62% de tumores eran grado III. La tasa de respuesta completa clínica medida por ecografía y resonancia fue de 49% y 63% respectivamente y esto permitió una elevada tasa de cirugía conservadora (66%).

La tasa de respuesta completa patológica (pCR) fue del 51% y ésta fue mayor en pacientes con RH negativo (64%) que en RH positivo (41%). Elevados niveles del Ratio HER2/CEN o del número de copias del gen HER2 se correlacionaron con mayor tasa de RCp. Las pacientes que alcanzaron RCp tuvieron una mejor supervivencia libre de enfermedad y una tendencia a mejorar la supervivencia global. El 2% de las pacientes sufrió un descenso de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo por debajo del 50% durante el tratamiento. Todas las pacientes excepto una lo recuperaron tras suspender trastuzumab.

### **Conclusiones**

La administración secuencial de taxanos y antraciclinas con trastuzumab fue efectiva, con una elevada tasa de RCp, beneficio a largo plazo y un buen perfil de cardiotoxicidad.

## **ABSTRACT**

### **Objectives**

To evaluate the efficacy, cardiotoxicity profile and long-term benefits of neoadjuvant therapy in HER2-positive operable breast cancer patients.

### **Methods**

A total of 142 patients diagnosed from 2005–2016 were included in the study. The treatment consisted of a sequential regimen of taxanes and anthracyclines plus trastuzumab. The clinical and pathologic responses were evaluated and correlated with clinical and biological factors. The cardiotoxicity profile and long-term benefits were analyzed.

### **Results**

The median age was 49 years and 4%, 68% and 28% of patients had stage I, II and III breast cancer, respectively, while 10% had inflammatory breast cancer at diagnosis. Hormone receptor (HR) status was negative in 43%, and 62% had grade III breast cancer.

The clinical complete response rate, was 49% and 63%, as assessed using ultrasound and MRI, respectively, and this allowed a high rate of conservative surgery (66%).

The pathologic complete response (pCR) rate was 51%, and it was higher in HR-negative (64%) than in HR-positive (41%) patients. High HER2/FISH Ratio and high average HER2 copy number were correlated with higher pCR rates.

Patients who achieved pCR had longer disease-free survival and a trend towards improved overall survival. A total of 2% of patients showed a 10% decrease in left ventricular ejection fraction to below 50% during treatment. All patients except one recovered after discontinuation of trastuzumab.

### **Conclusion**

A sequential regimen of taxanes and anthracyclines plus trastuzumab was effective, with high pCR rates and long-term benefit, and a very good cardiotoxicity profile.

## **PRÓLOGO**

El interés por este trabajo parte de los inicios de la biología molecular y las terapias dirigidas en cáncer de mama en particular y en la oncología en general hace ya 14 años cuando muy poco estaba escrito sobre ello y fundamentalmente en este tumor agresivo como era el HER2 positivo.

El comprobar que unos meses de un tratamiento novedoso bastaban para eliminar el tumor por completo en un elevado número de pacientes fue una inspiración.

El ir más allá constatando que, además, estas pacientes no recaían y cambiábamos la historia natural de la enfermedad, que apenas meses después de haber terminado el tratamiento se incorporaban a la vida normal, fue otro motivo para ver qué ocurría con ellas a largo plazo.

Trabajar en equipo multidisciplinar que requiere coordinación, medir lo que hacemos, los beneficios y también los daños que reciben nuestras pacientes y aprender para mejorar fueron los objetivos principales de este estudio.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Epidemiología del cáncer de mama .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Incidencia y mortalidad.....	15
1.1.2 Prevalencia .....	20
<b>1.2 Factores de riesgo.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Edad.....	20
1.2.2 Género-exposición a Estrógenos-factores reproductivos.....	21
1.2.3 Etnia.....	22
1.2.4 Lesiones predisponentes en mama.....	22
1.2.5 Densidad mamaria.....	23
1.2.6 Obesidad.....	24
1.2.7 Dieta, isoflavonas, factores metabólicos y vitamina D.....	26
1.2.8 Alcohol.....	29
1.2.9 Radiaciones- medio ambiente.....	29
1.2.10 Predisposición genética.....	30
1.2.11 Virus Oncogénicos .....	32
<b>1.3 Clasificación del cáncer de mama.....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Clasificación histopatológica.....	33
1.3.2 Clasificación Molecular .....	39
<b>1.4 Diagnóstico y Estadificación.....</b>	<b>47</b>
<b>1.5 Tratamiento.....</b>	<b>52</b>
1.5.1 Cirugía.....	52
1.5.2 Radioterapia.....	56
1.5.3 Tratamiento sistémico adyuvante en:.....	57
a).- Cáncer de mama luminal.....	58
b).- Cáncer de mama HER2.....	62
c).- Cáncer de mama triple negativo.....	64
1.5.4 Tratamiento sistémico neoadyuvante en:.....	65
a).- Cáncer de mama luminal.....	65
b).- Cáncer de mama triple negativo.....	68
<b>1.6 Neoadyuvancia en el subgrupo HER2.....</b>	<b>70</b>
1.6.1 Expresión de HER2:.....	70
a).-Inmunohistoquímica.....	72

b).-Amplificación del gen.....	73
1.6.2 Neoadyuvancia en este subgrupo.....	75
1.6.2.1 Terapias antiHER2 disponibles.....	76
1.6.2.2 Datos de eficacia del tratamiento.....	77
1.6.2.3 Mecanismos de resistencia:.....	80
a).- Concepto de redundancia.....	82
b).- Concepto de reactivación.....	85
c).- Concepto de escape.....	86
1.6.2.4 Respuesta clínica.....	87
1.6.2.5 Respuesta patológica: .....	89
a).-Definición y métodos de medida.....	89
b).-Objetivo subrogado de supervivencia a largo plazo.....	93
<b>1.7 Cardiotoxicidad.....</b>	<b>96</b>
<b>II OBJETIVOS.....</b>	<b>101</b>
<b>III PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>102</b>
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
1.- Características basales de las pacientes.....	109
2.- Respuesta clínica.....	112
3.- Cirugía.....	113
4.- Respuesta patológica.....	114
5.- Eficacia a largo plazo (SLE y SG).....	117
6.- Cardiotoxicidad.....	126
<b>V DISCUSIÓN.....</b>	<b>130</b>
<b>VI CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>
<b>VIII ANEXOS.....</b>	<b>177</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.-</b> Incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.....	15
<b>Figura 2.-</b> Estimación del número de nuevos casos de cáncer de mama para el año 2019 en España.....	17
<b>Figura 3.-</b> Estimación de fallecimientos por tumores en España en ambos sexos para el año 2017 .....	18
<b>Figura 4.-</b> Evolución de la incidencia y mortalidad del cáncer de mama.....	19
<b>Figura 5.-</b> Interacción entre los adipocitos y el cáncer de mama.....	25
<b>Figura 6.-</b> Factores genéticos que se asocian a mayor riesgo de padecer cáncer de mama.....	31
<b>Figura 7.-</b> Grado histológico según el sistema de Nottingham.....	35
<b>Figura 8.-</b> Relación entre el grado histológico y la supervivencia específica por cáncer de mama.....	35
<b>Figura 9.-</b> Retrato molecular de tumores de mama.....	41
<b>Figura 10.-</b> Expresión génica de los tumores de mama que distingue diferentes subtipos.....	42
<b>Figura 11.-</b> Supervivencia global y libre de recaída por subtipo.....	43
<b>Figura 12.-</b> Patrones de expresión genética dentro del grupo triple negativo	44
<b>Figura 13.-</b> Relación pronóstica y predictiva entre las firmas genómicas y características clínicas en cáncer de mama.....	58
<b>Figura 14.-</b> Índice Pronóstico Endocrino Preoperatorio.....	67
<b>Figura 15.-</b> SLE y supervivencia específica por cáncer de mama en los diferentes grupos según el índice pronóstico PEPI.....	68
<b>Figura 16.-</b> Vía de señalización de HER2.....	71
<b>Figura 17.-</b> Algoritmo de amplificación de HER2 por hibridación in situ según el número de copias del gen HER2. Guías ASCO-CAP 2018.....	74
<b>Figura 18.-</b> Algoritmo de amplificación del gen HER2 por hibridación in situ usando doble prueba según las guías ASCO-CAP 2018.....	75
<b>Figura 19.-</b> Mecanismos de resistencia antiHER2.....	81
<b>Figura 20.-</b> Sistemas de clasificación de respuesta patológica.....	90

## FIGURAS Y TABLAS DE LOS RESULTADOS

<b>Figura 21.-</b> Tipos de quimioterapia.....	106
<b>Tabla 1.-</b> Características de las pacientes.....	111
<b>Tabla 2.-</b> Respuesta clínica.....	113
<b>Tabla 3.-</b> RCp en mama y mama/axila.....	114
<b>Tabla 4.-</b> RCp por subgrupos.....	115
<b>Tabla 5.-</b> RCp según niveles de amplificación del gen HER2.....	116
<b>Figura 22.-</b> SLE según el método de Kaplan-Meyer.....	118
<b>Figura 23.-</b> SG según el método de Kaplan-Meyer.....	119
<b>Figura 24.-</b> SLE en función de las respuesta patológica.....	120
<b>Figura 25.-</b> SG en función de la respuesta patológica.....	121
<b>Figura 26.-</b> SLE en función del número de copias del gen HER2.....	122
<b>Figura 27.-</b> SLE en función del valor ratio gen HER2/CEN17.....	123
<b>Figura 28.-</b> SG en función del número de copias del gen HER2.....	124
<b>Figura 29.-</b> SG en función del valor ratio gen HER2/CEN17.....	125
<b>Tabla 6.-</b> Factores de riesgo cardiovascular.....	127
<b>Tabla 7.-</b> Factores de riesgo cardiovascular en las pacientes que sufrieron un descenso de la FEVI<50%.....	128
<b>Figura 30.-</b> FEVI Basal, final de la quimioterapia y FEVI en el seguimiento...	129

## LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society Cancer Oncology
ATLAS	Adjuvant Tamoxifen Longer against Shorter
aTTOM	Adjuvant Tamoxifen Treatment Offer More
AKT	Proteína AKT de señalización intracelular
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSGC	Biopsia selectiva del ganglio centinela
CAP	Colegio Americano de Patólogos
cDNA	DNA circulante
CEN 17	Centrómero del cromosoma 17
CK5/6	Citoqueratinas 5/6
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group
ECM	Matriz extracelular
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FEVI	Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo
FISH	Fluorescent In Situ Hybridation
GEICAM	Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama
TOP2A	Topoisomerasa 2 alfa
HDA	Hiperplasia Ductal Atípica
HER2 $\Delta$ 16	Isoforma $\Delta$ 16 del receptor HER2
HLA	Hiperplasia Lobulillar Atípica
HR	Hazard Ratio
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IGF1R	Insulin Growth Factor Receptor 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IMC	Índice de Masa Corporal
ISH	In Situ Hybridation
Jak2	Proteína janus quinasa
LA	Linfadenectomía axilar
MAPQ	Vía de la proteína-quinasa
miRNA	microRNA
mTOR	Diana de la rapamicina en células de mamíferos
NA	Neoadyuvancia
NE	Neoadyuvancia endocrina
NGS	Nottingham Grading System
NIH	National Institute of Health
NPI	Nottingham Prognostic Index
nRCp	No respuesta completa patológica
OSNA	One-Step Nucleic acid Amplification

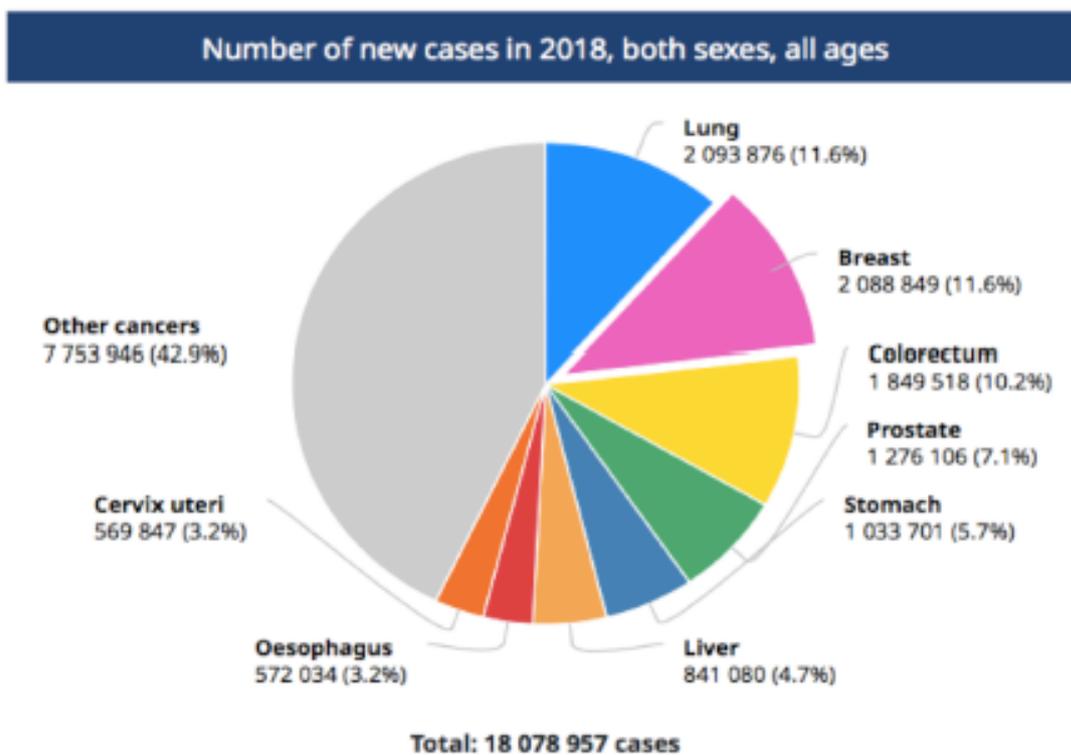
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
PAM50	Prediction Analysis of Microarray 50
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
PEPI	Índice Pronóstico Endocrino Preoperatorio
P95-HER2	Forma truncada del receptor HER2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI3KCA	Unidad catalítica de Fosfatidilinositol 3-quinasa
PTEN	Fosfatasa y homólogo de la tensina
RANK	Receptor Activator for Nuclear Factor K, molécula del metabolismo óseo
RCp	Respuesta completa patológica
RCB	Residual Cancer Burden
RE	Receptor de estrógeno
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
REGAT	Registro Gallego de Tumores
RH	Receptor hormonal
RNM	Resonancia Nuclear Magnética
SISH	Silver <i>In Situ</i> Hybridation
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SLED	Supervivencia libre de enfermedad a distancia
SG	Supervivencia Global
Src	Proteína quinasa Src
TAC	Tomografía axial computarizada
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TNM	Clasificación de tumores malignos (Tamaño, ganglios y metástasis)
VEB	Virus Epstein Barr
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPH	Virus del Papiloma Humano
ypN0	Ausencia de tumor en ganglios tras neoadyuvancia y cirugía
ypT0	Ausencia de tumor en mama tras neoadyuvancia y cirugía
ypTNM	Sistema de estadiaje patológico tras neoadyuvancia

# I.- INTRODUCCIÓN

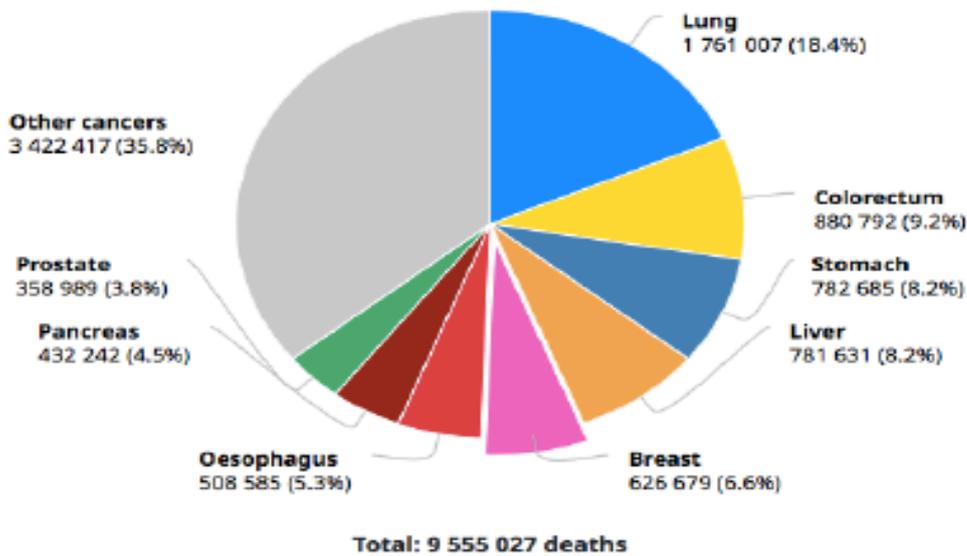
## 1.1 Epidemiología del Cáncer de mama

### 1.1.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer. A nivel mundial se estima que en torno a 2,08 millones de mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de mama en el año 2018 y es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer en los países desarrollados, después del cáncer de pulmón (figura 1).<sup>1</sup>



**Number of deaths in 2018, both sexes, all ages**



**Figura 1** Incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial  
<http://globocan.iarc.fr> 2018

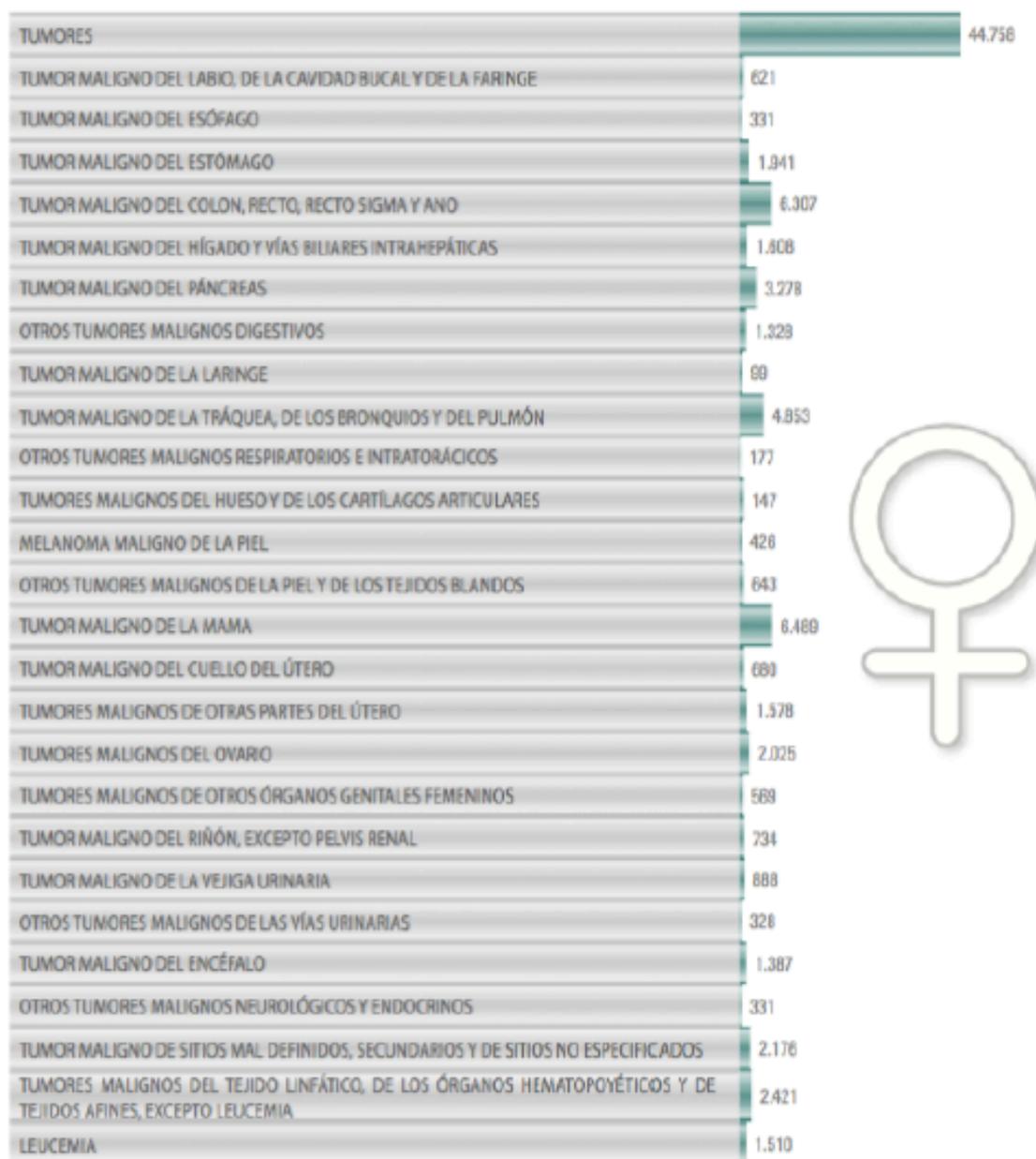
En Estados Unidos, según los datos del SEER( Surveillance Epidemiology and End Results) se estimó que en el período comprendido entre 2012 y 2016 el cáncer de mama fue la causa de muerte de más de 37.000 hombres y mujeres/año, con más de 221.000 nuevos casos/año.<sup>2</sup>

En España, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente diagnosticado en la mujer con 32.536 casos estimados para el año 2019, 28% del total de cánceres (116.170) diagnosticados. Ocasionalmente la muerte a 6.489 mujeres, 14.5% del total de muertes por cáncer estimadas para el año 2017 (44.758)(figuras 2 y 3).<sup>3</sup>

TIPO TUMORAL	N
Cavidad oral y faringe	8.486
Esófago	2.353
Estómago	7.865
Colon y recto	44.937
Hígado	6.499
Vesícula biliar	2.873
Páncreas	8.169
Laringe	3.305
Pulmón	29.503
Melanoma de piel	6.205
Mama	32.536
Cérvix uterino	1.987
Cuerpo uterino	6.682
Ovario	3.548
Próstata	34.394
Testículo	1.302
Riñón (sin pelvis)	7.331
Vejiga urinaria	23.819
Encéfalo y sistema nervioso	4.401
Tiroides	5.178
Linfoma de Hodgkin	1.486
Linfomas no Hodgkin	9.082
Mieloma	3.171
Leucemias	6.405
Otros	15.717
Todos excepto piel no melanoma	277.234

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

**Figura 2** Estimación del número de nuevos casos de cáncer de mama para el año 2019 en España  
<https://www.seom.org/es/noticias-las-cifras-del-cancer-en-espana-2019>

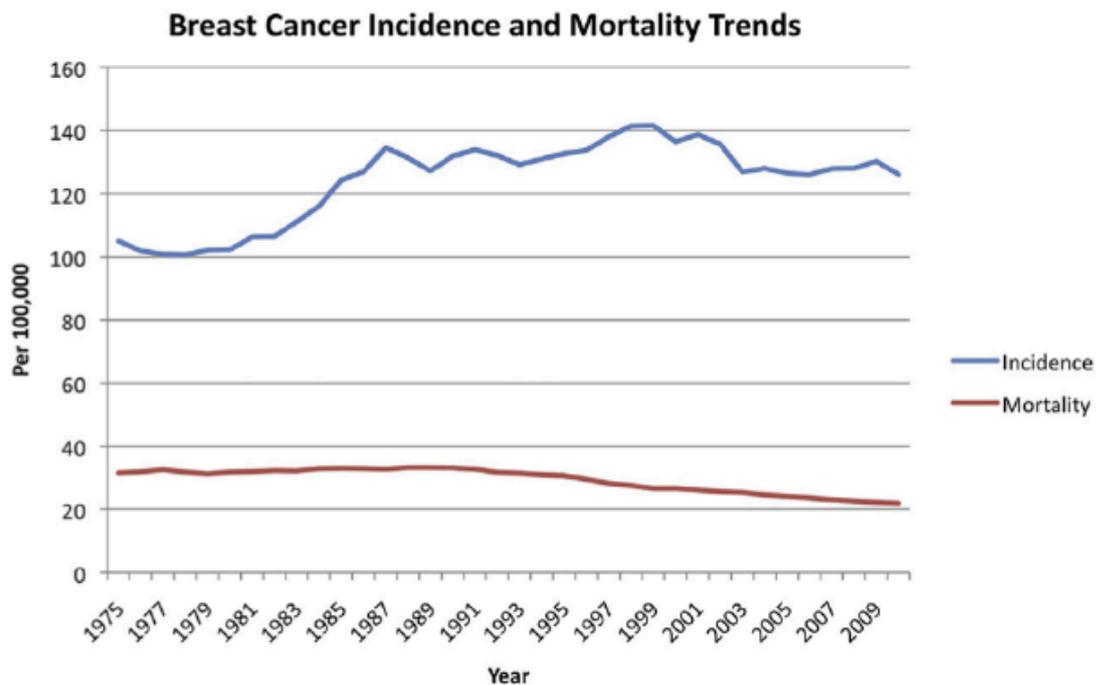


Fuente: IñF. IñFbase. Últimos datos disponibles para 2016.

**Figura 3 Fallecimientos por tumores en España para el año 2017, ambos sexos**  
<https://www.seom.org/es/noticias-las-cifras-del-cancer-en-espana-2019>

En la comunidad gallega según datos del Registro Gallego de Tumores (REGAT), el número de casos de cáncer de mama diagnosticados en el año 2015 estuvo en torno a 1800.<sup>4</sup>

Históricamente, la incidencia de cáncer de mama ha ido aumentando en Estados Unidos un 1% por año hasta los años 80 probablemente coincidiendo con el comienzo de la mamografía de cribado. En los años 90 se mantuvo estable y en la década del 2000 empezó a decrecer, manteniéndose estable desde el año 2004 hasta la fecha (figura 4).



**Figura 4** Evolución en la incidencia y mortalidad del cáncer de mama  
*Howlader, National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2010*  
*SEER website Apr 2014*

Desde 1950, la mortalidad por cáncer de mama en Estados Unidos ha ido descendiendo una media de 0.6% al año, con un descenso de más del 34% desde entonces.

La supervivencia a 5 años ha pasado del 60%, a principios de los años 50, a casi del 92% en la década del 2000.<sup>2</sup>

Según el Instituto Nacional de Epidemiología de España, entre los años 2003-2012, la tasa de mortalidad por tumores se redujo un 1,32% y un 0.56% al año en

hombres y mujeres respectivamente pese a que se experimentó un aumento global de la incidencia.<sup>5</sup>

### **1.1.2 Prevalencia**

El cáncer de mama es el tumor más prevalente en España en la población general. Según los datos de Globocan 2012 y extrapolados a los datos de la población española para el 2017, el número de casos de cáncer de mama que sobreviven después de 5 años tras el diagnóstico fueron 104.405. Esto lleva consigo la necesidad de un seguimiento, tratamiento y soporte para estas pacientes así como el consumo de recursos.<sup>5</sup>

## **1.2 Factores de riesgo**

### **1.2.1 Edad**

A parte del sexo femenino, la edad, es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de un cáncer de mama. La incidencia aumenta con la edad.

En Estados Unidos entre los años 2011 a 2013, la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama hasta los 49 años fue de una cada 52 mujeres mientras que en mayores de 70, llegó a ser de uno cada 15. La mortalidad por cáncer de mama también aumenta con la edad a partir de los 40 años. En el año 2014 murieron en ese país 10.708 mujeres entre 40-59 años, y 18.461 entre los 60-79 años.<sup>6</sup>

En España, en el estudio de registro ALAMO I-III llevado a cabo por GEICAM (Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama) donde se analizan 26.075 casos de cáncer de mama diagnosticados y tratados en hospitales españoles entre los años 1990-2001, la incidencia de cáncer aumentó con la edad, siendo la edad de mayor riesgo entre

los 45 y 70 años. En este intervalo de tiempo, la incidencia de cáncer de mama en menores de 44 años estuvo en torno al 20%.<sup>7,8</sup>

### **1.2.2 Género-exposición a estrógenos-factores reproductivos**

La exposición a estrógenos y diferentes factores reproductivos inherentes al sexo femenino se han asociado durante décadas a un mayor riesgo de desarrollar un cáncer de mama.

No está muy claro si esta exposición a estrógenos afecta por igual a los diferentes subtipos.

En diferentes estudios y metaanálisis se constata que la edad tardía de la menarquia, la paridad y tener el primer hijo a edad joven, protegen frente al desarrollo de cánceres receptor hormonal positivo. Sin embargo, la lactancia protege fundamentalmente frente a cánceres de mama receptor hormonal negativo.<sup>9</sup>

La edad tardía de la menopausia se relaciona fundamentalmente con un aumento de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama tipo luminal aunque en algunos trabajos también se ha relacionado con el cáncer de mama triple negativo; habrá que validarlo con más estudios.<sup>9</sup>

El uso de anticonceptivos orales se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de mama triple negativo y en algunos estudios, con una reducción de riesgo de cáncer luminal.

Sin embargo, el uso de terapia hormonal sustitutiva en la menopausia se relaciona con un aumento dramático del riesgo de desarrollar tumores luminales.<sup>10</sup>

En cuanto al género masculino, aproximadamente 1% de los tumores malignos de mama ocurren en el varón. El riesgo que tiene un varón de desarrollar un cáncer de

mama a lo largo de su vida es de 1 de cada 1000 y esto se ha mantenido estable en los últimos 30 años.<sup>11</sup>

### **1.2.3 Etnia**

En estados unidos, la incidencia de cáncer de mama es mayor en las mujeres blancas, seguidas de las afroamericanas, asiáticas, hispanas e indias americanas.

Las mujeres afroamericanas se diagnostican a edades más jóvenes y su mortalidad es más elevada hasta la edad de 57 años. Se diagnostican en estadios más avanzados, sus tumores son más agresivos y con una mayor tasa de recurrencia.<sup>12,13</sup>

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente diagnosticado en la mujer hispana aunque la incidencia es un 26% más baja que en la mujer blanca. Las hispanas se diagnostican en estadios más avanzados probablemente debido a que el cribado se realiza en pocas mujeres siendo por tanto la principal causa de muerte por cáncer en esta población.<sup>14</sup>

### **1.2.4 Lesiones predisponentes en mama**

Existen 3 grupos de lesiones benignas diferentes en la mama que se relacionan con un menor o mayor riesgo de desarrollar un cáncer de mama: lesiones no proliferativas de la mama (fibrosis, quistes, fibroadenomas..), lesiones proliferativas sin atipia (fibroadenoma complex e hiperplasia ductal sin atipia entre otras) y las lesiones proliferativas con atipia (hiperplasia ductal atípica (HDA) e hiperplasia lobulillar atípica (HLA).

Las lesiones no proliferativas no se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar un cáncer de mama.

Las lesiones proliferativas sin atipia se relacionan con un riesgo de desarrollar cáncer de mama de 1.5-2 veces mayor que aquellas pacientes que no tienen estas lesiones.

Las lesiones proliferativas con atipia, tipo HDA y HLA se relacionan con un riesgo entre 4-5 veces mayor de desarrollar un cáncer.<sup>13</sup> A los 25 años de seguimiento, el riesgo absoluto de desarrollar un cáncer sería del 30%.

En los primeros 10 años desde la biopsia, el cáncer suele desarrollarse en la misma mama, mientras que en los años siguientes se desarrolla por igual en la mama contralateral.<sup>15</sup> Esto significa que las hiperplasias atípicas son tanto lesiones precursoras de cáncer como marcadores de predisposición.<sup>16,17</sup>

Existe controversia en cuanto a si la historia familiar de cáncer de mama añade más riesgo a las pacientes que tienen estas lesiones benignas. Los datos actuales sugieren que la hiperplasia atípica es un factor de riesgo independiente.<sup>16,17</sup>

### **1.2.5 Densidad mamaria**

La densidad mamaria es un indicador mamográfico que refleja la cantidad de tejido glandular y conectivo que existe en la mama con respecto a la grasa. Una alta densidad mamaria se ha relacionado desde hace años con un riesgo de hasta 4 veces más de desarrollar un cáncer de mama.<sup>18-20</sup>

Los mecanismos biológicos que expliquen esta relación no son del todo conocidos.

Los factores que predisponen a una elevada densidad mamaria son en un 60% hereditarios pero en un 20-30% pueden influir la edad, la paridad, la menopausia y el índice de masa corporal (IMC). La densidad mamaria disminuye con la edad, el

embarazo y la menopausia. Es menor en aquellas pacientes con un IMC elevado debido a la mayor proporción de tejido graso en estas pacientes.<sup>21</sup>

La densidad mamaria varía con las terapias hormonales. Con el Tamoxifeno la densidad mamaria baja pero aumenta con la terapia hormonal sustitutiva en la menopausia. El alcohol puede aumentarla.<sup>22,23</sup>

### **1.2.6 Obesidad**

Sabemos que la acumulación excesiva de tejido adiposo se relaciona con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama fundamentalmente en la mujer menopáusica donde el tejido graso es una gran fuente de estrógenos. Así mismo, la obesidad se relaciona con altos niveles de insulina y de diabetes en estas mujeres lo que también supone un factor de riesgo.

Existen diferentes hipótesis de por qué el tejido adiposo puede inducir tumorigénesis, pero los mecanismos moleculares implicados deben ser estudiados con más detalle.

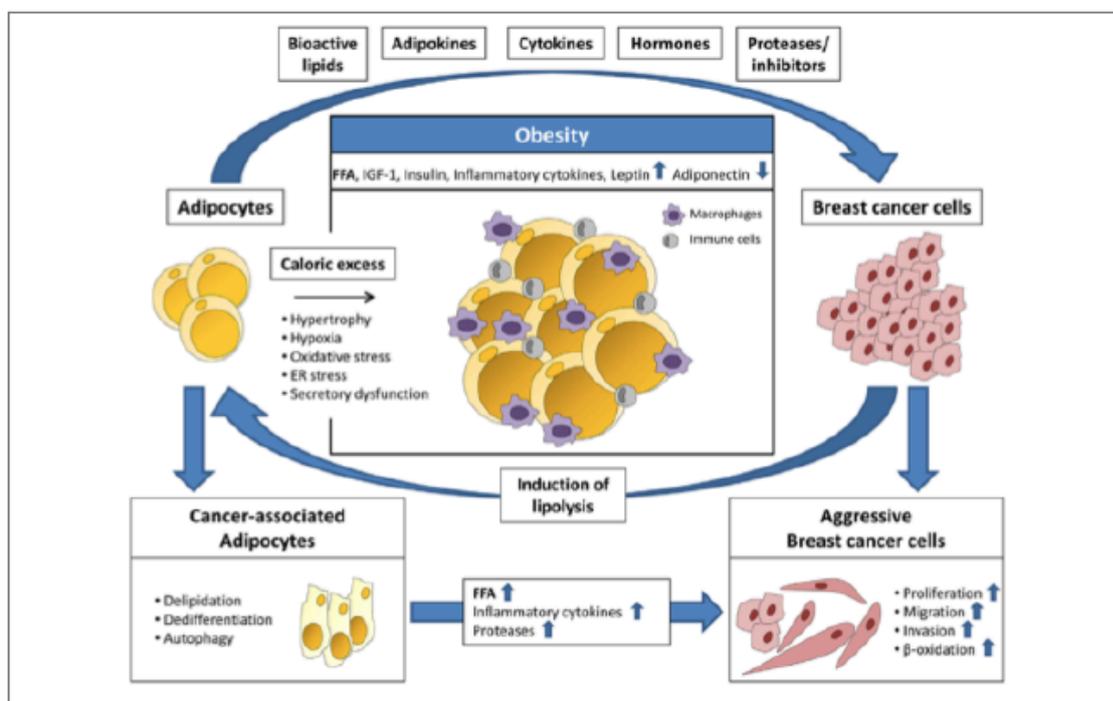
Los adipocitos además de ser fuente de energía, tienen un papel en la señalización endocrina secretando hormonas, citoquinas, adipoquinas y factores de crecimiento a otros tejidos y pudiendo favorecer la proliferación celular mamaria.

Por otro lado, la elevada ingesta calórica y el sedentarismo inducen a la obesidad, situación donde los adipocitos se hipertrofian y segregan ácidos grasos libres, citoquinas inflamatorias y proteasas que pueden suponer un mecanismo directo de crecimiento tumoral (figura 5).<sup>24</sup>

Estos ácidos grasos libres son diversos y pueden tener un efecto tumorigénico, como es el caso del Oleato,<sup>25</sup> o inhibitorio, cuando hablamos del Palmitato.<sup>26</sup>

Por otro lado, las células de cáncer de mama pueden secretar enzimas que sintetizan y movilizan lípidos que pueden promover el crecimiento tumoral.

Las pacientes con cáncer de mama que tienen un índice de masa corporal (IMC) elevado tienen peor supervivencia, independiente del momento en que se mida: al diagnóstico, a los 12 meses del mismo o más de 12 meses. Esto hace que debamos insistir a las pacientes y largas supervivientes que se mantengan en un peso adecuado.<sup>27</sup>



**Figura 5** Interacción entre los adipocitos y el cáncer de mama  
*Blucher, C Frontiers in Endocrinology, 2017*

### 1.2.6.1 Metabolismo del Colesterol, ácidos grasos Omega 3 y Omega 6

Cambios en las cifras de colesterol y en el metabolismo lipídico relacionado con la ingesta u obesidad se han relacionado con el cáncer de mama pero con resultados inconsistentes.

Tras una revisión sistemática y un meta-análisis reciente, se sugiere que el colesterol que ingerimos en la dieta se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de mama.<sup>28</sup>

Los ácidos grasos poliinsaturados son parte esencial de la dieta. Su relación con el cáncer de mama depende de otros factores como la edad, la menopausia, el tipo de cáncer o la cantidad que se ingiere.

Los ácidos grasos Omega 3 tienen actividad antiinflamatoria mientras que los Omega 6 intervienen en el inicio y mantenimiento de la inflamación. Por tanto, una dieta con baja relación Omega 3/Omega 6 se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de mama mientras que una elevada ingesta de Omega 3 se relaciona con un menor riesgo.

29,30

### **1.2.7 Dieta, isoflavonas, factores metabólicos y vitamina D**

Ciertos componentes de la dieta se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. En los últimos años, se ha publicado mucho al respecto con mayor o menor grado de evidencia.

#### **1.2.7.1 Proteínas**

La carne roja, según como se procese o cocine es fuente de carcinógenos (aminos heterocíclicos, N-nitroso, hidrocarburos poliaromáticos).<sup>31</sup>

Se sugiere que, la grasa que va con la carne roja así como el efecto de cocinarla a altas temperaturas aumenta el riesgo de cáncer, aunque se ha visto en varios meta-análisis que éste no es un factor independiente de riesgo.<sup>31</sup>

Por otro lado, se ha descrito que este riesgo se relaciona con el estado hormonal de la mujer. En mujeres premenopáusicas el consumo de carne roja es factor de riesgo

de cáncer mientras que en la mujer postmenopáusica, este riesgo viene dado por otros factores como puede ser el aumento del tejido adiposo en estas mujeres.<sup>32</sup>

En cuanto al pescado, parece que los ácidos grasos poliinsaturados que contiene inhiben la carcinogénesis in vitro y reducen el riesgo de padecer cáncer de mama en humanos.<sup>33</sup>

### **1.2.7.2 Carbohidratos**

La relación entre el consumo de carbohidratos y el índice glucémico con el riesgo de cáncer de mama no es concluyente.

El consumo de carbohidratos se relaciona con hiperinsulinemia y ésta con un aumento de los niveles del factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF-1) el cual sí se relaciona con un aumento de riesgo de desarrollar cáncer de mama.<sup>34</sup>

Sin embargo, el consumo de nutrientes implicados en el control glucémico como la fibra, el calcio, el magnesio o el zinc sí se relacionan con una reducción del riesgo de desarrollar cáncer de mama.<sup>35</sup>

### **1.2.7.3 Polifenoles/Flavonas**

Los polifenoles son metabolitos procedentes de las plantas que parecen tener un efecto antioxidante, antiinflamatorio y anticarcinogénico. Dentro de ellos, las flavonas e isoflavonas han sido las más estudiadas en este contexto.

Aunque existen estudios contradictorios y se precisan más análisis prospectivos, parece que existe un efecto protector en el consumo de isoflavonas frente al cáncer de mama, fundamentalmente en población asiática y en mujeres postmenopáusicas.<sup>36,37</sup>

#### **1.2.7.4 Frutas y verduras**

Las frutas y verduras se relacionan con un efecto protector frente al cáncer de mama fundamentalmente por su contenido en polifenoles y en fibra.

Un consumo elevado de estos alimentos se relaciona con un menor riesgo de padecer cáncer de mama, fundamentalmente de tumores con receptor de estrógeno negativo.<sup>38,39</sup>

El licopeno, pigmento carotenoide presente en verduras y frutas como el tomate, la sandía, el pomelo, papaya, entre otras, tiene efecto protector frente al cáncer de mama. En series de casos y controles o estudios prospectivos se vio que el nivel en suero de licopenos se relacionaba inversamente con el riesgo de padecer cáncer de mama.<sup>40,41</sup>

#### **1.2.7.5 Vitaminas y Oligoelementos**

La vitamina D tiene propiedades anti-carcinogénicas potenciando la apoptosis o inhibiendo el crecimiento celular.

Se ha demostrado de forma experimental y en estudios epidemiológicos una asociación inversa entre la vitamina D y el cáncer de mama, llegándose a demostrar en series largas de pacientes una reducción del riesgo del 45% asociado a niveles altos de vitamina D en sangre así como a altas dosis diaria de la misma (>400 UI).<sup>42-45</sup>

Otros estudios y meta-análisis no han sido capaces de demostrar esta asociación protectora de la vitamina D<sup>46,47</sup> aunque, recientemente, sí se ha visto una asociación entre niveles altos de vitamina D y un aumento de la supervivencia.<sup>48,49</sup>

Con respecto al calcio hay menos evidencia de su papel anti-carcinogénico y, existen estudios contradictorios en cuanto a su relación con un menor riesgo de padecer cáncer de mama.<sup>50,51</sup>

El zinc, las vitaminas A,B, C, E, los folatos y el beta caroteno podrían tener propiedades antioxidantes y reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama pero los estudios que disponemos son contradictorios al respecto.

### **1.2.8 Alcohol**

La asociación entre el consumo de alcohol y el cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas.

El análisis conjunto de seis estudios prospectivos sugiere que el riesgo aumenta un 7% por cada 10 g de consumo de alcohol al día.<sup>52</sup>

El mecanismo de acción podría relacionarse con el aumento de apetito, de peso y la potenciación de la actividad estrogénica.

En un estudio francés (E3N-EPIC) que incluye a más de 66.000 personas se detectaron 2800 cánceres de mama con una asociación lineal entre el consumo de alcohol en mujeres postmenopáusicas y tumores receptor hormonal positivo.<sup>53</sup>

### **1.2.9 Radiaciones-Medio ambiente**

La radioterapia se relaciona con riesgo de desarrollar cáncer de mama fundamentalmente en mujeres que recibieron radioterapia torácica a edades jóvenes.<sup>54,55</sup>

Así, niñas que se expusieron a altas dosis de irradiación sobre el tórax (por ejemplo por la enfermedad de Hodking) tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama.<sup>56</sup>

Este riesgo comienza a los 8 años del tratamiento y se mantiene durante más de 25 años.<sup>55</sup>

El dietilestilbestrol dado a las mujeres embarazadas entre los años 40 y 60 creyendo que disminuía el riesgo de aborto, se relaciona con un riesgo de hasta un 30% de cáncer de mama en estas mujeres frente a las que no lo tomaron.<sup>57</sup>

En cuanto a la polución ambiental, estudios epidemiológicos no han sido capaces de demostrar una asociación directa de pesticidas órgano-clorados, entre otros, con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Algunas exposiciones ocupacionales sí se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama: en personas que trabajan en el campo de la esterilización, por la exposición a óxido de etileno<sup>58</sup> o aquellas profesiones que tienen turnos de noche.

La exposición a la luz durante la noche altera la producción de melatonina, hormona que regula el sueño y que posee actividad antitumoral.<sup>59,60</sup>

Un meta-análisis sugiere que el trabajar en turno de noche puede aumentar el riesgo de cáncer de mama un 40%.<sup>59</sup>

### **1.2.10 Predisposición genética**

En menos del 30% de las pacientes con historia personal o familiar de sospecha de cáncer de mama hereditario se demuestra una mutación genética asociada.

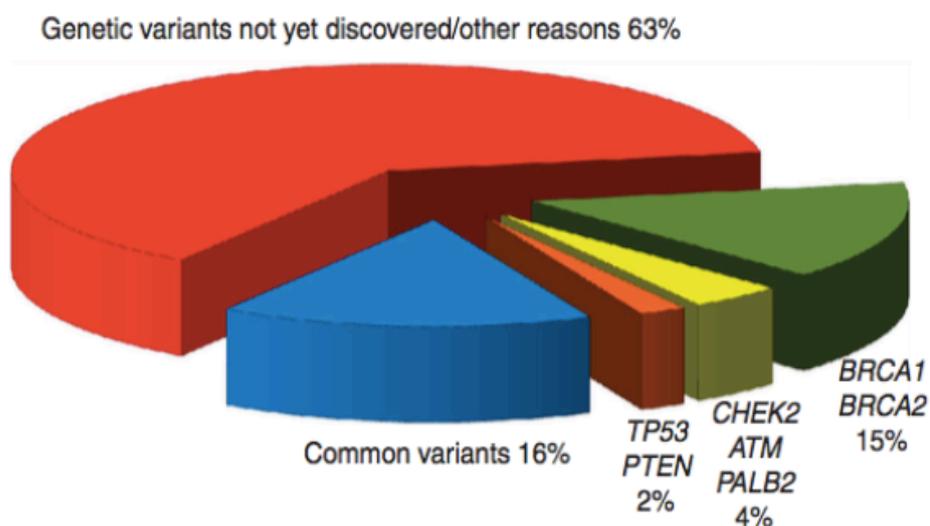
Aproximadamente el 7% de los cánceres de mama se asocian con una predisposición hereditaria principalmente relacionada con mutaciones en los genes de alta penetrancia BRCA 1 y 2 (figura 6).

En un meta-análisis se observó que el riesgo acumulado de desarrollar un cáncer de mama a la edad de 70 años en pacientes con mutación de BRCA 1 es del 57% frente a un 49% en pacientes con mutación en BRCA2. Mutaciones en estos genes

también predisponen al cáncer de ovario, con un riesgo acumulado del 40% para mutaciones en BRCA1 y del 18% para mutaciones en BRCA2.<sup>61,62</sup>

Existen otros genes de alta penetrancia relacionados con un aumento de riesgo de padecer cáncer de mama como son: PTEN, P53, CDH1 y STK11.<sup>63,64</sup>

Otros genes, denominados de moderada penetrancia, pueden ser responsables del 2-3% de los cánceres de mama hereditarios: CHEK2, BRIP1, ATM y PALB2.<sup>65-68</sup>



**Figura 6** Factores genéticos que se asocian a mayor riesgo de padecer cáncer de mama  
*Anja, R British Journal of Cancer 2016*

En los últimos años hemos pasado de detectar mutaciones en BRCA 1 y 2 mediante secuenciación (PCR) a realizar largos reordenamientos de dichos genes aumentando la capacidad de detectar una mutación. Actualmente en la era de los paneles multigenes, otros genes diferentes a BRCA 1 y 2, pueden tener utilidad clínica de cara a poder realizar medidas preventivas siempre y cuando estos test tengan validez analítica y clínica.<sup>69,70</sup>

### **1.2.11 Virus Oncogénicos**

La participación de los virus en el desarrollo del cáncer de mama se ha estudiado durante décadas.

Cuatro virus han demostrado tener capacidad oncogénica con diferentes grados de evidencia: el virus del tumor mamario de los ratones, el de la leucemia bovina, el virus del Papiloma humano (VPH) y el Epstein Barr (VEB).<sup>71</sup>

La prevalencia de estos virus es mayor en tejidos de cáncer de mama que en la mama normal o en lesiones benignas de la misma. Por otro lado, la presencia de estos virus en la mama normal o en lesiones benignas en pacientes que tiempo después desarrollan cáncer (con presencia del virus en sus tumores), nos apoyan la causalidad de los mismos.

En cuanto al virus del tumor mamario de los ratones, existe evidencia importante de su poder oncogénico en cáncer de mama, pero ésta no es concluyente. Algunos autores consideran la presencia de este virus en los tejidos de cáncer de mama como posible contaminación.<sup>72</sup>

La evidencia existente referente al virus de la leucemia bovina es más limitada pero importante debido al gran consumo de leche y derivados, así como de carnes de ternera en los países desarrollados.

El papel del VPH como causa de cáncer de mama es substancial pero no concluyente. No se asocia con inmunosupresión como ocurre con el cáncer de cérvix.

Parece que puede actuar sobre el complejo de enzimas APOBEC que regulan el ciclo celular, activando la proliferación celular, inhibiendo la apoptosis y produciendo inestabilidad genómica.<sup>73</sup> Probablemente actúe en colaboración con otros virus como el del tumor mamario de los ratones o el VEB.

El VEB es causa directa de linfomas y de otros cánceres.

La prevalencia del VEB en cáncer de mama en comparación con los controles es alta y, actúa activando la vía HER2/HER3 de señalización intracelular.<sup>74</sup>

### **1.3.-Clasificación del cáncer de mama**

El cáncer de mama no es una enfermedad única. Me referiré exclusivamente al componente infiltrante ya que el intraductal o intralobulillar son lesiones previas desde el punto de vista carcinogénico que, no se comportan de forma agresiva y carecen de capacidad para metastatizar tras tratamiento local.

Existen diferentes subtipos de tumores infiltrantes con un comportamiento clínico y biológico diferente.

#### **1.3.1 Clasificación Histopatológica**

##### **Factores histopatológicos**

Desde el punto de vista histopatológico la variedad más frecuente es el carcinoma ductal infiltrante que supone el 70-80% de todos los cánceres infiltrantes de mama. El 25% restante incluye 17 variedades diferentes más infrecuentes entre las que destacan: el carcinoma lobulillar, tubular, medular y metaplásico.

Así como en el carcinoma ductal y en el lobulillar se representan todos los subtipos moleculares (Luminales, HER2 y basales), el resto de histologías infrecuentes parece que dependen de un mecanismo único desde el punto de vista molecular.<sup>75</sup>

Los parámetros histo-morfológicos más importantes son: el tamaño del tumor, la afectación o no ganglionar, el grado de diferenciación y el índice de proliferación.<sup>76-78</sup>

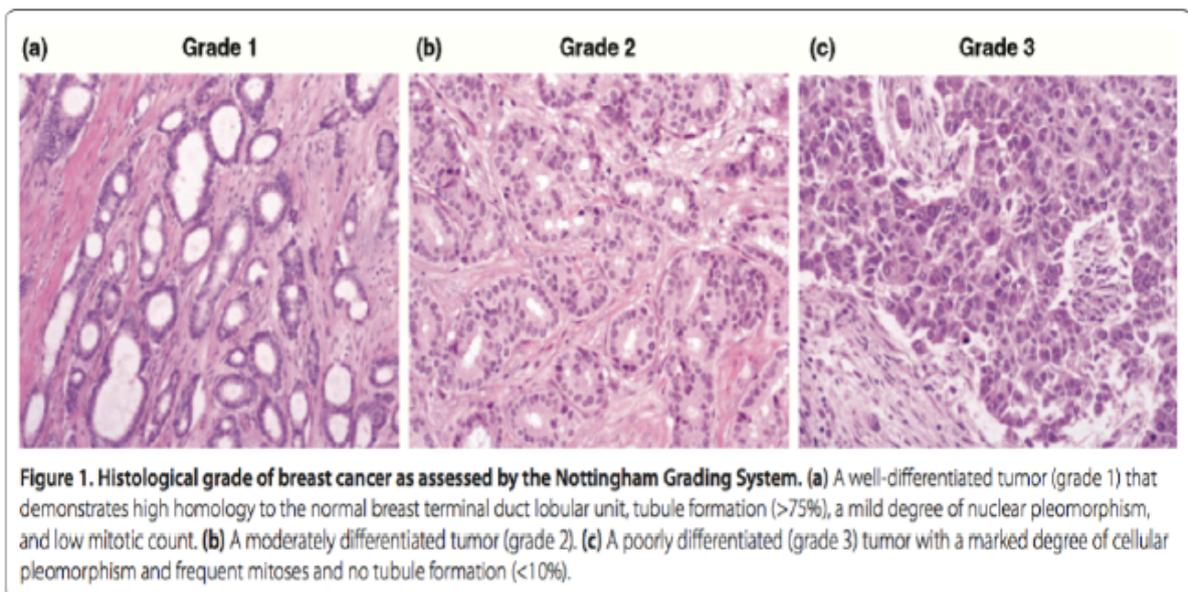
Desde el punto de vista inmuno-histoquímico la expresión o no de receptores de estrógeno y progesterona y la expresión/amplificación o no del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) diferencia a los tumores.

Tanto los parámetros morfológicos como inmuno-histoquímicos aportan información pronóstica<sup>79</sup> y, los segundos también información predictiva de respuesta a tratamiento.

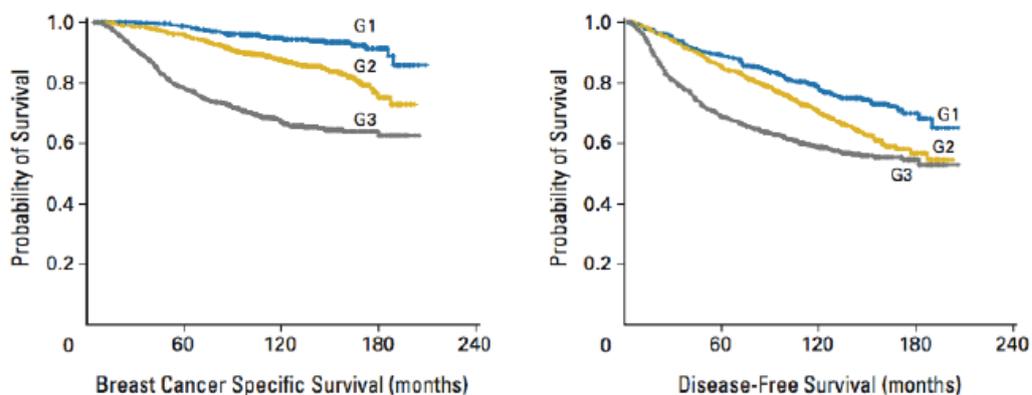
Toda paciente diagnosticada de un cáncer de mama tiene que tener un buen estadiaje tanto clínico como patológico que incluye parámetros como el tamaño (T), la afectación ganglionar (Node) (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M), recogido en el TNM de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y que, se revisa periódicamente aportando información de cara a la mejor opción de tratamiento local, la necesidad o no de tratamiento sistémico y un sistema que sea reproducible en las diferentes instituciones o comunidades científicas.<sup>80</sup>

El grado histológico tiene en cuenta tres características morfológicas del tumor: la formación de glándulas o túbulos, el pleomorfismo nuclear y el número de mitosis. Para medirlo utilizamos el Nottingham Grading System (NGS, grado histológico según el sistema de Nottingham), aceptado por toda la comunidad científica (figura 7).<sup>81</sup>

Hay evidencia fuerte que avala el valor pronóstico independiente del mismo (figura 8).<sup>76,82,83</sup>



**Figura 7** Grado histológico según el sistema de Nottingham *Eltson, CN Histopathology 1991*



**Figura 8** Relación entre el grado histológico y la supervivencia específica por cáncer de mama. *Rakha, EA J Clin Oncol 2008*

El grado se ha combinado con la información que aporta el tamaño del tumor y la afectación ganglionar, dando lugar a diferentes índices pronósticos como son: el Nottingham Prognostic Index (NPI)<sup>76</sup> y el Kalmar Prognostic index<sup>83</sup> en población sueca, en el que se le da más peso al grado que al estadio frente al NPI en el que estos parámetros se valoran por igual.

Puede existir variación entre el grado que determinamos en la biopsia con aguja y el que resulta del análisis del espécimen quirúrgico. En el 30-40% de los casos el grado I previo puede ser un grado II; el grado III en la biopsia en pocos casos (5-8%) cambia en la muestra quirúrgica y es excepcional que el grado I pase a ser III en la cirugía y viceversa (0-1%). La razón fundamental, a parte de la posible heterogeneidad de los tumores, es que la cantidad de mitosis que se ven en la aguja gruesa son menores y que éstas se suelen ver en la periferia de las muestras quirúrgicas.<sup>84</sup>

Existen diferentes proteínas relacionadas con la proliferación celular en cáncer de mama y que se relacionan con el pronóstico.<sup>85</sup> De ellas, la más estudiada es el Ki-67. Se expresa en cualquier fase de la división celular, excepto en la G0 y se sitúa fundamentalmente en el nucléolo.

A pesar de ser un marcador conocido y estudiado por la mayoría de los patólogos, no está reconocido por las sociedades científicas internacionales como la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) o la “international Ki-67 in breast cancer working group”, como marcador habitual y obligado, dada la variabilidad en su análisis y la baja reproducibilidad del mismo.<sup>86,87</sup>

En la práctica clínica el Ki-67 se analiza en las muestras de parafina mediante técnicas de inmunohistoquímica y el anticuerpo más utilizado es el MIB-1. Lo que detecta es el porcentaje de células tumorales en división.

Numerosos estudios han demostrado el valor del Ki-67 como factor pronóstico.<sup>88,89</sup> Así en tumores que expresan receptores hormonales, niveles altos del mismo se relacionan con peor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG).

Sin embargo, no existe un punto de corte claro a partir del cual discernir el riesgo. En el estudio de Cheang<sup>88</sup>, el punto de corte del Ki-67 fue 14, ya que por debajo

de este valor, los tumores genéticamente eran de bajo riesgo, frente a los que tenían un valor superior, que eran de peor pronóstico.

Con estos datos, el grupo de expertos del congreso de Saint Gallen consensúa, dada la variabilidad entre laboratorios, que estableciendo un punto de corte en 20, los tumores por encima de ese valor, serían claramente de alto riesgo frente a los que están por debajo que serían de bajo riesgo.<sup>90,91</sup>

Otro parámetro histomorfológico que también aporta información es la infiltración linfovascular. Se ha demostrado que la presencia de invasión linfática y vascular en el tumor, medida con técnicas de Hematoxilina-Eosina, se relaciona con una peor supervivencia y con un aumento de las recaídas en pacientes operadas de cáncer de mama que no reciben tratamiento adyuvante.<sup>92</sup>

El 75-80% de los cánceres de mama expresan receptores hormonales. Éstos se determinan de forma rutinaria por inmunohistoquímica y son la base para la indicación de terapias endocrinas.

El 15-20% de los cánceres de mama expresa y/o amplifica HER2, lo que conlleva beneficio de una terapia dirigida contra dicha proteína/gen. Cerca de la mitad de estos tumores expresan además receptores hormonales aunque en estudios retrospectivos se vio que el nivel de expresión de receptores hormonales en este subgrupo es bajo.<sup>93</sup>

El 10-15% restante no expresan receptores hormonales ni HER2 lo que confiere agresividad al tumor y ausencia de terapias dirigidas contra ellos.

Desde el punto de vista inmuno-histoquímico reciben el nombre de tumores triple negativos aunque, como veremos más adelante, desde el punto de vista molecular representan a una gran variedad de entidades diferentes.

Suelen ser tumores con un alto grado de diferenciación, un índice mitótico y un Ki-67 elevado, marcado pleomorfismo y atipia nuclear, necrosis o zonas acelulares centrales, elevado número de células apoptóticas o de infiltración linfocitaria estromal. Características en gran mayoría comunes a los carcinomas de alto grado sin especificar origen.

Dentro de estos tumores de alto grado se incluirían los carcinomas medulares típicos y atípicos y los carcinomas anaplásicos pero existen tumores triple negativos de bajo grado entre ellos el carcinoma adenoide quístico, y los carcinomas de bajo grado adenoescamosos y de célula fusiforme.

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, la mayoría de estos tumores expresan citoqueratinas de alto peso molecular como la CK5/6 y EGFR; que, sumado a la ausencia de expresión del receptor de estrógeno y de HER2 supuso la primera definición de tumor basal.<sup>94</sup> Existen, sin embargo, otras definiciones que incluyen la ausencia de expresión del receptor de progesterona o que sólo tienen en cuenta la expresión de citoqueratinas.<sup>95</sup>

Dada la heterogeneidad de estos tumores no existe una definición única desde el punto de vista inmuno-histoquímico que pueda incluir a todos los cánceres que están dentro de este grupo.

El término basal-like se refiere a un fenotipo molecular y, aunque a veces se utiliza de forma intercambiable con el término triple negativo, no son lo mismo. De hecho, no todos los tumores basal-like presentan un fenotipo triple negativo.

Se han identificado un 15% de estos tumores que expresan receptor de estrógeno, de progesterona o HER2. Por otro lado, no todos los tumores triple negativos son basales desde el punto de vista molecular, si no que, algunos de ellos pertenecen al grupo normal-like.<sup>94,96,97</sup>

Aunque la inmunohistoquímica nos aporta información pronóstica y predictiva de tratamiento, tiene limitaciones ya que el comportamiento de tumores que presentan similares características a este nivel puede ser diferente en cuanto a respuesta a tratamiento y evolución a largo plazo. Además, esta clasificación está lejos de lo que ocurre a nivel molecular y no aporta conocimiento sobre las características biológicas de cada tumor.

### **1.3.2 Clasificación Molecular**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea en su historia natural y en la respuesta a los diferentes tratamientos. Por este motivo, se trató de ver si desde el punto de vista genómico se podía justificar este diferente comportamiento.

En el año 2000, Perou et al<sup>98</sup> publican el primer trabajo en el que analizaban la expresión de cDNA por microarrays de tejido tumoral y tejido normal de 42 individuos, estudiando un total de 1753 genes que se expresaban de forma variable en los diferentes tumores y estableciendo conexiones entre diferentes genes con diferentes tumores.

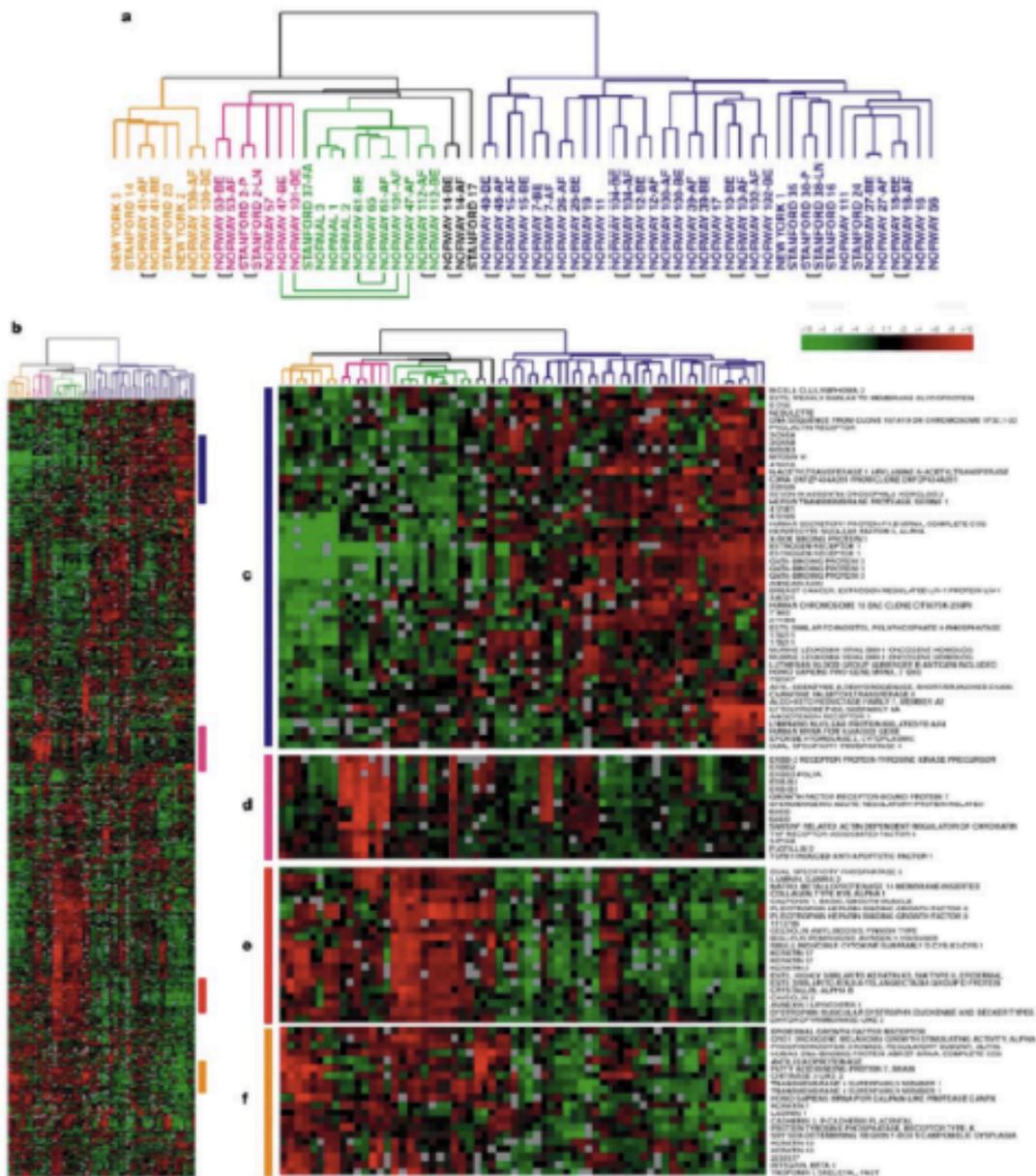
Así, variaciones en la expresión de diferentes genes se correlacionaban con características histopatológicas de la célula tumoral: la expresión de genes del receptor estrogénico se relacionaba con la expresión proteica del mismo, el gen de expresión de HER2 con su proteína y otros genes relacionados con la proliferación o activación de diferentes vías celulares.

Se analizaron no sólo genes relacionados con la célula tumoral si no con otras células que podían aportar información, como las células endoteliales, adipocitos, células estromales, linfocitos B y T y macrófagos.

De esos 1753 genes se seleccionaron 496 que etiquetaron como “intrínsecos” con gran variación de expresión en los diferentes tumores y que utilizaron para ordenar las muestras tumorales.

Se identificaron 4 grandes grupos: los tumores receptor estrogénico positivo que expresaban genes característicos de las células luminales.

Tumores que expresaban genes característicos de las células basales, otros que sobrepresaban HER 2 y, por último, un grupo de muestras que expresaban genes denominados “normal breast” asociados a expresión de genes de células basales y adipocitos y poca expresión de genes luminales (figura 9).



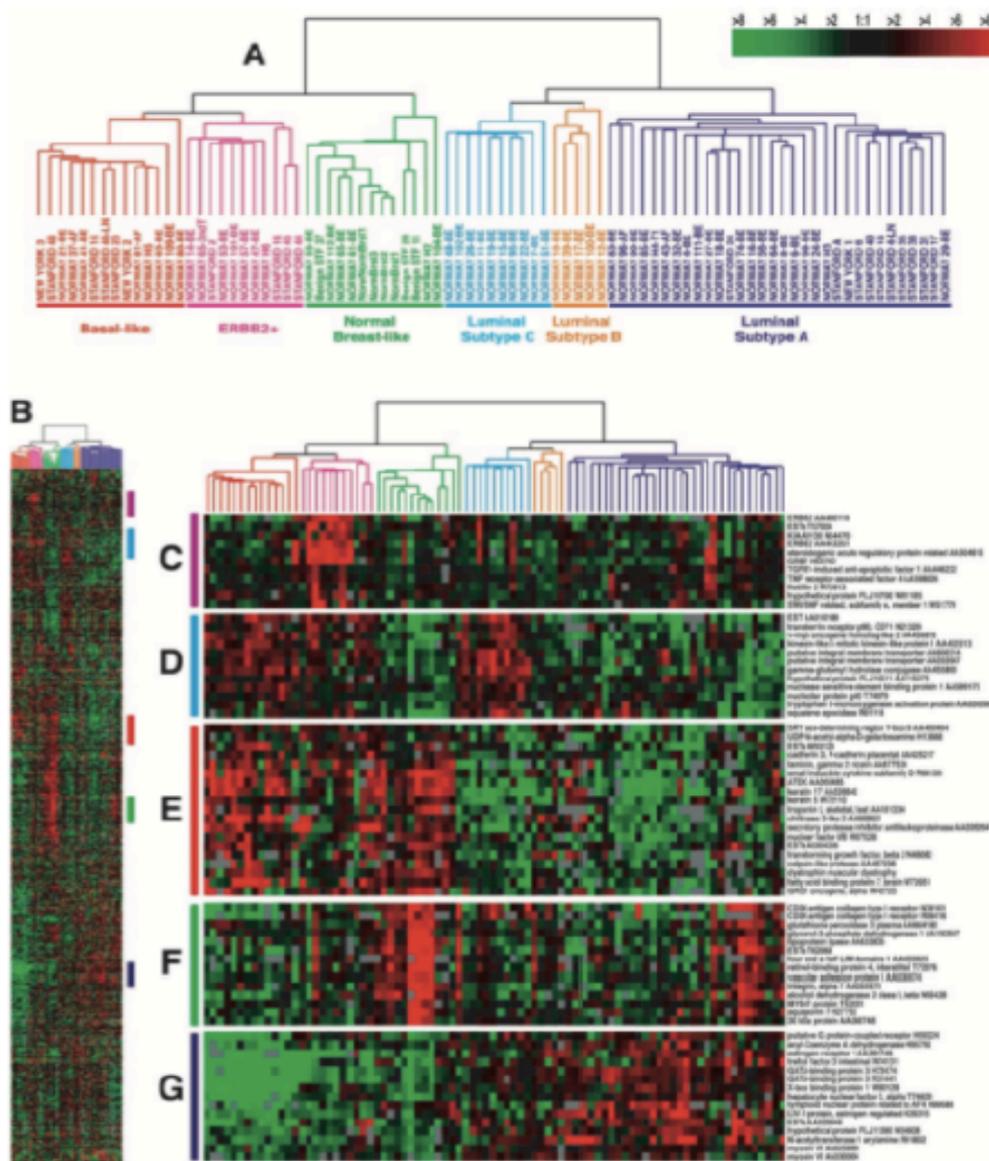
**Figura 9** Retrato molecular de tumores de mama  
*Perou, CM, Nature 2000*

A partir de este momento se establece por primera vez un retrato molecular del cáncer de mama con 4 grupos intrínsecos: luminal, basal, HER2 y normal-like que, determinarán diferente pronóstico y beneficio de terapias dirigidas.

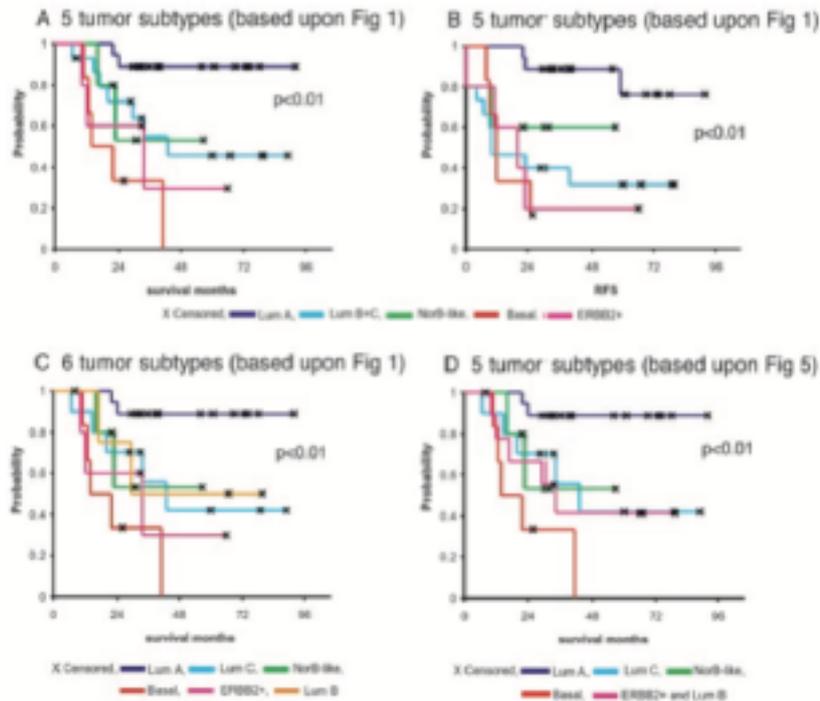
Un año después de esta publicación, el mismo grupo ahonda más en el conocimiento de estos subtipos moleculares y subdivide el grupo luminal en tres

entidades diferentes: Luminal A, el que más expresa genes relacionados con el receptor de estrógeno, Luminal B y Luminal C que expresan de forma moderada a baja genes luminales. Además, el Luminal C expresa genes de los que no saben su función, y que comparten con el subtipo basal y HER2.

Así determinan 5 subtipos moleculares que tienen diferente pronóstico en cuanto a supervivencia global y supervivencia libre de recaída (figuras 10 y 11).<sup>99</sup>



**Figura 10: Expresión génica de los tumores de mama que distingue diferentes subtipos**  
**Sorlie, T, Proc Natl Acad Sci USA 2001**



**Figura 11: Supervivencia global y libre de recaída por subtipo**  
**Sorlie, T, Proc Natl Acad Sci USA 2001**

A lo largo del tiempo se han ido validando estos subtipos intrínsecos con otras plataformas genómicas permitiendo clasificar a los tumores, también desde el punto de vista clínico, en diferentes grupos pronósticos.<sup>100</sup>

La plataforma PAM50 (Prediction Analysis of Microarray) que, permite analizar 50 genes en los tumores y clasificarlos en los diferentes subtipos intrínsecos, nos aporta además información pronóstica y predictiva de respuesta a tratamiento neoadyuvante o a tamoxifeno.<sup>101,102</sup>

Tras estas primeras publicaciones se ha ido avanzando en el conocimiento genómico y han aparecido subclasificaciones en los diferentes grupos. Así, dentro del

grupo receptor hormonal negativo y fundamentalmente en el triple negativo se han descrito hasta 6 subgrupos diferentes, con diferente pronóstico y beneficio a terapias específicas (figura 12).<sup>103,104</sup>



**Figura 12:** Patrones de expresión genética dentro del grupo Triple Negativo. *Lehmann, BD, The Journal of Clinical Investigation 2011*

El grupo BL 1 y 2 (Basal-like), relacionados con genes del ciclo celular y de daño de DNA y que, pueden responder a platinos o a inhibidores de PARP.

Los grupos MSL (Mesenchymal Stem-like) y ML (Mesenchymal-like) relacionados con genes de la unión epitelio-mesénquima, vías de receptores de crecimiento epidérmico y de diferenciación y motilidad celular y que, podrían responder a inhibidores de PI3K-mTOR y a Dasatinib ( inhibidor de SRC). Estos grupos comparten características con el cáncer metaplásico, un tipo de tumor que expresa células de tipo mesenquimal, sarcomatoide o escamosas y que, generalmente son resistentes a quimioterapia.

El grupo IM (Immunomodulatory) relacionado con genes implicados en el proceso inmune a diferentes niveles y que, comparte características con el carcinoma medular, un subtipo de tumor triple negativo de alto grado pero de buen pronóstico.

Y por último, el grupo LAR (Luminal Androgen Receptor), que es el más diferente dentro del triple negativo y que, está relacionado con la regulación hormonal: con genes del receptor de andrógeno, de la síntesis de esteroides e incluso con el metabolismo estrogénico y que podría responder a inhibidores del receptor androgénico, como la bicalutamida, y también a inhibidores de PI3K.

Dentro del avance en el conocimiento de los diferentes grupos intrínsecos, Prat y colaboradores<sup>105</sup> determinaron un nuevo subtipo denominado Claudin-Low. Se caracteriza por la ausencia de marcadores luminales, el aumento de marcadores de la transición epitelio-mesénquima, la presencia de genes de respuesta inmune y poseer características de células madre.

La mayoría de los tumores de este subtipo son carcinomas ductales invasivos con características de diferenciación metaplásica o medular. Tienen mal pronóstico y no suelen expresar receptor de estrógeno, de progesterona o HER2.

La respuesta a los tratamientos de quimioterapia suele ser intermedia entre la que se obtiene en los basal-like y los tumores luminales.

Este subtipo es el que más recuerda a las células madre y aporta la idea de que los diferentes subtipos intrínsecos se desarrollan en un momento diferente de la diferenciación de la célula mamaria, siendo el Claudin-Low el subgrupo menos diferenciado.

En paralelo a la identificación de los subtipos intrínsecos, diferentes grupos han utilizado la expresión génica de los tumores para desarrollar diferentes plataformas pronósticas y predictivas de tratamiento.

Las primeras firmas genéticas se realizaron en pacientes con tumores receptor hormonal positivo, tratadas con hormonoterapia adyuvante, que había recibido o no quimioterapia y que recurrieron. Se analizaron genes relacionados con la proliferación y con el receptor hormonal como los dos mecanismos moleculares más potentes implicados en la recurrencia.

En tumores con receptores hormonales negativos asociados a altas tasas de proliferación no existen por el momento plataformas de expresión génica pronósticas ni predictivas de tratamiento, aunque se están desarrollando plataformas de alta tecnología que incluyen estudio de miRNA, DNA circulante y secuenciación de RNA que permitirá disponer de ellas en un futuro cercano.

Dados los diferentes factores patológicos pronósticos en cáncer de mama se han desarrollado varias plataformas genómicas que analizan diferentes genes.

Las de primera generación: Oncotype<sup>106</sup>, Mammaprint<sup>107</sup> (ya comercializadas y con aplicabilidad clínica) y Genomic grade index<sup>108</sup> desarrolladas en pacientes postmenopáusicas con ganglios negativos y que, predicen mejor las recurrencias en los 5 primeros años que en los sucesivos. Otras de segunda generación: Endopredict<sup>109</sup>,

Prosigna-PAM50<sup>110</sup>, y the Breast Cancer Index<sup>111</sup> en pre y postmenopáusicas, con o sin afectación ganglionar, que tienen mejor valor pronóstico para las recurrencias tardías pero también predicen de forma óptima las recaídas tempranas.

Recientemente se han desarrollado nuevas plataformas como OncoMasTR<sup>112</sup>, Curebest 95 GC Breast assay y la 95-gene assay<sup>113</sup>. En esta última lo interesante es que analiza genes y vías de señalización implicados en terapias dirigidas, lo que indica que podría predecir respuesta a terapias específicas.

Aunque las guías internacionales recomiendan el uso de estas plataformas genómicas<sup>86,114</sup>, la información obtenida de ellas debe ser interpretada en el contexto de los parámetros clínicos y patológicos de la paciente para tomar la mejor decisión de tratamiento y utilizar una única plataforma, ya que la estratificación de riesgos entre las mismas puede ser diferente.<sup>115</sup>

## **1.4 Diagnóstico y Estadificación**

### **1.4.1 Mamografía**

La mamografía tiene un papel bien establecido en cáncer de mama, tanto en el cribado como en el diagnóstico y también en la valoración de respuesta a tratamiento.

En el cribado, a pesar de haber disminuido la mortalidad en la mayoría de estudios y diagnosticar los tumores en fases iniciales, en los últimos años se ha puesto en entredicho debido al sobrediagnóstico.<sup>116</sup>

Las características de un tumor en la mamografía son las de una lesión densa, espiculada, que distorsiona el resto de tejido mamario y con posibilidad de calcificaciones asociadas, pero no aporta información acerca del comportamiento biológico del tumor.

Nuevas técnicas como la tomosíntesis, la mamografía con contraste o la mamografía espectral, todavía en fase de estudio, aportarán más información al respecto.

La tomosíntesis utiliza un tubo de rayos X rotatorio dentro de un arco, permitiendo obtener imágenes en tres dimensiones de la mama. Esto supone una mayor sensibilidad en la detección de lesiones respecto a la mamografía, fundamentalmente en mamas densas, mejor caracterización de las mismas y una disminución en las rellamadas en el cribado. Sin embargo, por el momento, es una técnica complementaria a la mamografía. Se necesitan resultados de estudios en marcha para poder definir su papel en el cribado además del coste económico adicional que supone.<sup>117</sup>

La mamografía con contraste iodado parece que puede aumentar la precisión de la mamografía sola o de la mamografía y ecografía juntas pero tiene el inconveniente del contraste y sus posibles reacciones, y el aumento en el tiempo, coste y exposición a radiación del estudio frente a la mamografía convencional.<sup>118</sup>

La mamografía espectral aporta imágenes tomadas con alta y baja energía lo que permite distinguir tejidos dentro de la mama. Así, distingue entre lesiones sólidas o quísticas y puede ser útil en la mama densa sin aumentar la cantidad de radiación que reciben las pacientes.<sup>119</sup>

#### **1.4.2 Ecografía**

La ecografía es una técnica de amplio uso tanto en el diagnóstico del tumor primario como en la estadificación axilar. Se utiliza además para guiar las biopsias diagnósticas. No tiene indicación en el cribado.

La ecografía aumenta la sensibilidad diagnóstica unida a la mamografía pero también la tasa de falsos positivos.<sup>120</sup>

En cuanto a su capacidad para valorar respuesta a la terapia sistémica primaria frente a la mamografía y exploración física, existen datos contradictorios. Hay estudios en que se demuestra no ser superior a estas técnicas pero si predecir mejor la respuesta a nivel axilar y, otros en los que sí demuestra superioridad.<sup>121-123</sup>

Nuevas técnicas, algunas de ellas todavía experimentales como la Ecografía *doppler* en tres dimensiones, que permite clasificar las lesiones en función de sus características angiogénicas, la ecografía microbubble (que utiliza contraste mediante microburbujas), la automática o la sonoelastografía aportarán más información tanto en el diagnóstico, como en el comportamiento biológico y respuesta de las lesiones malignas de la mama.

### **1.4.3 Resonancia nuclear magnética (RNM)**

El uso de la RNM mamaria con contraste para el diagnóstico debe realizarse en centros con experiencia y con las siguientes indicaciones<sup>124</sup>:

1).-Es más sensible que otros métodos en la detección de tumores multifocales o multicéntricos fundamentalmente en el carcinoma lobulillar. Podría tener más precisión que otros métodos en la valoración del tamaño del carcinoma ductal in situ y de la enfermedad extensa intraductal, pero lleva asociado el sobrediagnóstico y también la posibilidad de no detectar la lesión.

2).-Pacientes menores de 60 años en las que haya una discrepancia de tamaño mayor de 1 cm entre la mamografía y la ecografía mamaria, y que esto suponga un cambio en el tratamiento.

3).-Pacientes en las que esté indicada una irradiación parcial de la mama.

4).-Pacientes con una historia familiar de alto riesgo (superior al 20-30% de padecer un cáncer de mama a lo largo de su vida) deben ser sometidas a RNM anual de

cribado a partir de los 30 años. Pacientes con mutación en línea germinal de BRCA1 ó 2 y mutación de P53 podrían comenzar el cribado antes y, deben realizar también RNM en el momento del diagnóstico para detectar posibles lesiones multicéntricas o contralaterales.

En este grupo de riesgo se incluirían aquellas pacientes que recibieron irradiación mantle mediastínica antes de los 30 años, dónde se incluían el mediastino, el cuello, los huecos supraclaviculares y las axilas dentro del campo de radioterapia (ej: linfoma de Hodgkin). Habría que comenzar el cribado 8 años después de haber recibido el tratamiento.

5).- Pacientes que se vayan a someter a tratamiento Neoadyuvante para valorar respuesta. Existen varios estudios, incluido un meta-análisis, en los que se demuestra que la RNM es superior a la mamografía y ecografía mamaria en la capacidad de valorar esa respuesta a tratamiento y su correlación con la respuesta patológica completa (RCp).<sup>125,126</sup>

6).- Pacientes con mamas densas en las que sea difícil la valoración por mamografía y ecografía.<sup>127</sup>

7).- Otras indicaciones: en pacientes portadoras de prótesis mamarias en las que haya sospecha de rotura de la misma y estén sintomáticas, puede usarse la RNM para confirmarlo. No se contempla como cribado de rotura en pacientes asintomáticas.

Y por último, en pacientes con el diagnóstico de carcinoma oculto o enfermedad de Paget, cuando no haya lesión identificable en la mama.

El uso de la RNM en otras indicaciones como la secreción anómala por el pezón, el cáncer de mama inflamatorio, para diferenciarlo de la mastitis, o el cáncer de mama en el varón no dispone de evidencia suficiente, por lo que no se recomienda su uso.

#### **1.4.4 Estadificación**

Una vez que tenemos una lesión sospechosa precisamos un diagnóstico histopatológico mediante biopsia.

El tamaño del tumor (T), la afectación o no de los ganglios axilares (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M) permite estadificar los tumores de cara a conocer su comportamiento, definir el pronóstico y plantear el tratamiento más adecuado. El primer sistema de estadificación publicado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) basado en el concepto TNM apareció en 1977. Se definieron 4 estadios; I-III en los que la enfermedad se encuentra a nivel loco-regional y IV cuando existe enfermedad a distancia del tumor primario.

Desde entonces se ha actualizado en 7 ocasiones, la última llevada a cabo recientemente.<sup>128</sup>

En esta última clasificación se han añadido 4 biomarcadores (grado, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2), que modifican la clasificación anatómica y establecen diferentes grupos pronósticos. Esta clasificación puede ser clínica o patológica, siendo más importante ésta última ya que disponemos de todos los datos después de la cirugía.

La AJCC está elaborando una calculadora para el estadiaje que permita obtener de forma sencilla el estadio de cada paciente con toda la información pronóstica.

El incluir los biomarcadores ha hecho que, con respecto al estadiaje exclusivamente anatómico (TNM), hasta un 40% de las pacientes cambien al menos en un grupo del estadio.

Sumado a esto, un tercer nivel de información que plantea la clasificación es añadir los datos que nos aportan las plataformas genómicas, hoy en día, fundamentalmente Oncotype.

Dada la validación de las misma en bases de datos que incluyen a miles de pacientes como el SEER o Clalit , en donde aquellos tumores genéticamente de bajo riesgo según Oncotype (Riesgo de Recurrencia (RR), bajo) no se benefician de la quimioterapia y las tasas de recurrencia son muy pequeñas, los expertos llegan a la conclusión de que esos tumores receptor hormonal positivo, T1-T2, HER2 negativo, ganglios negativos, deben ser estadificados como IA independientemente del tamaño del tumor.<sup>129</sup>

Al diagnóstico, aparte de la anamnesis por aparatos y la exploración física, deben realizarse estudios de laboratorio que incluyan hemograma y bioquímica con pruebas de función hepática, renal, fosfatasa alcalina y calcio.

Si existe alguna alteración en estos valores, síntomas o la enfermedad se diagnostica en un estadio avanzado (estadio III), hay que solicitar pruebas de imagen tipo TAC Torácico, abdominal y pélvico y Gammagrafía ósea para descartar enfermedad a distancia.<sup>130</sup> El PET (tomografía por emisión de positrones) puede tener una indicación en el estadiaje del cáncer de mama localmente avanzado con un nivel de evidencia II.<sup>131</sup>

Es imperativa la valoración de la función cardiaca cuando se vayan a administrar antraciclinas y terapia antiHER2.<sup>132</sup>

## **1.5 Tratamiento**

### **1.5.1 Cirugía**

En estadios I y II la tumorectomía es equivalente a la mastectomía en cuanto a supervivencia global y específica a largo plazo y, debe ser el tratamiento de primera elección, excepto en los tumores en los que vayamos a hacer neoadyuvancia.<sup>133,134</sup>

El tumor debe ser resecado con suficiente tejido sano alrededor, de forma que incluidos los márgenes en tinta china, éstos no se vean afectados por componente infiltrante o in situ y, garantizar así los bordes libres.

En los últimos años hemos evolucionado en las técnicas de cirugía conservadora y así surge la cirugía oncoplástica que, relaciona los principios de la cirugía oncológica con las técnicas de cirugía plástica y, permite reseca grandes cantidades de tejido mamario que garantice los márgenes libres y obtiene un buen resultado estético.

En aquellas pacientes en las que el tumor tenga una presencia difusa en la mama o la tumorectomía suponga estéticamente una mama no viable, la cirugía conservadora no estaría indicada.

Otras contraindicaciones relativas de la tumorectomía son: el haber recibido radioterapia previa en la mama, la presencia de enfermedades del tejido conectivo con afectación cutánea y en los tumores grandes, de más de 5 cm, en los que el tratamiento sistémico primario no es efectivo o está contraindicado.

Dado que la radioterapia está contraindicada durante el embarazo, no puede realizarse tumorectomía en pacientes embarazadas diagnosticadas de cáncer de mama a las que haya que realizar el tratamiento local previo al parto.

Cuando se lleva a cabo la mastectomía, realizar una mastectomía contralateral profiláctica no está indicado en la mayoría de los casos. En pacientes jóvenes, receptor hormonal negativo, en las que es más probable que puedan tener mutación de BRCA en línea germinal, podría tener indicación el estudio de BRCA antes de planificar la cirugía. En caso de existir mutación, previo asesoramiento y valorando riesgos-beneficios, puede plantearse la mastectomía profiláctica.<sup>135</sup>

La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) es la técnica recomendada para la valoración ganglionar regional. Debe realizarse en axilas clínicamente negativas habiendo desbancado en este contexto a la linfadenectomía.<sup>136,137</sup>

Para la técnica de detección del ganglio o ganglios centinelas se utiliza el trazador radioactivo, la tinción azul o ambas puncionando la mama a nivel subareolar o peritumoral.

La forma de estudio intraoperatorio de ese ganglio centinela puede ser realizando una sección del ganglio por congelación, haciendo una impronta citológica (ambas formas con una limitada sensibilidad comparada con el estudio diferido y precisando un patólogo experto) o, desde el año 2007, estudiando molecularmente el ganglio por el método OSNA (One-Step Nucleic acid Amplification) que amplifica y cuantifica el número de copias de mRNA de la citoqueratina19. Los diferentes puntos de corte fueron definidos de cara a discriminar el ganglio negativo, la micrometástasis y la macrometástasis. Así, con menos de 250 copias/ $\mu$ l, se considera el ganglio negativo, entre 250 y 5000 copias/ $\mu$ l, micrometástasis y, más de 5000 copias/ $\mu$ l, macrometástasis.<sup>138</sup>

Hoy en día se han realizado más de 100.000 estudios de ganglio centinela con el método OSNA en casi 200 hospitales europeos en la práctica clínica rutinaria y, se ha utilizado la técnica en más de 80 ensayos clínicos publicados, demostrando su capacidad de estudiar de forma satisfactoria la afectación ganglionar. Sin embargo, se está estudiando el punto de corte óptimo que defina mejor la afectación o no del ganglio y poder evitar así linfadenectomías innecesarias.<sup>139</sup>

En pacientes con axila clínicamente positiva hay que confirmar la afectación ganglionar mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF) o biopsia.

La disección ganglionar o linfadenectomía axilar (LA) está indicada cuando la BSGC es positiva o hay confirmación patológica prequirúrgica. Sin embargo, en pacientes con estadios I-II, menos de 3 ganglios centinelas positivos, a los que se le haga tumorectomía y vayan a recibir radioterapia adyuvante, la LA puede ser evitada sin que esto repercuta en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) o supervivencia global (SG), cuando se lleve a cabo un tratamiento sistémico postoperatorio adecuado.<sup>140</sup>

En esta misma población, tumores T1-T2 y ganglios clínicamente negativos, el estudio AMAROS concluyó que se podía sustituir la LA por la irradiación axilar en aquellas pacientes que tenían la BSGC positiva sin aumento en las recaídas axilares y disminuyendo la morbilidad.<sup>141</sup>

La presencia de células tumorales aisladas (<0.2mm) o micrometástasis (0.2mm-2mm) en el ganglio centinela a pesar de ser un factor de mal pronóstico independiente, pudiendo aumentar las tasas de recaídas locales y disminuir la supervivencia en estudios retrospectivos, no determina una diferencia significativa en supervivencia entre las que van a LA frente a las que no la hacen, habiendo recibido todas el tratamiento adyuvante adecuado (hormonoterapia, quimioterapia y radioterapia) según se demuestra en varios estudios prospectivos. La mayoría de pacientes de estos estudios presentaban tumores con receptores hormonales positivos. No sabemos el valor pronóstico que tendrían estas micrometástasis o células tumorales aisladas en otros subtipos biológicos.<sup>142</sup>

En cuanto a las pacientes que reciben tratamiento sistémico primario o neoadyuvante, la LA está indicada en aquellas en las que hay confirmación patológica axilar previa al inicio del tratamiento. En pacientes con clínica positiva antes del tratamiento y BSGC negativa tras el mismo, la tasa de falsos negativos es mayor del 10% y debería recomendarse la LA como procedimiento estándar.<sup>143</sup> Sin embargo, algunos

estudios dicen que si el número de ganglios centinelas resecaados es al menos 3, todos ellos son negativos, y se utiliza la doble técnica de marcaje, la LA podría evitarse.<sup>144</sup> En este caso se debería realizar biopsia y marcaje del ganglio sospechoso al diagnóstico y resecarlo a la hora de la cirugía, sea o no sea el ganglio centinela. Si alguno de los ganglios centinela o el ganglio marcado siguen siendo positivos, debería realizarse LA.

En pacientes con ganglios clínicamente negativos sometidos a neoadyuvancia, la BSGC puede realizarse antes del tratamiento o después.<sup>143</sup>

### **1.5.2 Radioterapia**

La radioterapia tras la cirugía del tumor primario debe realizarse en los siguientes casos:

-Tras cirugía conservadora:

Debe irradiarse toda la mama y preferiblemente con esquemas hipofraccionados que se realizan en 3 semanas frente a las clásicas 5 semanas.<sup>145</sup>

Cuando hay afectación de 4 o más ganglios axilares está indicada la irradiación de las cadenas supra e infraclaviculares. Si la afectación ganglionar axilar es entre 1-3 ganglios, puede tener beneficio la irradiación de cadenas en casos seleccionados.<sup>146</sup>

En pacientes con tumores T1-2 y ganglios axilares negativos clínicamente (cN0) en los que se detecta afectación en la BSGC, la radioterapia axilar puede sustituir a la LA con menos morbilidad.<sup>141</sup>

-Tras Mastectomía:

La irradiación de pared y cadenas ganglionares regionales incluyendo a nivel supraclavicular y la mamaria interna está indicada en los tumores T4, T3 y ganglios positivos y cuando hay 4 o más ganglios afectos. En caso de márgenes próximos o afectos, irradiar la pared también está indicado.

En pacientes con tumores T1-T2 y de 1-3 ganglios afectos o tumores T3N0 el riesgo de recaída tras la mastectomía aumenta, por lo que se debe individualizar la necesidad de radioterapia teniendo en cuenta otros factores pronósticos como el grado, la invasión linfo-vascular, la expresión de receptores hormonales, la edad o la ausencia de tratamiento sistémico.<sup>146,147</sup>

-Tras neoadyuvancia:

Cuando se realiza cirugía conservadora tras la neoadyuvancia, la irradiación de la mama está indicada.

Cuando se realiza mastectomía tras la neoadyuvancia: en los Estadios III al diagnóstico, independientemente de la respuesta que hagan al tratamiento sistémico primario, o en los ganglios positivos tras el mismo, hay que realizar radioterapia adyuvante. En los estadios II que hacen una respuesta completa tras el tratamiento, excluyendo los cT3N0, puede obviarse la radioterapia a no ser que haya otros factores de riesgo.<sup>148</sup>

### **1.5.3 Tratamiento Adyuvante**

El tratamiento sistémico adyuvante se utiliza en cáncer de mama precoz con la idea de reducir recaídas tanto loco-regionales como a distancia.

Este tratamiento varía en función del estadio anatómico, el subtipo biológico y factores pronósticos, tanto clínicos como moleculares, que nos dan información acerca de las probabilidades de recaída que tiene cada paciente. Fig. 13.

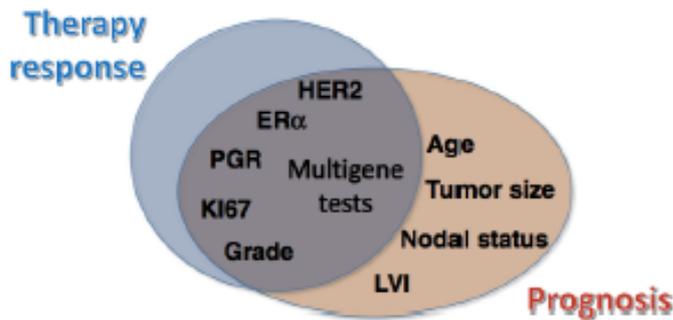


Figure 1 Prognostic and predictive relationship between multigene signatures and prognostic and predictive features in breast cancer. ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; LVI, lymphovascular invasion; PR, progesterone receptor.

**Figura 13: Relación pronóstica y predictiva entre las firmas genómicas y características clínicas en cáncer de mama**

a).- Adyuvancia en cáncer de mama luminal

La quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos ha reducido el riesgo de recaída y muerte en las pacientes con cáncer de mama precoz independientemente de la edad, afectación o no ganglionar, el grado, la expresión o no de receptores hormonales y recibir terapia endocrina. Así, durante años, hemos administrado quimioterapia adyuvante a estos tumores cuando medían más de 1 cm según los datos del meta-análisis del Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG) y el consenso del National Institute of Health americano<sup>149,150,151</sup>

Sin embargo, sabemos que el beneficio de la misma en tumores con receptores hormonales positivos y ganglios negativos es bajo.

Con el desarrollo de las diferentes plataformas genómicas hemos profundizado más en el conocimiento de estos tumores y en la capacidad de predecir su evolución así como el beneficio del tratamiento de quimioterapia en este subtipo.

Como se mencionó previamente, las plataformas más desarrolladas: Oncotype, MammaPrint, PAM50 y EndoPredict tienen diferentes ventajas en cuanto a su valor pronóstico. Sin embargo, es Oncotype la que evidencia un mayor valor predictivo en

cuanto al beneficio de la quimioterapia y se ha demostrado en un gran estudio prospectivo, el TAILORx.<sup>152</sup>

En este estudio que incluye más de 10.000 pacientes con cáncer de mama, receptor hormonal positivo y ganglios negativos que cumplían criterios para recibir quimioterapia adyuvante, según características clínico-patológicas, a las que se les realizó el test genético que consta del análisis de 21 genes. Hay que señalar que, el 74% de la población del TAILORx era de bajo riesgo clínico (el 63% eran tumores de 1-2 cm).<sup>152</sup>

Este análisis calcula la posibilidad de recurrencia (RR), dividiendo a las pacientes en tres grupos. En el grupo de bajo riesgo, con un RR entre 0-10 a las que sólo se les administraba hormonoterapia las tasas de recurrencia a 5 años fueron muy bajas (<2%). Estos resultados nos confirman la ausencia de beneficio de quimioterapia en estas pacientes.<sup>152</sup>

En el grupo de alto riesgo, con un RR entre 26-100, la quimioterapia asociada a la hormonoterapia aportaba un beneficio significativo.

En el grupo de riesgo intermedio, RR entre 11-25 que se aleatorizaban a recibir hormonoterapia o quimioterapia, se vio que la terapia endocrina no era inferior a la quimioterapia. Sin embargo, un estudio exploratorio evidenció que la quimioterapia podía aportar un beneficio en pacientes menores de 50 años, fundamentalmente en aquellas con un RR entre 16-25.<sup>153</sup>

En el estudio prospectivo MINDACT que utiliza la plataforma MammaPrint de 70 genes y que, incluye también tumores con ganglios positivos (1-3) y receptor hormonal negativo, pretendía evaluar como objetivo primario la supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED) a 5 años. Se incluyeron 748 pacientes con un riesgo clínico alto (medido según los criterios del Adjuvant Online modificado) pero con una

expresión génica de bajo riesgo y que no recibían quimioterapia. El estudio alcanzó su objetivo primario y este grupo de pacientes tenía un 94.7% de SLED (92.5-96.2). En ellas, el beneficio de la quimioterapia fue del 1.5%; sin embargo, se necesita un mayor seguimiento para confirmar los resultados y poder evitar la quimioterapia en este grupo de pacientes. Como un análisis secundario del MINDACT y sin suficiente poder estadístico, el Mammaprint no demuestra la capacidad de predecir el beneficio de la quimioterapia en supervivencia. Existe un nivel de evidencia IA para predecir el riesgo de recaída a distancia a los 5 años si se trata sólo con hormonoterapia.<sup>107</sup>

La validación prospectiva de PAM50 en su capacidad de predecir el beneficio en supervivencia de la quimioterapia en pacientes  $\geq 40$  años con tumores receptor hormonal positivo, HER2 negativo,  $\geq 3$  cm o ganglios positivos con un riesgo de recurrencia (ROR) a distancia  $< 60$  (intermedio/bajo riesgo) está en estudio en el ensayo fase III OPTIMA.<sup>154</sup>

En una comparación frente a frente con Oncotype y Endopredict en 774 muestras del estudio TransATAC, el PAM50 aporta mayor información pronóstica a largo plazo que Oncotype y similar a Endopredict.<sup>155,156</sup>

Así mismo, recientemente PAM50 ha demostrado tener valor pronóstico y predictivo de beneficio de quimioterapia en mujeres premenopáusicas de alto riesgo.<sup>157</sup>

El valor de las plataformas genómicas en confirmar el beneficio o no de quimioterapia en las pacientes con receptores positivos y afectación ganglionar está pendiente de resultados de estudios prospectivos.<sup>154,158</sup>

Por lo tanto, en la actualidad, ofrecemos quimioterapia adyuvante en tumores luminales a aquellas pacientes de alto riesgo definido por parámetros clínicos y genómicos: tumores T2-T4, N2-3, extensa invasión linfo-vascular, alto índice de

proliferación, baja expresión de receptor de estrógeno, edad joven, situación premenopáusica o riesgo de recurrencia genómico intermedio o alto.<sup>159</sup>

El tratamiento hormonal adyuvante aumenta la supervivencia en tumores luminales y debe ser ofrecido a todas las pacientes independientemente de la edad, estado menstrual, exposición o no a quimioterapia previa, nivel de expresión de receptores hormonales o HER2.

Existen diferentes opciones en función del estado menstrual, las comorbilidades o el riesgo de recurrencia.

El tamoxifeno es la terapia más establecida tanto para pre como postmenopáusicas, ya que reduce el riesgo de recurrencias en un 40% en todos los subgrupos.<sup>151</sup> La duración del tratamiento son 5 años aunque en dos grandes estudios, ATLAS y aTTom, se ve un beneficio en continuar hasta 10 años en las pacientes de alto riesgo, a costa de una mayor toxicidad.<sup>160,161</sup>

En pacientes premenopáusicas, aunque el tratamiento estándar sigue siendo el tamoxifeno, se puede considerar la combinación de exemestano y supresión ovárica en pacientes de alto riesgo que recibieron quimioterapia. Esta combinación demuestra superioridad en cuanto a la disminución de recaídas a distancia frente a tamoxifeno con supresión ovárica y a tamoxifeno sólo en estas pacientes, tras 5.7 años de seguimiento de los estudios SOFT y TEXT.<sup>162,163</sup>

Tras 8 años de seguimiento se vio que la combinación de tamoxifeno y goserelina aportaba un beneficio en SLE y SG frente a tamoxifeno sólo, por lo que podría considerarse esta combinación en pacientes de alto riesgo que no son candidatas a inhibidor de aromatasa.<sup>164</sup>

En pacientes postmenopáusicas los inhibidores de aromatasa pueden administrarse desde el principio y completar 5 años, tras 2-3 años de tamoxifeno y

completar 5 años, tras 5 años de terapia endocrina continuando 2.5–5 años de inhibidor tras valoración de riesgo/beneficio.

Recientemente se ha demostrado en el estudio IDEAL que no hay diferencias entre 2.5 y 5 años como terapia de continuación en este último supuesto.<sup>165</sup>

La opción de 10 años de tamoxifeno en pacientes con contraindicación a inhibidores de aromatasa también puede considerarse.

Estas pacientes postmenopáusicas candidatas a terapia sistémica adyuvante, en función de la probabilidad de recaída y valorando riesgo beneficio, deben considerarse para recibir ácido zoledrónico 4 mg intravenoso cada 6 meses o clodronato 1600 mg oral. Ambos han demostrado prevenir la pérdida de densidad ósea, las fracturas, disminuir las recaídas en el hueso y aumentar la supervivencia relacionada con el cáncer de mama.<sup>166</sup>

Con los inhibidores de RANK ( Receptor Activator for Nuclear Factor K) como denosumab, se ha demostrado una disminución del riesgo de fractura en estas pacientes aunque todavía no existen datos de beneficio en supervivencia. Por tanto, por el momento no se puede hacer una recomendación de su uso en adyuvancia excepto para el tratamiento de la osteoporosis.<sup>167</sup>

#### b).- Adyuvancia en cáncer de mama HER2

La adición de trastuzumab, anticuerpo monoclonal contra la proteína de membrana HER 2 sobre-expresada en estos tumores, a quimioterapia ha mejorado drásticamente el pronóstico de este subtipo en cáncer de mama precoz.

Esta combinación de quimioterapia y trastuzumab tiene indicación en ganglios positivos, negativos y en tumores mayores de 1 cm, independientemente del estado del

receptor hormonal o la edad. En tumores de menor tamaño no existe evidencia alta pero entre 0.5-1 cm podría considerarse.<sup>168</sup>

Aunque el añadir trastuzumab de forma secuencial tras finalizar la quimioterapia ha demostrado beneficio, el hacerlo de forma concomitante con el taxano alcanza mejores resultados. Así los regímenes de 4 ciclos de antraciclina (adriamicina o epirrubicina) seguidos de 3 meses de taxano (paclitaxel o docetaxel) con trastuzumab o bien, el esquema sin antraciclinas con la combinación de carboplatino, docetaxel y trastuzumab por seis ciclos, son los esquemas preferidos.<sup>169-173</sup> Dada la cardiotoxicidad conocida de las antraciclinas y del trastuzumab, el tratamiento más óptimo dependerá de los factores de riesgo cardiovascular o presencia de cardiopatía previa siendo obligatorio estudiar la función cardíaca previamente.

En tumores pequeños sin afectación ganglionar puede utilizarse un esquema de quimioterapia sin la antraciclina: 12 semanas de paclitaxel concomitante con trastuzumab que ha demostrado excelentes resultados.<sup>174</sup>

En cualquier supuesto, trastuzumab hay que administrarlo un total de 12 meses. Esquemas más cortos de trastuzumab (6 meses) podrían usarse en situaciones de cardiotoxicidad previa o un alto riesgo de padecerla.<sup>175</sup>

Trastuzumab puede utilizarse de forma concomitante con el tratamiento hormonal, en tumores receptor hormonal positivo, o durante la radioterapia si está indicada.

A pesar del beneficio del tratamiento con trastuzumab en combinación con quimioterapia en este subtipo, sabemos que un porcentaje de pacientes recaerá. Se han desarrollado diferentes fármacos antiHER2 que intentan revertir estas resistencias al tratamiento.

Así, el doble bloqueo de trastuzumab y pertuzumab, este último también anticuerpo de membrana que se une a la proteína HER2 en un epítipo diferente a trastuzumab y que, bloquea la heterodimerización entre HER2 y HER3, ha demostrado en combinación con quimioterapia (tras un seguimiento de 3 años en el estudio APHINITY) mejorar la SLE, fundamentalmente, en pacientes con afectación ganglionar y/o receptor hormonal negativo. Recientemente la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó esta combinación en este supuesto.<sup>176</sup>

Otra opción para mejorar los resultados es el uso de neratinib, inhibidor irreversible de tirosín quinasa anti HER1, HER2 y HER4 que administrado durante un año tras haber completado los 12 meses de trastuzumab adyuvante, mejora la SLE invasiva. El beneficio es mayor en tumores receptor hormonal positivo y en ganglios positivos. Entre sus toxicidades destaca la diarrea. El tiempo de seguimiento es todavía corto y no hay datos sobre el beneficio del fármaco en las pacientes que recibieron pertuzumab. La EMA ha aprobado recientemente el fármaco en tumores HER2 positivos con receptores hormonales positivos.<sup>177</sup>

#### c).- Adyuvancia en cáncer de mama triple negativo

El tratamiento adyuvante en este tipo de tumor biológicamente agresivo en la mayoría de sus subtipos, es quimioterapia. Se recomienda una combinación de antraciclinas y taxanos si no existe contraindicación para ellos.

Los tumores pequeños,  $\leq$  T1b y ganglios negativos tienen buen pronóstico sin quimioterapia.<sup>178</sup> Así, en tumores < de 0.5 cm podríamos obviarla y entre 0.6-1 cm valorar riesgo/beneficio antes de administrarla.

No existen datos del beneficio de los platinos en este contexto incluso en la población BRCA mutada. Este subtipo no se beneficia de terapias hormonales.

#### 1.5.4 Tratamiento sistémico neoadyuvante

La neoadyuvancia (NA) es el tratamiento estándar en el cáncer de mama localmente avanzado y en el inflamatorio.<sup>179-182</sup>

Sabemos que ofrece similares beneficios que el tratamiento adyuvante tanto en SLE como en SG<sup>183,184</sup>, por lo que a día de hoy se ha trasladado también al cáncer de mama precoz.

Actualmente la quimioterapia se utiliza con el fin de disminuir el estadio tumoral y facilitar la cirugía conservadora, eliminar la enfermedad micrometastásica, testar “*in vivo*” la sensibilidad del tumor al tratamiento, aportando información pronóstica y, permitiendo el estudio de nuevos fármacos y de biomarcadores que hacen más rápida la disponibilidad y aprobación de nuevas terapias.

La indicación y eficacia del tratamiento depende del tamaño y afectación ganglionar al diagnóstico, pero fundamentalmente de la biología tumoral.

##### a).- Neoadyuvancia en cáncer de mama luminal

La respuesta de los cánceres de mama luminales a la quimioterapia neoadyuvante no es especialmente buena, obteniéndose pocas tasas de respuestas patológicas completas (RCp). Se plantea esta opción en tumores grandes o con afectación ganglionar y, el tratamiento óptimo es una secuencia de antraciclinas y taxanos.<sup>185,186</sup>

Para decidir el tratamiento, además de los parámetros clínicos, utilizamos sobre todo parámetros patológicos como la intensidad de expresión de receptores hormonales, la sobreexpresión de HER2, el grado y el índice de proliferación o Ki-67.<sup>87</sup> Sin embargo, no existe un punto de corte óptimo del Ki-67 y no se conoce con exactitud el valor de este parámetro en la predicción de una mayor respuesta a la quimioterapia.

También se han utilizado diferentes plataformas genómicas, fundamentalmente PAM50, en el estudio de la muestra del tumor de la biopsia previa a la neoadyuvancia para decidir que tumores se van a beneficiar más de la quimioterapia en este contexto. Aunque todavía está en fase de investigación y no se aplica de forma estándar en la práctica clínica diaria.<sup>187</sup>

En casos seleccionados de mujeres postmenopáusicas con tumores que expresan receptores hormonales positivos, HER2 negativo y Ki-67 bajo (tumores luminales A) una opción es la neoadyuvancia endocrina (NE), durante al menos 16 semanas. Se ha observado que una mayor duración de esta terapia hormonal aumenta el porcentaje de respuestas.

Existen pocos datos de comparación directa entre la NA con quimioterapia y la NE en este contexto. Algún estudio fase II y un meta-análisis demuestran que las tasas de respuesta son similares, con un perfil de toxicidad más favorable del tratamiento hormonal.<sup>188</sup>

Los inhibidores de aromatasa son más efectivos que el tamoxifeno en NE.<sup>189</sup>

Para evaluar la eficacia del tratamiento endocrino en este contexto se han utilizado parámetros subrogados como el Ki-67 o el PEPI score (Índice Pronóstico Endocrino Preoperatorio).

El índice PEPI analiza diferentes parámetros relacionados con la muestra quirúrgica tras la NE como son: el tamaño del tumor, la afectación ganglionar, el Ki-67 y el grado de expresión de receptores hormonales. El estudio p024 comparaba 4 meses de NE con letrozol frente a tamoxifeno en 228 pacientes postmenopáusicas con tumores estadio II y III. Se relacionó la SLE y la supervivencia específica por cáncer de mama con los parámetros mencionados previamente y analizados tras la NE. Se les dio un peso a cada factor de riesgo en función del Hazard Ratio (HR).<sup>190</sup> Así por ejemplo, si el HR en

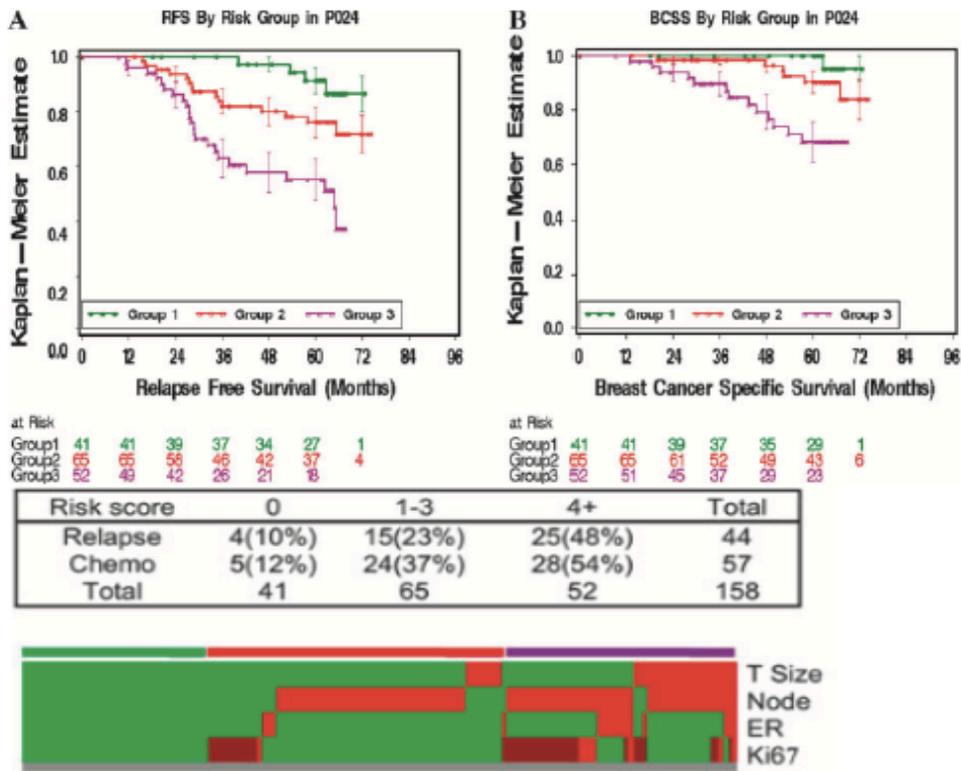
tumores pT0 tras NA tenía un valor entre 1-2 recibía un punto de riesgo, si el valor del HR estaba entre 2-2.5, recibía dos puntos de riesgo y, si el valor del HR era mayor de 2.5 recibía 3 puntos de riesgo. Lo mismo se realizaba con los tumores pT1-2 y el resto de parámetros clínico-patológicos. El valor total del índice PEPI para cada paciente es la suma de los puntos de riesgo asignados a cada factor.

Este índice fue validado posteriormente en el estudio IMPACT<sup>191</sup> en donde se comparaba tamoxifeno, anastrozol o la combinación de ambos en 203 mujeres tratadas durante 3 meses con NE. Así se establecen 3 grupos de riesgo: bajo riesgo (PEPI de 0); riesgo intermedio (PEPI de 1-3); y riesgo alto (PEPI>4).

Los PEPI de bajo riesgo tienen parámetros anatómicos y biológicos de buen pronóstico tras la cirugía y, por lo tanto, se prevé que tengan una buena evolución y no precisen tratamiento adyuvante con quimioterapia. Sin embargo, los PEPI de alto riesgo tienen un estadio patológico alto y un perfil biológico de mal pronóstico, por lo que tienen unas probabilidades altas de recaída y precisan tratamiento adyuvante con quimioterapia o la inclusión en algún ensayo clínico, además de recibir también terapia endocrina (figuras 14 y 15).

Pathology, biomarker status	RFS		BCSS	
	HR	Points	HR	Points
<b>Pathological tumor size</b>				
T1/2	—	0	—	0
T3/4	2.8	3	4.4	3
<b>Node status</b>				
Negative	—	0	—	0
Positive	3.2	3	3.9	3
<b>Ki67 level</b>				
0%–2.7% (0–1†)	—	0	—	0
>2.7%–7.3% (1–2†)	1.3	1	1.4	1
>7.3%–19.7% (2–3†)	1.7	1	2.0	2
>19.7%–53.1% (3–4†)	2.2	2	2.7	3
>53.1% (>4†)	2.9	3	3.8	3
<b>ER status, Allred score</b>				
0–2	2.8	3	7.0	3
3–8	—	0	—	0

**Figura 14:** Índice Pronóstico Endocrino Preoperatorio (PEPI)  
Ellis, MJ, *J Natl Cancer Inst* 2008



**Figura 15:** SLE y Supervivencia específica por cáncer de mama en los diferentes grupos según el índice pronóstico PEPI  
*Ellis, MJ, J Natl Cancer Inst 2008*

La NE en mujeres premenopáusicas está en debate. La opción de un inhibidor de aromatasa con supresión ovárica o tamoxifeno podría ser una alternativa cuando la quimioterapia no está indicada.

b).- Neoadyuvancia en cáncer de mama triple negativo

En este subtipo biológico la NA suele ser efectiva y nos proporciona una alta tasa de respuestas patológicas completas, lo que se relaciona con mejor pronóstico y con un posible beneficio a largo plazo.<sup>186</sup>

El tratamiento óptimo es una secuencia de antraciclina y taxanos en la mayoría de las pacientes. Dentro de los taxanos incluimos paclitaxel y docetaxel. En un estudio

fase III se comparó paclitaxel con nab-paclitaxel (nuevo taxano unido a albúmina con mejor perfil de toxicidad y de administración, sin necesidad de corticoterapia en la premedicación y evitando las reacciones de hipersensibilidad asociadas al disolvente de paclitaxel) observándose un aumento de las RCp en todos los subtipos y fundamentalmente en los tumores triples negativos.<sup>192</sup> Sin embargo, en otro estudio fase III en tumores HER2 negativos (ensayo clínico ETNA) que incluyó a 695 pacientes de las que el 32% tenían tumores triple negativos, nab-paclitaxel no pudo demostrar un aumento de las RCp de forma estadísticamente significativa frente a paclitaxel.<sup>193</sup>

El papel de la quimioterapia basada en platinos en neoadyuvancia triple negativa es controvertido y no existen guías que clarifiquen su uso. En un reciente meta-análisis y revisión sistemática que incluye 9 ensayos clínicos y 2109 pacientes con tumores triple negativos que recibieron platino, como parte de su tratamiento sistémico primario, se vio que la tasa de RCp aumentaba de 37% a 52,1%.

Por otro lado, en esta misma publicación, en 96 pacientes con mutación de BRCA, en los que clásicamente y en otros contextos como la enfermedad avanzada se ha descrito beneficio en la utilización de los platinos, la adición de carboplatino no se relaciona con aumento en la tasas de RCp.<sup>194</sup>

En solo dos estudios del meta-análisis (748 pacientes) se daban datos de supervivencia y se vio que la adición de platino no se relacionaba con aumento en la SLE o SG.

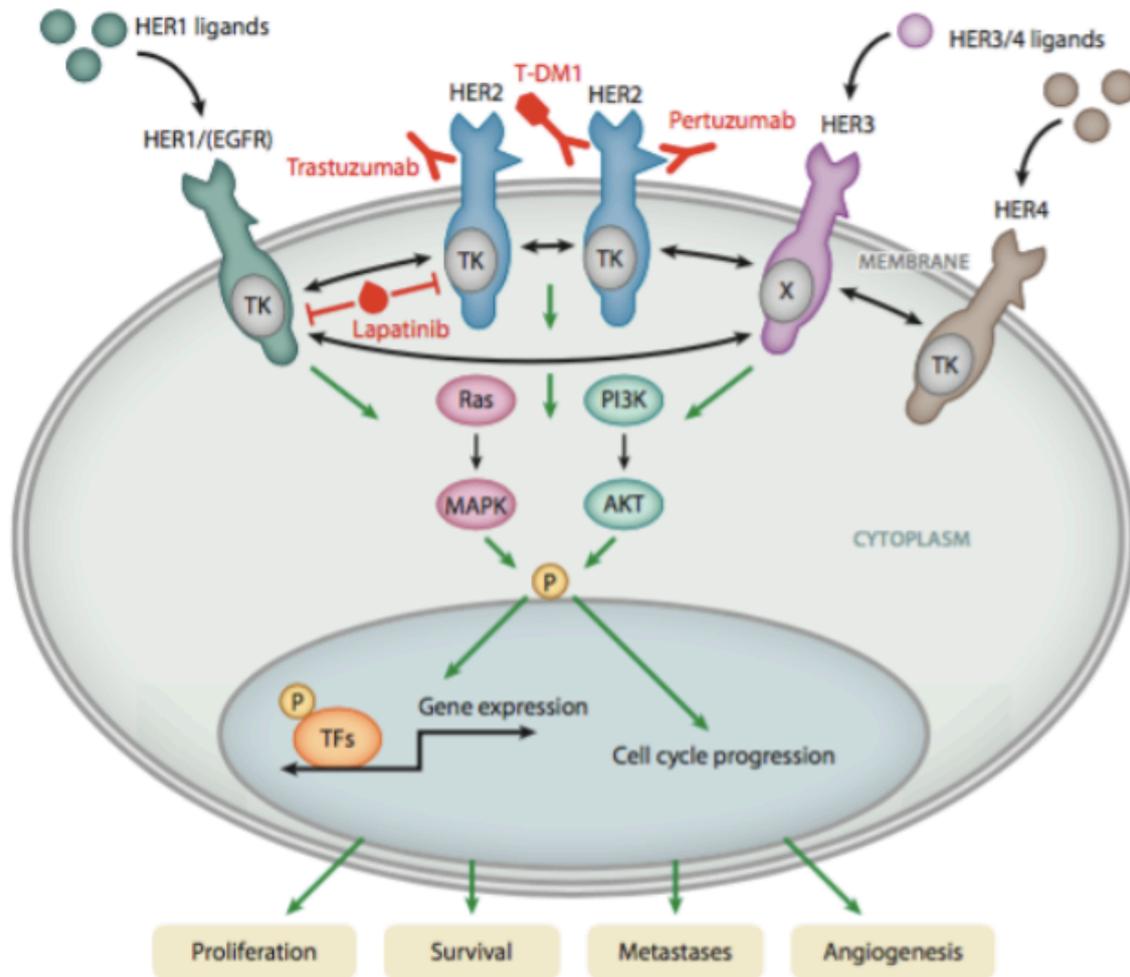
En una reciente revisión sistemática y un meta-análisis que incluía a 159 pacientes con mutación de BRCA en línea germinal, se vio que las tasas de RCp al añadir platino eran superiores que en la población no mutada, aunque sin significación estadística.<sup>195</sup>

Analizados estos datos conjuntamente parece que la adición de platinos a la NA puede ser una opción para pacientes seleccionadas, teniendo en cuenta el perfil de mayor toxicidad fundamentalmente hematológica.<sup>194,195</sup>

## **1.6 Neoadyuvancia en el subgrupo HER2**

### **1.6.1 Expresión de HER2**

HER2 es miembro de una familia de receptores de membrana de tirosin quinasa (HER1-HER4). Aunque HER2 no tiene ligando conocido, existen 11 ligandos diferentes que pueden activar a los otros miembros de esta familia de receptores.<sup>196</sup> La activación se produce mediante homodimerización o heterodimerización con otros miembros de la familia, produciendo una cascada de señalización intracelular que regula la transcripción de genes responsables de la proliferación celular, supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis (figura 16).<sup>197</sup>



**Figura 16:** Vía de señalización de HER2  
**Rimawi, MF, Annu Rev Med 2015**

La determinación de HER2 debe realizarse en el componente invasivo ya que los carcinomas in situ pueden sobreexpresar de forma frecuente este gen por razones no claras y, no sabemos qué implicaciones clínicas tiene.<sup>198</sup>

La sobreexpresión de HER2 se determina de dos maneras. Por un lado, la sobreexpresión de la proteína HER2, que se realiza mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y por otro, la amplificación del gen HER2 mediante hibridación in situ (ISH).

La determinación de la expresión de HER2 es controvertida debido a causas técnicas, experiencia del laboratorio en el que se realiza, la precisión del test, los puntos de corte que se emplean, la diferente interpretación entre patólogos y la heterogeneidad del tumor.

#### a).-Inmunohistoquímica

La IHQ revela la sobreexpresión de la proteína HER2 en la membrana de la célula. Su medición tiene cierto grado de subjetividad y depende del patólogo que la analiza, requiriéndose experiencia y formación para llevarla a cabo. El grado de expresión se valora mediante una escala de 0-3.

Se considera positivo para la sobreexpresión de la proteína un resultado de 3+. El grado de expresión para dar un resultado de 3+ ha variado en los últimos años según las diferentes guías publicadas conjuntamente por la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) y el Colegio Americano de Patólogos (CAP)<sup>199-201</sup>. En las guías ASCO-CAP del 2007 se necesitaba la tinción completa e intensa de la membrana celular en más del 30% de células tumorales; mientras que en las guías del 2013 y 2018, si la tinción intensa y completa de la membrana celular ocurría en más del 10% de las células tumorales, se daba un resultado positivo.

Un resultado equívoco por IHQ, se define con 2+ y corresponde a una tinción completa de membrana débil o moderada en más del 10% de las células tumorales o, de forma infrecuente, tinciones completas e intensas pero en el 30% o menos de las células tumorales, según la clasificación ASCO-CAP del 2007. Los resultados equívocos en las guías del 2013 y 2018 siguieron este mismo criterio pero las tinciones circunferenciales de membrana intensas se consideraban dentro de este grupo equívoco si ocurrían en menos del 10%. En los casos equívocos debe realizarse hibridación in situ.

Un resultado negativo por IHQ se definió como 0/1+.

En la clasificación del 2013 y 2018 un resultado de 1+ se aplica cuando la tinción de membrana es incompleta y apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales y, un resultado de 0 supone que no existe tinción de membrana o ésta es incompleta o apenas perceptible en el 10% o menos de las células tumorales.

Estos mismos criterios se aplicaron en la clasificación previa del 2007 independientemente del porcentaje de células tumorales en los que ocurría dicha expresión.

#### b).- Amplificación del gen HER2 mediante hibridación in situ (ISH)

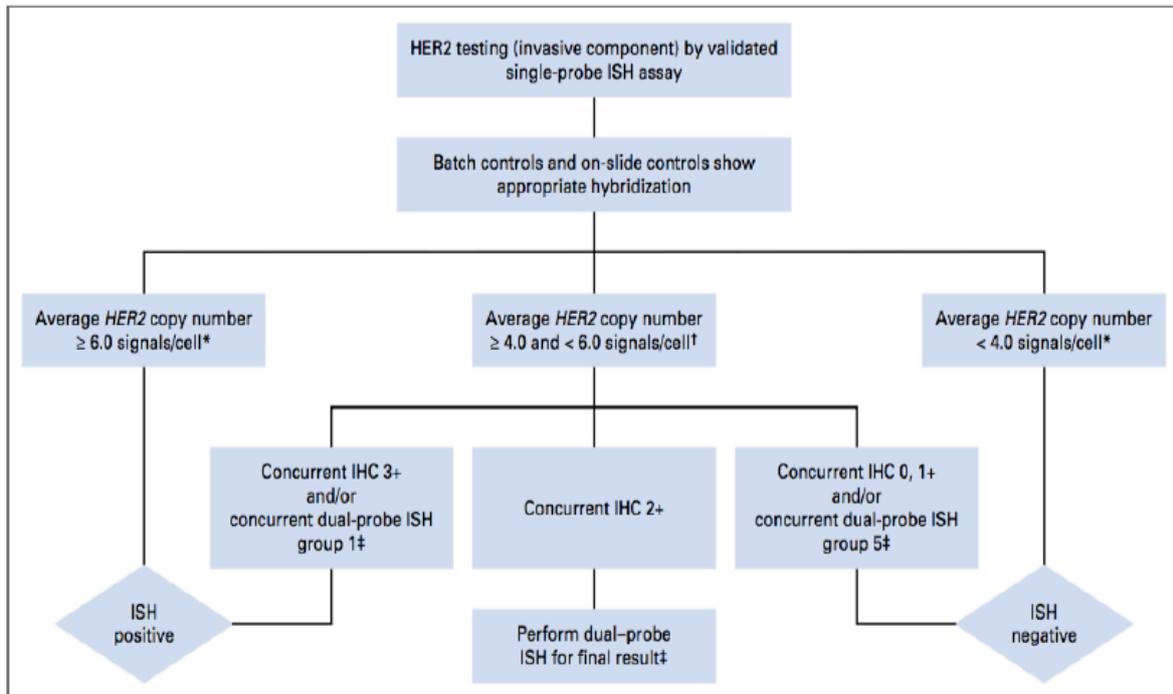
La amplificación del gen HER2 por ISH es más fiable que la IHQ y existen dos formas de determinarla: midiendo el número de copias del gen HER2 y la ratio entre la amplificación del gen HER2 y el cromosoma 17, donde se encuentra.

A lo largo de los años las diferentes sociedades científicas han utilizado diferentes puntos de corte y medidas para determinar su amplificación.

Un resultado positivo tras hibridación in situ para la amplificación del gen HER2, se dio en las guías ASCO-CAP del 2007, cuando la media del número de copias del gen era mayor de 6 y la ratio HER2/CEP 17 era > de 2.2. Si esta ratio era < de 2.2 no importaba el número de copias y se daba como negativo. En las guías del 2013, para considerarlo como positivo la ratio HER2/CEP17 tenía que ser > de 2 ó en los < de 2 la media de número de copias tenía que ser >6.

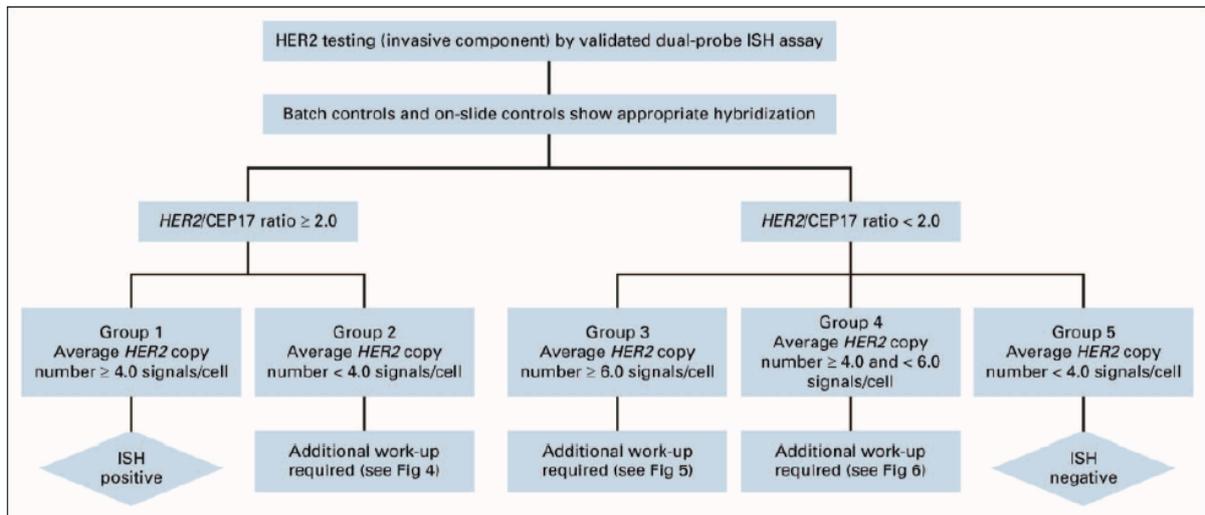
En estas guías también se establecieron 5 grupos según la amplificación por ISH, en función de la ratio HER2/CEP17 y el número de copias. Tres grupos son positivos, uno negativo y otro equívoco.

En las guías de 2018, un resultado positivo se da cuando la ratio HER2/CEN17 es  $\geq 2$  y el número de copias de HER2 es  $\geq 4$  o cuando la ratio es  $< 2$  y el número de copias de HER2 es  $\geq 6$  según reflejan las figuras 17 y 18.



**Figura 17:** Algoritmo de amplificación de HER2 por hibridación in situ según el número de copias del gen HER2. Guías ASCO-CAP 2018  
*Wolff, AC, J Clin Oncol 2018*

La implementación de las guías de 2013 y 2018 supone un incremento en el número de casos HER2 positivos en torno al 2%<sup>202</sup>. La mayor incidencia de resultados equívocos (<5%) probablemente no suponga un aumento en la tasa de HER2 final pero sí un aumento en el tiempo de análisis de expresión o amplificación debido a que, en algunos casos, hay que volver a testarlo.



**Figura 18:** Algoritmo de amplificación del gen HER2 por hibridación in situ usando doble prueba según las guías ASCO-CAP 2018  
*Wolff, AC, J Clin Oncol 2018*

### 1.6.2 Neoadyuvancia en este subgrupo

El cáncer de mama HER2 positivo es agresivo, asociado a altas tasas de proliferación celular y grados de diferenciación con facilidad para invadir y metastatizar. Estas características, por otro lado, le hacen ser un buen candidato para la neoadyuvancia .

Disponemos de terapias específicas antiHER2 que han sido estudiadas en el contexto del tratamiento sistémico primario, bien solas o en combinación con quimioterapia u hormonoterapia, que han cambiado la historia natural de la enfermedad consiguiendo altas tasas de respuestas y beneficios a largo plazo.

### **1.6.2.1.-Terapias antiHER2**

Las terapias antiHER2 analizadas en neoadyuvancia son: trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y trastuzumab-emtansina (TDM-1).

#### **Trastuzumab**

Fue el primer anticuerpo de membrana antiHER2. Se une al dominio extracelular de la proteína inactivando su función. Inhibe la señalización fundamentalmente de homodímeros de HER2 pero también de heterodímeros con HER1: receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER3. Esto produce la disregulación de la vía PI3K-AKT-mTor y con ello, la apoptosis de células tumorales.

Trastuzumab parece que actúa también produciendo una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo con la consiguiente muerte de células tumorales.

#### **Lapatinib**

Es un inhibidor dual de tirosín quinasa de HER1 (EGFR) y HER2. Actúa a nivel intracelular bloqueando AKT y diferentes MAP quinasas, produciendo apoptosis y muerte celular.

#### **Pertuzumab**

Es un anticuerpo monoclonal de membrana que se une a HER2 en un epítipo diferente a trastuzumab (dominio II, centro responsable de la dimerización del receptor) e impide la heterodimerización de HER2 con HER3 y HER1.

#### **Trastuzumab-Emtansina (TDM-1)**

Es un conjugado de un anticuerpo, trastuzumab (T), con un fármaco antitumoral, emtansina (DM1) (un potente inhibidor de microtúbulos) mediante una unión estable. Este conjugado se une a las células HER2 positivas aprovechando las características de trastuzumab y libera el fármaco a nivel intracelular, evitando toxicidades sobre células normales y aumentando la eficacia del tratamiento.

### **1.6.2.2.- Datos de eficacia de los diferentes tratamientos**

La eficacia de trastuzumab en monoterapia en cáncer de mama avanzado es escasa <sup>203</sup> por lo que en los primeros estudios en neoadyuvancia no se consideró buena opción.

En cuanto a la combinación, se vio sinergismo con diferentes quimioterápicos.

En un estudio fase III en cáncer de mama metastásico, publicado en 2001, se vio que añadir trastuzumab a paclitaxel, docetaxel o combinaciones de adriamicina y ciclofosfamida, aumentaba las respuestas, la SLP y SG de las pacientes cuyos tumores sobreexpresaban HER2 frente a la quimioterapia sola. En este estudio se vio que la combinación con adriamicina era tóxica a nivel cardiaco con una tasa de disfunciones cardiacas del 27%, por lo que no se recomendaba su combinación, buscando a partir de ese momento otras antraciclinas menos cardiotóxicas.<sup>204</sup>

Demostrado este beneficio en cáncer de mama HER2 positivo avanzado se comenzó a estudiar su papel en la adyuvancia y en la neoadyuvancia.

Los primeros estudios en este contexto demostraron que añadir trastuzumab a una quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos frente a quimioterapia sola, en estadios II-III de cáncer de mama HER2 positivo, aumentaba las tasas de respuesta patológica completa<sup>205</sup>, la SLE y la SG.<sup>206,207</sup>

El siguiente paso fue ver si lapatinib también aportaba este beneficio en combinación con quimioterapia. Se vio en los diferentes estudios que las tasas de RCp eran menores o similares a las que aportaba trastuzumab pero con una mayor toxicidad (toxicidad hepática, diarrea, astenia o rash), con lo que se determinó que lapatinib no debía usarse en este contexto.<sup>208-213</sup>

Lo que si se vio en estos estudios fue que la combinación de dos terapias anti HER2 (trastuzumab y lapatinib) en combinación con quimioterapia alcanzaba mayor beneficio en cuanto a tasas de RCp.

Esta eficacia del doble bloqueo se vio también cuando combinamos pertuzumab con trastuzumab y docetaxel en neoadyuvancia en el estudio Neosphere. Las tasas de RCp son mayores cuando usamos el doble bloqueo con quimioterapia frente a cada terapia biológica por separado añadida al taxano. Después de la cirugía las pacientes recibían la antraciclina y completaban un año de tratamiento con trastuzumab.

Se demuestra con una mediana de seguimiento de 5 años una mejora en la SLE en las pacientes que recibieron el doble bloqueo. Este estudio motivó la aprobación de pertuzumab, trastuzumab y taxano como terapia neoadyuvante en las pacientes con tumores HER2 positivos mayores de 2cm.

En este estudio se vio también que había un grupo de pacientes que hacían respuesta patológica completa con el doble bloqueo sin necesidad de quimioterapia. Esto supone un gran avance en cuanto que podríamos evitar la quimioterapia a algunas pacientes y con ello los efectos secundarios que conlleva. Sin embargo, por el momento no podemos saber a priori qué tipo de pacientes o tumores se van a beneficiar del doble bloqueo sin quimioterapia.<sup>214,215</sup>

Estudios posteriores que incluyeron un número más pequeño de pacientes evaluaron qué ocurría si administrábamos el doble bloqueo con pertuzumab y

trastuzumab además de con el taxano, también con la antraciclina. No se demostró que hubiera un aumento significativo en las tasas de RCp.<sup>216,217</sup>

Avanzando un poco más en este contexto, se quiso ver si la asociación de TDM-1 con pertuzumab ofrecía más beneficio que la combinación de quimioterapia tipo docetaxel y carboplatino asociada a pertuzumab y trastuzumab en el estudio Fase III KRISTINE. Se vio que TDM-1 combinado con pertuzumab no aportaba un mayor número de RCp aunque las pacientes en este brazo de tratamiento tuvieron una menor incidencia de toxicidad grado 3-4, que fue fundamentalmente digestiva, asociada a carboplatino y hematológica asociada a docetaxel.<sup>218</sup>

En estos estudios de neoadyuvancia HER2 en un principio parecía que no había ningún factor clínico o patológico que pudiera predecir una mayor respuesta a tratamiento y que era la expresión del gen HER2 la que marcaba esa respuesta. Se fue viendo posteriormente que los tumores que no expresaban receptor hormonal eran los que más tasas de RCp experimentaban. Estos tumores HER2 puros o enriquecidos son buenos candidatos para terapias antiHER2 sin quimioterapia como se ha demostrado en diferentes estudios.

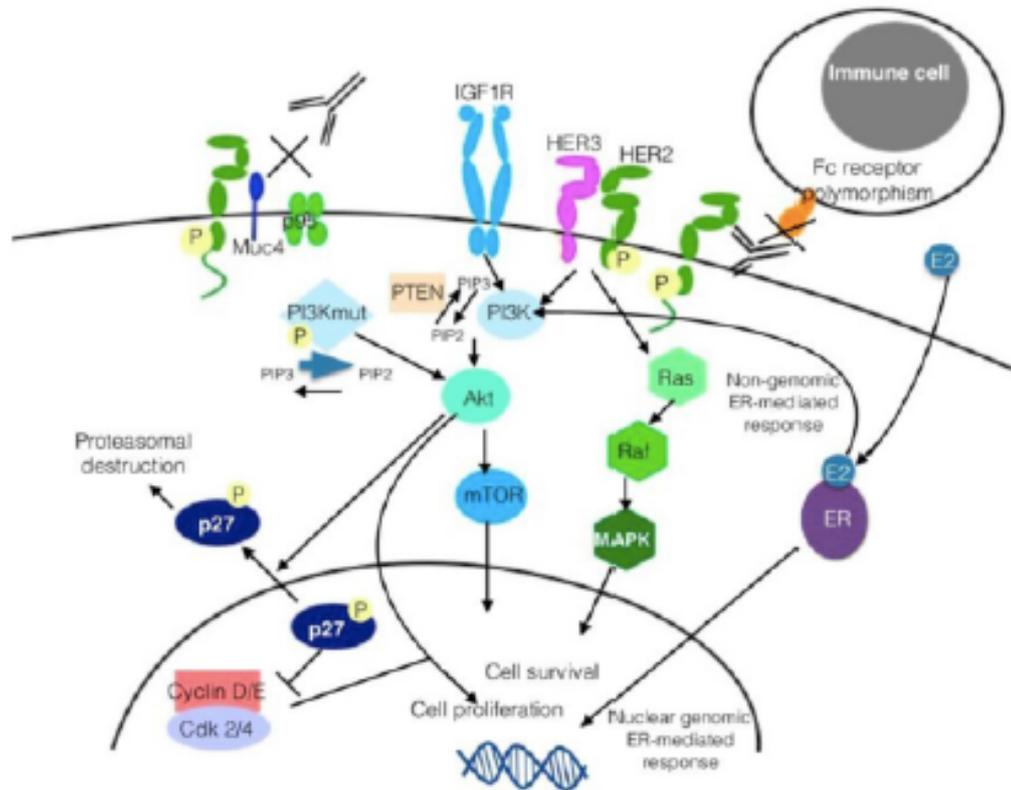
En estos mismos ensayos parece que los tumores HER2 positivos que además expresan receptores hormonales, se benefician menos de la quimioterapia añadida al bloqueo de la vía HER2, con tasas de RCp menores. Esto llevó a estudiar la posibilidad de combinar el bloqueo HER2 con terapias hormonales que inhibieran también la vía del receptor estrogénico. En ensayos clínicos fase II se vio que con la combinación de trastuzumab y lapatinib con letrozol durante 12, 18 o 24 semanas respectivamente, las tasas de RCp obtenidas eran elevadas en este subtipo luminal HER2 positivo, siendo una opción clínicamente muy buena para las pacientes al evitarles la quimioterapia. Habría

que confirmar estos resultados en ensayos clínicos fase III para que pudieran ser un estándar en la práctica clínica.<sup>219,220</sup>

### **1.6.2.3.-Mecanismos de resistencia**

A pesar de los avances en la inhibición de la vía HER2 con trastuzumab y las posteriores terapias diana (lapatinib, pertuzumab, TDM-1..), que consiguieron cambiar la historia natural agresiva de esta enfermedad, todavía un porcentaje de pacientes presenta recurrencias a pesar del tratamiento y acaba falleciendo por la enfermedad.

Se han estudiado diferentes mecanismos de resistencia tanto de novo (falta de respuesta inicial a la terapia antiHER2) como adquiridos (respuesta inicial a la terapia antiHER2 pero progresión posterior) responsables de este fallo al tratamiento (figura 19).<sup>221</sup>



**Figura 19: Mecanismos de resistencia anti HER2**  
***Luque-Cabal, M, Clinical Medicine Insights: Oncology 2016***

Estos mecanismos se pueden dividir en tres grandes grupos.

El primer grupo se relaciona con el concepto de “redundancia” dentro del receptor o ligandos de HER2, lo que conlleva a la inhibición incompleta del mismo y por tanto de la vía de señalización. Ejemplos de este mecanismo serían la existencia de una forma truncada del receptor HER2 (p95-HER2) o la ausencia del exón 16 del dominio extracelular del receptor HER2 (Isoforma Δ16).

El segundo gran grupo se refiere al concepto de “reactivación”. Ejemplos de este grupo serían la deregulación de la vía PI3K debido a mutaciones de la subunidad catalítica o a disminución de niveles de fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato-3 fosfatasa.

El tercer gran grupo se refiere al concepto de "escape". Esto se debe al uso de otras vías que ya existían o que se adquieren en el momento de la resistencia. Es el caso del cruce de las vías del receptor de estrógeno y HER2.

**a).- Concepto de redundancia (dentro del receptor HER2 u otros miembros de la familia HER)**

-El receptor truncado de HER2 (P95-HER2).

Se trata de una forma del receptor que carece de la parte carboxi terminal situada en el dominio extracelular de HER2 donde se une el trastuzumab. No se sabe cuál es la función de este receptor pero sí que posee actividad tirosín quinasa en ausencia de unión con trastuzumab. Se ha visto en diferentes estudios que la expresión de esta forma de receptor confiere resistencia a trastuzumab pero respuesta a otros inhibidores de tirosin quinasa a nivel intracelular, como es lapatinib.<sup>222,223</sup> Otros estudios no demuestran esta asociación.<sup>224</sup>

- La variante del receptor HER2 $\Delta$ 16 que presenta un desbalance en el número de cisteínas del dominio extracelular de HER2 se ha relacionado también con resistencia a trastuzumab, a través de la activación de la proteína quinasa Src e inactivación de PTEN. Dasatinib, inhibidor de Src asociado a trastuzumab podría revertir esta resistencia.<sup>225,226</sup>

- El complejo de chaperonas Hsp90 está implicado en la maduración, estabilidad y activación de diferentes oncoproteínas, incluida HER2. Su inhibición produce la degradación proteosómica de HER2.

- La expresión de otros miembros de la familia HER como HER1/EGFR o HER3 es otro mecanismo conocido de resistencia a trastuzumab.

La coexpresión de EGFR y HER2 se ha relacionado con una peor supervivencia en estudios retrospectivos y también en un subanálisis del estudio de adyuvancia N9831<sup>227</sup>. En este sentido la combinación de lapatinib con trastuzumab mejora los resultados frente a lapatinib sólo en pacientes con cáncer de mama metastásico refractarias a trastuzumab lo que potencia el valor del doble bloqueo en aras de revertir esta resistencia.<sup>228</sup>

La unión entre HER2 y HER3 es uno de los heterodimeros más potentes de la familia HER, en parte porque la fosforilación de HER3 activa la cascada de señalización intracelular PI3K-AKT-mTOR. Los ligandos que se unen a HER3 como la heregulina o neuregulina B1 juegan un papel importante en la resistencia a trastuzumab ya que hacen que se unan HER2 y HER3 con el consiguiente bloqueo incompleto de trastuzumab.<sup>229</sup>

El doble bloqueo de la vía HER con pertuzumab y trastuzumab, evitando la heterodimerización de HER2 con HER3 ha demostrado beneficio en supervivencia tanto en cáncer de mama metastásico en combinación con docetaxel en el estudio Cleopatra<sup>230</sup> como aumentando las tasas de RCp en diferentes estudios en neoadyuvancia, en combinación con antraciclinas y taxanos<sup>215,216</sup>, siendo actualmente un estándar de tratamiento en ambos contextos.

- La expresión de otros receptores de membrana diferentes a la familia HER también se han descrito como posibles mecanismos de resistencia.

El más conocido es el receptor de crecimiento de Insulina (IGF1R) que se expresa ampliamente en tejidos normales. Los ligandos que se unen a este receptor activan la vía PI3K-AKT-mTOR-MAP quinasa, al igual que los receptores de la familia HER. La sobreexpresión de IGF1R se ha relacionado con la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama metastásico HER2 positivo.<sup>231</sup> En estudios in vitro e in vivo se ha visto

sinergismo entre metformina y figitumumab, anticuerpo monoclonal anti IGF1R, y terapias antiHER2.<sup>232,233</sup>

El receptor de tirosín quinasa MET y su ligando, el factor de crecimiento del hepatocito, están sobre-expresados en algunos tumores HER2 positivos. Su coexpresión con HER2 en estudios in vitro se ha relacionado con resistencia a trastuzumab a través de la activación de AKT.<sup>234</sup>

La sobreexpresión de otro receptor tirosín quinasa, EphA2 se ha relacionado con mal pronóstico y resistencia a trastuzumab a través de la activación de la quinasa Src que a su vez activa la vía PI3K-AKT-MAP.<sup>235</sup>

Por último, el uso de la Eritropoyetina humana recombinante podría estar asociada con resistencia a trastuzumab a través de la activación de Src mediada por jak2 e inactivación de PTEN.<sup>236</sup>

- Se han descrito niveles altos de catecolaminas en el microambiente del cáncer de mama. La expresión del receptor  $\beta$ 2 Adrenérgico se relaciona con menos respuestas a trastuzumab a través de la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR. Este mecanismo podría suponer que la combinación de beta bloqueantes añadidos a trastuzumab podrían tener un papel en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.<sup>237</sup>

- Las Mucinas, fundamentalmente la MUC4 y la MUC1, glicoproteínas de membrana que interactúan con HER2/HER3 e impiden que trastuzumab se una a HER2, también se han relacionado con resistencia a trastuzumab.<sup>238,239</sup>

- La inmunidad y el microambiente pueden ser responsables de la resistencia a trastuzumab.

Sabemos que trastuzumab ejerce un efecto de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Este efecto puede ser, en parte, responsable de la eficacia del fármaco pero también de la resistencia al mismo. Se han descrito polimorfismos en el receptor

gamma del linfocito que se une a trastuzumab para mediar la citotoxicidad que disminuiría la eficacia del mismo.<sup>240</sup>

Por otro lado, sabemos que la presencia de linfocitos infiltrantes se relacionan con mayor eficacia de trastuzumab unido a quimioterapia. Si el tumor evade ese sistema inmune produciría resistencia a la terapia anti HER2. De ahí el racional para asociar inhibidores de los puntos de control inmunes a las terapias anti HER2.<sup>241</sup>

Otros elementos del microambiente tumoral como diversos componentes de la matriz extracelular (ECM) o diferentes elementos solubles como citoquinas o factores de crecimiento pueden ser responsables de resistencia a las terapias antiHER2. Se han descrito diferentes integrinas que pueden unirse a EGFR y HER2 evitando su inhibición por las terapias dirigidas y, ser capaces de promover vías alternativas de supervivencia para la célula tumoral evitando la apoptosis.<sup>242</sup>

## **b).- Concepto de reactivación**

- Activación aberrante de la vía PI3K-AKT-mTOR.

Esta vía puede ser activada por amplificación o mutación de la subunidad catalítica alfa de la enzima fosfatidil inositol 4-5 bifosfato 3 quinasa (PI3KCA)<sup>243</sup> o AKT1<sup>244</sup> o por mutación o pérdida de expresión de genes supresores tumorales que inhiben la vía como es PTEN<sup>245</sup> o Inositol polifosfato 4 fosfatasa, tipo II (INPP4B).<sup>246</sup>

Se ha demostrado que estas alteraciones se relacionan con resistencia a trastuzumab o al doble bloqueo con pertuzumab o lapatinib tanto en cáncer de mama metastásico como en neoadyuvancia.<sup>247,248</sup> Aunque existe cierta controversia al respecto dado que en algún estudio pequeño de neoadyuvancia con lapatinib se demostró altas tasas RCp en tumores con niveles bajos de PTEN.<sup>249</sup>

La reactivación de esta vía de señalización intracelular PI3K-AKT-mTOR como mecanismo de resistencia a terapias dirigidas anti HER2 ha llevado a añadir diversos fármacos que bloquean diferentes pasos de esta vía como mecanismo para revertir resistencias. Tenemos al respecto algún dato ya publicado en cáncer de mama metastásico con everolimus, inhibidor de mTOR, en los estudios BOLERO 1<sup>250</sup> (en primera línea) y BOLERO 3<sup>251</sup> (en enfermedad pretratada).

- Disregulación de la apoptosis y del ciclo celular.

La activación de los reguladores positivos del ciclo celular como la ciclina E<sup>252</sup> o inhibición de los reguladores negativos del ciclo como el inhibidor de ciclinas p27 (kip1)<sup>253</sup> lleva consigo la pérdida del efecto antiproliferativo de trastuzumab y, por lo tanto, la resistencia al mismo.

La alteración de la maquinaria normal de la apoptosis, disminuyendo los niveles normales de moléculas proapoptóticas o aumentando los factores de supervivencia, pueden llevar a la resistencia de las terapias anti HER2.<sup>254</sup>

### **c).- Concepto de escape**

- Interferencia entre la vía del RE y la vía HER2

La sobreexpresión de HER2 en algunos estudios se ha relacionado con resistencia a tamoxifeno tanto in vitro como in vivo. A nivel preclínico se sabe que la vía del receptor estrogénico puede actuar como una vía de escape en células HER2 y RE positivas, tratadas con trastuzumab o lapatinib.<sup>255</sup>

Sabemos que pacientes con cáncer de mama HER2 positivo cuyos tumores expresan positividad para receptores hormonales, tratados con quimioterapia y

trastuzumab, tienen unas tasas de respuestas más bajas frente a los tumores que no los expresan, tanto en enfermedad avanzada como en neoadyuvancia.<sup>208,214,256</sup>

Parece que existe interferencia entre ambas vías a múltiples niveles y cada una puede regular a la otra de forma positiva o negativa. Cada vía puede ser vía de escape de la terapia dirigida hacia la otra y viceversa.

El RE es un receptor que actúa fundamentalmente a nivel nuclear actuando como un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes genes como IGF1R, ciclina D1, bcl-2, VEGF, otros miembros de la familia HER u otros ligandos como TGF $\alpha$  (vía de señalización genómica).<sup>257</sup>

Hay una pequeña parte del RE que está localizado en el citoplasma y puede activar IGF1R, EGFR o HER2 así como otras quinasas como PI3K o Src (vía de señalización no genómica).

Si inhibimos de forma conjunta la vía HER2 y la del RE conseguiremos más eficacia que inhibiendo cada una por separado, tanto en cáncer de mama avanzado como en neoadyuvancia.<sup>219,220,258,259</sup>

#### **1.6.2.4.-Respuesta Clínica**

La valoración de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante que demuestre la disminución o desaparición del tumor en la mama o en la axila, se realiza mediante una combinación de exploración física y técnicas de imagen como la mamografía, ecografía y RNM.<sup>260</sup>

Cuando se empezó a hacer neoadyuvancia diferentes estudios demostraron que la mamografía conjuntamente con la exploración física nos daban información precisa del tamaño del tumor y de cómo éste se reduce durante el tratamiento.<sup>121</sup> Pueden existir

cambios fibróticos durante el tratamiento que sobreestiman el tamaño del tumor a la exploración y mamas densas o fibroquísticas que pueden dificultar la valoración de respuesta por ambos métodos.

La ecografía sin embargo, siendo similar a la mamografía para determinar el tamaño del tumor en la mama, nos da más información sobre la afectación o no ganglionar axilar y el grado de respuesta clínica al tratamiento.<sup>121</sup>

Sin embargo esta técnica no debe ser utilizada en ensayos clínicos para valorar la respuesta dado su carácter subjetivo.<sup>261</sup>

La RNM ha demostrado ser superior a la mamografía y ecografía en cuanto a la determinación del tamaño del tumor y la presencia de focos adicionales, como en los tumores multifocales o multicéntricos. Además, tiene una alta sensibilidad para detectar tumor residual después de la neoadyuvancia.

Sin embargo, la RNM puede sobreestimar el tamaño del tumor sometido a neoadyuvancia debido a inflamación asociada a la respuesta del tumor, esclerosis o necrosis circundante, presencia de lesiones cicatriciales o de carcinoma *in situ*. Por otro lado, puede subestimar el tamaño del tumor debido al efecto antiangiogénico de los taxanos lo que conlleva menos captación de contraste, a la presencia de componente *in situ* extenso o la pobre captación en focos muy pequeños de enfermedad residual.<sup>125</sup>

Los diferentes métodos de medida mencionados han demostrado buena capacidad para predecir RCp siendo la RNM la prueba de elección tal como se demuestra en el meta-análisis que incluye 44 estudios y 2050 pacientes que recibieron neoadyuvancia, donde la capacidad de predicción de RCp de la RNM es superior a la de la mamografía.<sup>126</sup>

Cuando ésta estuviera contraindicada o limitado su uso por otras razones, parece prometedora la mamografía con contraste.<sup>262</sup>

Se ha demostrado también que esta capacidad de la RNM para predecir RCp depende del subtipo biológico. Así predice mejor en los tumores HER2 positivos y triple negativos que en los luminales.

El PET/TAC no está avalado por las guías de práctica clínica para valorar respuesta en neoadyuvancia. Sin embargo, sabemos que el nivel de captación de glucosa por parte del tumor se relaciona con la biología del mismo y con el pronóstico. Esto ha llevado a su uso en neoadyuvancia dentro de ensayos clínicos.<sup>131</sup>

#### **1.6.2.5.-Respuesta patológica**

##### **a).-Definición y métodos de medida**

Sabemos que la respuesta clínica no necesariamente se correlaciona con la respuesta patológica, que mide la cantidad de enfermedad tumoral que existe en el espécimen quirúrgico, después del tratamiento sistémico primario.

Pueden existir lesiones grandes determinadas por pruebas de imagen tras el tratamiento neoadyuvante que en el espécimen quirúrgico correspondan a fibrosis exclusivamente o, respuestas completas por imagen tras el tratamiento y que se identifiquen pequeños focos microscópicos en la muestra quirúrgica.

Es muy importante para el patólogo cuando evalúa una muestra tras neoadyuvancia conocer bien la disposición macroscópica, fundamentalmente en los casos de RCp. Para ello el radiólogo debe marcar con clips el tumor al diagnóstico.

La definición de RCp varía según las diferentes comunidades científicas.

Algunos definen RCp en el tumor primario como la ausencia de cáncer residual invasivo pero permiten la existencia de carcinoma in situ. Otros, sin embargo, son más

restrictivos y tampoco permiten el componente in situ. Para algunos grupos la RCp sólo se evalúa en la mama sin tener en cuenta la axila, mientras que otros la tienen en cuenta. Parece que la definición más restrictiva, ausencia de cáncer invasivo e in situ tanto en mama como en axila, se relaciona con menos tasas de recaídas y mayor supervivencia.<sup>263</sup>

Se han utilizado diferentes sistemas de evaluación para determinarla (figura 20).<sup>264</sup>

Classification system	Clinical vs pathological	Primary tumor	Lymph nodes
UICC (1)	Clinical	Complete response: absence of remaining tumor. Partial response: 50% reduction in the product of the two largest perpendicular dimensions of the lesion. Progressive disease: >25% increase in tumor size. Stable disease: all other lesions.	//
pTNM	Pathological	ypT	ypN
Chevallier et al. (3)	Pathological	1. Disappearance of all tumors both on macroscopic and microscopic assessment. 2. In situ carcinoma present but no residual invasive tumor and no metastatic lymph nodes. 3. Invasive carcinoma present with stromal changes (sclerosis, fibrosis). 4. Few modifications of the appearance of the tumor.	
Sataloff et al. (4)	Pathological	T-A: total or near total therapeutic effect (in the latter case: scattered cells accounting for >5% of the tumor surface). T-B: subjectively >50% therapeutic effect but less than total or near total. T-C: >50% therapeutic effect. T-D: no therapeutic effect evident.	N-A: evidence of therapeutic effect, no metastatic disease. N-B: no nodal metastasis or therapeutic effect. N-C: evidence of therapeutic effect but nodal metastasis still present. N-D: viable metastatic disease, no therapeutic effect.
Panauf-Llorca et al. (5)	Pathological	Class I regroups Ch(1-2) and TANA-NB = complete or almost complete response in breast and absence of node involvement Class II regroups Ch(3), TANC-ND and TB or C any N = partial responders, any N/complete or almost complete responders and node involvement Class III regroups Ch(4) and TD any N = nonresponders	
Bonedonna et al (6)	Pathological	Grade 1: some alteration to individual cells but no overall reduction in numbers when compared with pretreatment core biopsy. Grade 2: mild loss on invasive cells but still with high cellularity. Grade 3: considerable reduction in cells, up to 90% loss. Grade 4: marked reduction, that is, only clusters of widely dispersed cells detected. Grade 5: no invasive carcinoma identified; in situ carcinoma or tumor stroma may still be noted.	//
Smith (7)	Pathological	G1: no reduction in overall numbers of tumor cells compared with pretreatment core biopsy. G2: mild loss of tumor cells, but overall cellularity remaining high. G3: up to 90% reduction in tumor cells. G4: marked disappearance with only small clusters remaining. G5: no invasive tumor; in situ carcinoma or tumor remaining.	A: true negative, no metastasis, and no alterations. B: metastasis with no histological alterations. C: metastasis with alterations. D: no metastasis with alterations.
RCB system (8)	Pathological	RCB index (RCB is calculated as a continuous index combining pathological measurements of primary tumor [size and cellularity] and nodal metastases [number and size] for prediction of distant relapse-free survival in multivariate Cox regression analyses; see: <a href="http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB">http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB</a> ). RCB-0: no carcinoma in breast or lymph node. RCB-I: partial response. RCB-II: partial response. RCB-III: chemoresistant.	

**Figura 20: Sistemas de clasificación de respuesta patológica**  
*Marchio, C, J Natl Cancer Inst Monogr 2011*

Classification system	Clinical vs pathological	Primary tumor	Lymph nodes
Miller-Payne system (9)	Pathological	Grade 1: no change or some alteration to individual malignant cells, but no reduction in overall cellularity. Grade 2: a minor loss of tumor cells, but overall cellularity still high; up to 30% loss (pPR). Grade 3: between an estimated 30% and 90% reduction in tumor cells (pPR). Grade 4: a marked disappearance of tumor cells such that only small clusters or widely dispersed individual cells remain; >90% loss of tumor cells (almost pCR). Grade 5: no malignant cells identifiable in sections from the site of the tumor; only vascular fibroelastic stroma remains, often containing macrophages; DCIS maybe present (pCR).	//
NSABP B-18 (10)	Pathological	pCR: no recognizable invasive tumor cells present. pPR: the presence of scattered individual or small clusters of tumor cells in a desmoplastic or hyaline stroma. pNR: tumors not exhibiting the changes listed above.	//
Pinder et al (2)	Pathological	1. Complete pathological response: i) no residual carcinoma, or ii) no residual invasive tumor but DCIS present. 2. Partial response to therapy, either i) minimal residual disease/hear total effect (eg, <10% of tumor remaining) or ii) evidence of response to therapy but with 10%–50% of tumor remaining, or iii) >50% of tumor cellularity remains evident when compared with the previous core biopsy sample, although some features of response to therapy present. 3. No evidence of response to therapy.	1. No evidence of metastatic disease and no evidence of changes in the lymph nodes. 2. Metastatic tumor not detected but evidence of response/downstaging (eg, fibrosis). 3. Metastatic disease present but also evidence of response, such as nodal fibrosis. 4. Metastatic disease present with no evidence of response to therapy.

\* DCIS = ductal carcinoma in situ; pCR = pathological complete response; pPR = pathological partial response; pNR = pathological no response; RBC = residual cancer burden; ypT = pathological tumor size assessed on specimens after neoadjuvant treatment; ypN = pathological lymph node status assessed after neoadjuvant treatment; //: not available.

### **Figura 20 (cont): Sistemas de clasificación de respuesta patológica** **Marchio, C, J Natl Cancer Inst Monogr 2011**

No sabemos cuál es el más adecuado y tampoco se han comparado entre ellos, pero lo que concluyen todos es que, existe un grupo con RCp y otro dónde no existe respuesta y que se divide en diferentes categorías de respuesta parcial.

En los inicios de la neoadyuvancia se utilizó el sistema TNM de la AJCC que evalúa la enfermedad residual tanto en mama como en axila y permite la existencia de carcinoma in situ. Esta clasificación en su versión revisada demostró tener valor pronóstico y relacionarse con la SLE y SG.<sup>265</sup>

En la actualidad los dos sistemas de valoración de respuesta más validados son por un lado el de Miller & Payne y por otro, el de Symmans.

El sistema de Miller & Payne consiste en una escala de 5 puntos dónde se da valor al efecto del tratamiento sistémico primario en reducir la celularidad tumoral. Así

en el grado 1 no existe reducción en la celularidad, en el grado 2 la reducción es del 30%, en el grado 3 existe una reducción entre el 30-90%, el grado 4 supone más del 90% de reducción de celularidad tumoral y en el grado 5 no existen células malignas pero podría estar presente el carcinoma *in situ*. Los grados 1-4 se consideran como no respuesta patológica (nRCp) completa y los grados 5 como RCp.

Para puntuar como un grado 5 en esta clasificación debe identificarse en el espécimen quirúrgico un área de fibrosis-elastosis reflejo de dónde se encontraba el tumor al diagnóstico.

Se vio correlación entre el grado de respuesta, la SLE y SG.<sup>266</sup>

La crítica que puede hacerse al sistema de Miller & Payne es que no tiene en cuenta el tamaño del tumor (así los cambios en la celularidad tumoral pueden ser mayores en tumores pequeños), no evalúa la afectación ganglionar axilar (aunque se utiliza en la práctica la clasificación del sistema Sataloff que veremos más adelante ) y por último, el establecimiento de la respuesta patológica como una variable dicotómica hace que en el rango de nRCp se incluyan desde tumores resistentes a respuestas mayores.

El sistema de Symmans mide la cantidad de enfermedad residual<sup>267</sup> como una variable continua derivada de: las dimensiones del tumor primario, la celularidad del lecho tumoral y la cantidad de enfermedad axilar expresada en número de ganglios y diámetro del ganglio de mayor tamaño.

Estas variables tienen de por sí valor pronóstico y se obtienen del informe de anatomía patológica. Se introducen una calculadora disponible online ([www.mdanderson.org/breast\\_cancer\\_RCB](http://www.mdanderson.org/breast_cancer_RCB)) y se obtiene el resultado.

Este sistema aunque es más laborioso para el patólogo, permite unificar criterios y estandarizar el informe de anatomía patológica que permita su uso tanto en la práctica clínica como en los ensayos clínicos de neoadyuvancia.

Se identifican 4 grupos según esta clasificación: en el RCB-0 no existe enfermedad residual, en el RCB-I, la enfermedad residual es mínima, en el RCB-II es moderada y en el RCB-III es extensa.

Se ha visto correlación entre las diferentes categorías y la supervivencia libre de enfermedad a distancia con validación en estudios independientes.<sup>268,269</sup>

En cuanto a la valoración patológica de la enfermedad residual en axila, a parte del sistema ypTNM y el de Symmans, pocas clasificaciones la valoran. La de Sataloff, utiliza 4 categorías para definir la afectación axilar: tipo A: cuando no existe enfermedad axilar y existen cambios atribuibles al tratamiento, tipo B: no evidencia de enfermedad pero tampoco de cambios secundarios al tratamiento, tipo C: cuando existe enfermedad axilar pero también cambios atribuibles al tratamiento y la tipo D: cuando existe afectación axilar y no existen cambios asociados al tratamiento.<sup>270</sup>

## **b).-Objetivo subrogado de supervivencia a largo plazo**

El objetivo primario de los estudios en neoadyuvancia suele ser el porcentaje de las tasas de RCp.

Éstas dependen del subtipo biológico entre otros factores. Así, los tumores triple negativos y HER2 positivos son los que más se benefician de este tratamiento. Algunos luminales, sobre todo con alto índice de proliferación y grado 3 también pueden obtener RCp.

A lo largo de los años se vio que aquellas pacientes cuyos tumores alcanzaban RCp tardaban más en recaer o vivían más, pero había datos contradictorios al respecto.

Para ello se realizaron varios meta-análisis que pretendían contestar a esta pregunta entre otros objetivos.

El primero de ellos, el de Cortazar<sup>186</sup>, se llevó a cabo por iniciativa de la FDA americana (Food and Drug Administration) que estableció un grupo de colaboración internacional de ensayos clínicos en neoadyuvancia de cáncer de mama (CTneoBC) que dispusieran de datos de seguimiento a largo plazo con cuatro objetivos claros: establecer una asociación entre la RCp, la SLE y SG, ver qué definición de RCp se relaciona mejor con ambos parámetros, identificar los subtipos biológicos cuya RCp se relaciona mejor con beneficio a largo plazo y por último, determinar si un aumento en la tasas de RCp se relaciona con un aumento de beneficio en supervivencia.

Se incluyeron 12 ensayos clínicos en neoadyuvancia con 11.955 pacientes evaluables. Todos los estudios incluyeron antraciclinas y taxanos como parte del tratamiento a excepción de dos en población HER2-positiva.

Globalmente las tasas de RCp fueron bajas y éstas eran menores a medida que la definición de RCp era más exigente o restrictiva (ypT0 ypN0). La erradicación del tumor en mama y axila se relacionó con mejor SLE y SG.

Se observó mayor tasa de RCp en los subtipos agresivos (los triple negativos y HER2-positivos, en este último caso, fundamentalmente los tumores con RH negativo) y tumores receptor hormonal positivo de alto grado. Estas RCp se relacionaron con un beneficio en SLE y SG en estos subgrupos.

La asociación entre RCp y supervivencia fue baja en los subtipos luminales y de bajo grado.

No se vio asociación entre aumentos en la tasa de RCp con aumentos en la SLE ni con la SG. Esto puede ser debido a la heterogeneidad de los distintos subtipos tumorales incluidos en el meta-análisis o a que solamente en tres estudios se utilizaron terapias dirigidas como trastuzumab en el subtipo HER2.

Los autores del estudio concluyen a este respecto que puede ser que la tasa de RCp que se alcanza en un estudio no se relacione con beneficios a largo plazo pero, a nivel del paciente individual que alcanza RCp sí hay beneficio a largo plazo en supervivencia, sobre todo en los subtipos más agresivos.

El segundo meta-análisis es el de Broglio <sup>271</sup> y se centra en el subgrupo HER2-positivo. Reúne un total de 36 estudios y 5768 pacientes en estadio II-III que recibieron tratamiento neoadyuvante con quimioterapia más terapia antiHER2 y de los que hay datos de respuestas patológicas y supervivencia a largo plazo.

Se vio una mejora en la SLE y SG de las pacientes que alcanzaban RCp, fundamentalmente en los tumores con RH negativos.

Por lo tanto, parece que la RCp es un objetivo intermedio que mide eficacia de un tratamiento en concreto y puede actuar como objetivo subrogado de beneficio a largo plazo en determinados subtipos agresivos.

Así, los ensayos clínicos en neoadyuvancia donde se utilice la respuesta patológica como objetivo subrogado de beneficio a largo plazo deben centrarse en aquellos subtipos agresivos en los que vemos que las tasas de RCp son mayores y tiene un riesgo de recurrencia más alto.<sup>272</sup>

Esto ha llevado a la FDA a la aprobación acelerada de fármacos estudiados en neoadyuvancia que cumplan con el objetivo intermedio de mejora en respuesta patológica y a la espera de demostrar eficacia a largo plazo.<sup>273</sup>

### **1.6.2.6.-Cardiotoxicidad**

#### **a).- Por Antraciclinas**

La cardiotoxicidad asociada a antraciclinas se caracteriza por un daño del miocito que produce una disfunción progresiva del ventrículo izquierdo (cardiotoxicidad tipo I) y desemboca en fallo cardiaco sintomático. Es dosis dependiente. Así, el riesgo de desarrollar cardiotoxicidad con doxorubicina está entre 1-5% con dosis mayores o iguales a 550 mg/m<sup>2</sup>, alrededor del 30% si la dosis es de 600 mg/m<sup>2</sup> y del 50% cuando la dosis es de 1g/m<sup>2</sup> o mayor.<sup>274</sup>

Los factores de riesgo que se han relacionado con dicha toxicidad cardiaca son: la edad joven (<18 años) o avanzada (> 65 años) al inicio del tratamiento, factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes, obesidad) o padecer una enfermedad cardiovascular previa, dosis acumuladas de más de 300 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina o más de 600 mg/m<sup>2</sup> de epirubicina, la asociación con radioterapia mediastínica, la combinación con otras terapias que producen cardiotoxicidad (trastuzumab o ciclofosfamida) y la supervivencia más prolongada de las pacientes.<sup>274</sup>

Aunque hay datos de series retrospectivas, existen pocos estudios prospectivos que presenten datos de incidencia y prevalencia de toxicidad cardiaca secundaria a antraciclinas.<sup>274</sup>

El daño cardiaco puede ser agudo, pero a partir de los 5 años de haber iniciado el tratamiento aumenta el riesgo de desarrollar cardiotoxicidad por antraciclinas frente a las pacientes que no las reciben.<sup>275</sup>

Existen pocos estudios que analicen la toxicidad cardiaca de las antraciclinas asociada al uso secuencial con radioterapia. En un estudio retrospectivo que incluyó 360

pacientes se vio que la toxicidad cardiaca es mayor en las pacientes que reciben radioterapia en el lado izquierdo y antraciclina, frente a las que no la reciben. La edad, factores de riesgo cardiovascular y técnicas más antiguas de radioterapia pueden ser factores modificadores de esa toxicidad cardiaca.<sup>276</sup>

En la enfermedad HER2 positiva, en el estudio pivotal en enfermedad metastásica de quimioterapia con o sin trastuzumab, se vio que el uso concomitante de doxorubicina y ciclofosfamida con trastuzumab produjo una incidencia de insuficiencia cardiaca congestiva del 16%, por lo que a partir de entonces se evitó su combinación en la clínica.<sup>204</sup>

Otras antraciclina como la epirrubina<sup>205</sup> o las formulaciones liposomales como la doxorubicina liposomal no pegilada (*Myocet*)<sup>277</sup> o la doxorubicina liposomal pegilada (*Caelyx*) han demostrado en estudios fase I/II similar eficacia y un índice de cardiotoxicidad menor.<sup>278</sup>

#### **b).- Por trastuzumab y otras terapias anti HER2**

La cardiotoxicidad asociada a trastuzumab (cardiotoxicidad tipo II) es diferente a la producida por antraciclina en los siguientes aspectos: no daña el miocito, no es dosis dependiente, en la mayor parte de los casos es reversible (suele mejorar tras la parada temporal del fármaco o con medicación ) y, no suele desencadenar insuficiencia cardiaca sintomática que pueda llegar a producir la muerte del paciente.

En los cuatro estudios prospectivos de adyuvancia en enfermedad HER2 positiva la incidencia de insuficiencia cardiaca fue del 1% al 4% dependiendo si habían recibido o no antraciclina en los esquemas de adyuvancia o si el trastuzumab se administró concomitante o de forma secuencial a la quimioterapia.<sup>274</sup>

Los factores de riesgo, que de forma prospectiva se asociaron con esta disfunción cardíaca atribuible a trastuzumab, fueron la edad y el haber presentado una reducción en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) tras el tratamiento con la antraciclina.<sup>279</sup>

No existe información sobre si la radioterapia administrada sobre la mama o la pared torácica, fundamentalmente en el lado izquierdo, aumenta la toxicidad cardíaca tardía asociada a trastuzumab.

Basada en la incidencia de insuficiencia cardíaca del estudio pivotal en enfermedad metastásica con la asociación de trastuzumab con doxorubicina y ciclofosfamida, en los estudios de adyuvancia se determinó medir la FEVI bien con ecografía o con isótopos antes de empezar el tratamiento, después de finalizar la antraciclina y normalmente cada 3 meses durante el tratamiento con trastuzumab. Una vez finalizado el mismo, se realizaba cada 6 meses con una duración variable dependiendo del estudio.<sup>172,279-281</sup>

Los pacientes que tenían una enfermedad cardíaca previa no fueron incluidos dentro de estos estudios.

Los criterios para discontinuar trastuzumab definitivamente fueron el desarrollo de insuficiencia cardíaca o que, tras la reducción de la FEVI más de un 10-15% de la basal en pacientes asintomáticos y discontinuar 4 semanas, ésta no se hubiera recuperado.<sup>280</sup>

La magnitud del beneficio de la combinación de quimioterapia y trastuzumab, tanto en SLE como en SG, supera al bajo riesgo de cardiotoxicidad reversible y que generalmente se manifiesta como bajadas asintomáticas de la FEVI.

En los estudios de neoadyuvancia también se vio esta cardiotoxicidad reversible y asumible tanto con quimioterapia y trastuzumab<sup>205,206</sup> como con el doble bloqueo de la

vía HER2, con trastuzumab asociado a pertuzumab <sup>214,216</sup> o lapatinib<sup>282</sup>. No se vio toxicidad cardiaca añadida a trastuzumab con la adición de pertuzumab o lapatinib.

### **c).- Por Radioterapia**

La radiación de la mama y pared torácica se ha asociado a daño cardiaco consistente en agina, infarto de miocardio o muerte súbita.

Suele aparecer años después del fin de la radioterapia (hasta 20 años) pudiendo haber cambios subclínicos previos ante los que se podría intervenir y evitar un daño mayor.

El daño cardiaco asociado a la radioterapia fue mayor en la época premoderna (antes del año 1985) cuando los equipos de radioterapia utilizaban grandes volúmenes y dosis de irradiación que producían más daño a nivel cardiaco. En la época postmoderna los avances técnicos en este campo llevaron a una mejora en las toxicidades.

En la era premoderna la irradiación de la pared torácica, fundamentalmente en el lado izquierdo, se asoció con un aumento de la toxicidad cardiaca a medida que iba transcurriendo el seguimiento de las pacientes.<sup>283,284</sup>

En la era postmoderna en los diferentes meta-análisis donde se demostró que la radioterapia aumentaba la supervivencia de las pacientes, ya no se vieron diferencias entre la irradiación del lado derecho frente al izquierdo en cuanto al aumento de la toxicidad cardiaca.<sup>285,286</sup>

Según la base de datos del SEER, en torno a 8000 pacientes con cáncer de mama izquierda y 7900 pacientes con cáncer de mama derecha tratadas con radioterapia entre 1986 y 1993 y con una mediana de seguimiento de 9.5 años, no se encontraron diferencias en la toxicidad cardiaca según la lateralidad.<sup>286</sup>

#### **d).- Monitorización cardiaca**

Los daños a nivel cardiaco son evidentes con estos fármacos pero no existe mucha evidencia científica o consenso para su manejo y monitorización.

Es necesaria la unión de especialidades (cardiología y oncología) para realizar prevención primaria, controlando los factores de riesgo cardiovascular, y posteriormente monitorizar la función cardiaca y ajustar el tratamiento cardiológico, si fuera necesario, para que no haya que suspender los tratamientos oncológicos de forma innecesaria y alcanzar buenos resultados en salud.<sup>287</sup>

Desde el punto de vista de la imagen, la ecocardiografía es la técnica de elección, en 3D si está disponible, aporta más información, es más comparable y menos subjetiva que la 2D. Existen técnicas nuevas como es el speckle-tracking 2D que identifica el daño miocárdico de forma más precoz estudiando la deformación miocárdica o strain. En situación basal el strain longitudinal global (SLG) mejora la estratificación del riesgo frente a la FEVI 2D.<sup>288</sup>

En cuanto a los biomarcadores, se recomienda la determinación basal y antes de cada ciclo de troponina I. Se detecta elevación precoz de troponina (en menos de 72 horas) en un tercio de las pacientes tratadas con antraciclina. La elevación persistente de troponina I durante el tratamiento identifica pacientes de peor pronóstico cardiovascular y, que se podrían beneficiar de un tratamiento médico precoz con un IECA (Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina) para reducir el riesgo cardiovascular y así no necesitar la suspensión del tratamiento antineoplásico.<sup>287</sup>

El uso de la fracción amino-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP), marcador de Insuficiencia cardiaca y otros biomarcadores está menos definida.<sup>289</sup>

## II OBJETIVOS

Analizamos de forma retrospectiva una serie de 142 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER2-positivo y con indicación de neoadyuvancia entre los años 2005-2016 en nuestra institución.

Los objetivos del estudio fueron:

1.- Evaluar la eficacia del tratamiento en los siguientes aspectos:

1.1 Respuesta clínica

1.2 Respuesta patológica

1.3 Tasa de cirugía conservadora

1.4 Beneficio a largo plazo: SLE y SG

2.- Relacionar diferentes aspectos clínicos y patológicos con la eficacia de los tratamientos:

2.1 Parámetros clínicos: edad, tamaño del tumor, afectación o no ganglionar, estadio y tipo de tratamiento recibido.

2.2 Parámetros patológicos:

2.2.1: Receptores hormonales, expresión de HER2 por IHQ, grado e índice de proliferación.

2.2.2: Correlacionar los diferentes niveles de amplificación del gen HER2 con la expresión por IHQ, la RCp y la supervivencia.

3.- Cardiotoxicidad.

### **III PACIENTES Y MÉTODOS**

El estudio incluye a 142 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2 positivo con estadios I-III diagnosticadas entre el año 2005 al 2016 en nuestra institución y analizadas de forma retrospectiva.

Todos los procedimientos realizados en él fueron aprobados por el Comité Autonómico de Ética de Galicia en el año 2015 con el código SAN-TRA-2015-01 y todas las pacientes que estaban vivas en el momento en que comenzó el estudio firmaron consentimiento informado para su participación.

Todos los procedimientos del estudio fueron llevados a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki de buenas prácticas clínicas del año 1975, revisada en el año 2000.

Todas las pacientes incluidas en el estudio eran mayores de 18 años y tenían buen estado general según la clasificación ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) menor o igual a 1.

Al diagnóstico, en una primera fase del estudio, se utilizó la muestra de la biopsia por aguja gruesa para el diagnóstico histológico y el grado y el estudio inmunohistoquímico del tumor realizándose la expresión de RH de estrógeno y progesterona, expresión proteica de HER2 y el Ki-67.

Se consideró que el tumor era HER2 positivo si la sobreexpresión proteica de HER2 era de tres 3+ medido por la técnica Herceptest™ Dako hasta el 2013 y ROCHE hasta el 2016 o, si existía amplificación del gen HER2 por HIS medida con fluorescencia hasta el 2013 o con plata desde el año 2013 al año 2016, todo dentro del mismo laboratorio y de acuerdo con las guías ASCO-CAP del año 2007 y 2013.

En el año 2019, en una segunda fase del estudio, se llevó a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Santiago de Compostela la determinación de la amplificación del gen por FISH en 100 de las 142 muestras de la biopsia por aguja gruesa. En las 42 pacientes restantes en las que no se realizó el estudio fue debido a la falta de muestra o insuficiente para el diagnóstico.

Para el estudio del gen HER2 mediante hibridación in situ se confeccionaron 4 micromatrices tisulares (TMA) empleando un Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). De cada caso se seleccionó un bloque histológico, del que se extrajo un cilindro correspondiente a una zona representativa del tumor, utilizándose para ello una aguja de 2 mm de diámetro. En los casos en que en un TMA, un cilindro determinado carecía de material o de componente tumoral infiltrante, se realizó la técnica sobre sección completa del bloque original.

La determinación del estado del gen HER2 se realizó empleando el kit HER2 IQFISH pharmDX (Instant Quality Fluorescence In Situ Hybridization) (Agilent, Carpinteria, CA), que permite la determinación y visualización simultánea del gen HER2 y del centrómero del cromosoma 17. Para dicha detección se emplea una mezcla de dos sondas: una sonda HER2 (ADN) marcada con Texas Red (TR) y una sonda CEN-17 (PNA, Peptide Nucleic Acid) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), específica para la región centromérica del cromosoma 17.

El protocolo seguido se resume en los siguientes pasos:

1. Desparafinado (10 min, 38 °C)
2. Pretratamiento con calor (15 min. 97 °C)
3. Lavado en etanol 95% (2 x 3 min. 32 °C)
4. Digestión enzimática con pepsina (20 min.)
5. Secado (15 min, 45 °C)

6. Sonda HER2/CEN17 ( HER2 IQFISH pharmDx):
  - a) Desnaturalización (10 min. 66°C)
  - b) Hibridación (75 min. 45° C)
7. Lavado de rigor (10 min. 61° C)
8. Montaje con DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) para contraste de los núcleos.

La valoración de las preparaciones hibridadas se realizó en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Tokio, Japón) equipado con un filtro para DAPI (núcleos) y un filtro doble para TR (HER2) y FITC (CEN-17) (en los casos con señal débil se emplearon también filtros simples para cada una de las sondas). La cuantificación se llevó a cabo con objetivo de inmersión de 100x.

Para determinar la amplificación se siguieron las guías ASCO-CAP del año 2018.

Para estadificar la enfermedad se realizó a nivel axilar una punción-aspiración por aguja fina (PAAF) guiada por ecografía si existían adenopatías sospechosas al diagnóstico.

En la mayoría de las pacientes se realizó marcaje del tumor mediante clip metálico guiado por ecografía, antes de comenzar el tratamiento antitumoral. Los carcinomas multicéntricos o inflamatorios no se marcaron debido a la indicación de mastectomía independientemente de la respuesta que obtuvieran con el tratamiento.

Desde el año 2005 hasta finales del año 2011 se llevó a cabo la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) previamente al inicio del tratamiento sistémico primario en las pacientes con axila clínicamente negativa. Del año 2012 al 2016 este procedimiento se realizó después del tratamiento neoadyuvante, en el momento de la cirugía.

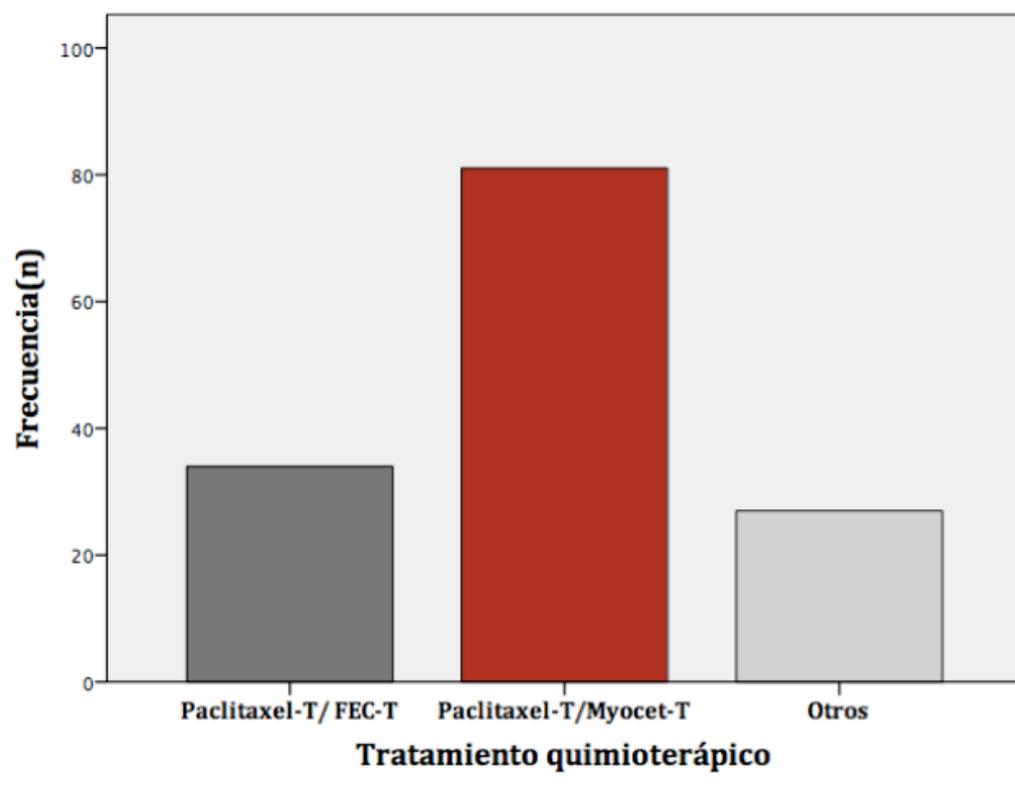
Ninguna de las pacientes al diagnóstico tenían enfermedad cardiovascular conocida, pero si se recogió la incidencia de factores de riesgo a ese nivel como la presencia o no de hipertensión arterial, dislipemias o el índice de masa corporal.

Todas las pacientes al diagnóstico tenían una adecuada función del ventrículo izquierdo (FEVI mayor del 50%) medida por ecografía cardiaca.

Esta ecocardiografía fue repetida después de 3-4 ciclos, al finalizar la quimioterapia y durante el seguimiento. Al menos 6 meses después de haber finalizado el tratamiento con trastuzumab adyuvante.

Las pacientes tenían una buena función hematológica, hepática y renal antes de iniciar el tratamiento.

Los diferentes regímenes de tratamiento recibido se muestran en la figura 21. La gran mayoría de las pacientes recibieron un total de 8 ciclos consistiendo en una secuencia de antraciclinas y taxanos en combinación con trastuzumab.



**Figura 21 Tipos de Quimioterapia\***

**Notas:** \*Dosis de quimioterapia: Paclitaxel: 80 mg/m<sup>2</sup>, semanal x12 dosis  
 FEC: 5-Fluorouracilo: 600 mg/m<sup>2</sup>/Epirubicina: 75 mg/m<sup>2</sup>/Ciclofosfamida: 600 mg/m<sup>2</sup> cada 3 semanas x 4 ciclos.  
 Myocet: 60 mg/m<sup>2</sup>/Ciclofosfamida: 600 mg/m<sup>2</sup>/ cada 3 semanas x 4 ciclos  
 Trastuzumab (T): 8 mg/kg IV dosis de carga seguido de 6 mg/kg IV every 3 semanas (un total de 12 meses, incluyendo la terapia neoadyuvante y adyuvante)

Durante el tratamiento las pacientes se exploraron físicamente cada 3 semanas. Se realizó mamografía, ecografía y RNM de mama antes y después del tratamiento neoadyuvante.

La respuesta clínica (RC) fue evaluada mediante exploración física, ecografía y RNM de mama siguiendo los criterios RECIST con ésta última.

Las pacientes fueron intervenidas quirúrgicamente entre las 3 y 5 semanas desde el fin del tratamiento quimioterápico.

La RCp fue definida como la ausencia total de tumor invasivo tanto en mama como en axila (ypT0/is ypN0).

En la mayoría de las pacientes la respuesta patológica se midió según el sistema de Miller & Payne. En las pacientes incluidas en los dos primeros años del estudio el sistema de valoración de respuesta patológica fue el TNM de la AJCC.

Correlacionamos la respuesta patológica con factores clínicos y biológicos (tamaño tumoral, afectación ganglionar, receptores hormonales, grado de diferenciación y Ki-67).

Todas las pacientes a las que se les realizó cirugía conservadora recibieron posteriormente irradiación de la mama a dosis estándar. Algunas pacientes con tumores T3 al diagnóstico recibieron también radioterapia sobre el lecho de mastectomía. La irradiación de cadenas ganglionares (axila y fosa supraclavicular) se llevó a cabo en pacientes con estadio III clínico, en pacientes con cuatro o más ganglios positivos y en pacientes seleccionadas que tenían entre uno y tres ganglios afectados tras la cirugía.

Después de completar el tratamiento sistémico primario y la cirugía, las pacientes cuyos tumores expresaban RH positivo recibieron tamoxifeno (si la paciente era premenopáusica) o un inhibidor de aromatasa si la paciente era postmenopáusica.

Presentamos los datos de SLE (definida como el tiempo transcurrido entre la cirugía y la primera evidencia de recaída. Entendiendo por recaída: una recurrencia del cáncer de mama a nivel local, regional, contralateral, a distancia o el desarrollo de un segundo tumor primario contralateral) y SG (definida como el tiempo transcurrido entre la cirugía y la muerte).

## **Análisis Estadístico**

Llevamos a cabo un análisis descriptivo de todas las variables. Las variables continuas fueron analizadas utilizando la mediana como valor central y con un intervalo de confianza del 95%.

Las variables dicotómicas o categóricas se determinaron mediante números absolutos y porcentajes.

Se utilizó el test chi-cuadrado con dos colas para realizar comparaciones entre variables categóricas.

Estimamos la SLE y SG para cada grupo mediante el método de Kaplan-Meyer. La comparación entre curvas de supervivencia se realizó mediante el test log-rank. Las diferencias en supervivencia entre grupos se llevó a cabo mediante el test de regresión de Cox. Todos los test estadísticos eran bilaterales y se aplicó un nivel de significación de 0.05.

## **IV RESULTADOS**

### **1.- Características basales**

Un total de 142 pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, estadios I-III que eran candidatas a tratamiento sistémico primario y que se diagnosticaron en nuestro hospital entre los años 2005 y 2016 fueron incluidas en el estudio.

Las características basales de las pacientes se presentan en la tabla 1.

La mediana de edad de las pacientes fue 49 años (30-79), con estadios I, II o III al diagnóstico en 4%, 68% y 28% de ellas, respectivamente.

El 10% de las pacientes tenían un cáncer de mama inflamatorio, el 43% de los tumores eran RH negativo y el 62% de ellos, eran grado III.

En cuanto a la sobreexpresión de HER2 al diagnóstico, en el 90% de los tumores la confirmación de positividad fue determinada por IHQ (expresión proteica 3+) y el resto, por FISH o SISH.

En la segunda parte del estudio, en Marzo de 2019, se llevó a cabo la amplificación del gen HER2 por FISH en cien muestras de la biopsias por aguja gruesa. De estas muestras, el 92% amplificaban y el 8% no.

Se demostró una buena correlación entre el FISH y la IHQ previa. De los tumores que amplificaban, el 92% tenía una expresión IHQ de 3+.

Del 8% de tumores en los que no se demostró amplificación, 5 habían sido diagnosticados como 3+ y 3 tumores como 2+.

Se volvió a repetir la IHQ en el Hospital de Santiago de Compostela y se vio que ninguno tenía una expresión proteica de 3+, cuatro muestras expresaban 2+, dos

muestras +, y en otras dos, la expresión era negativa. Esto confirma la importancia de la ISH y las dificultades conocidas con la IHQ.

El 84% de las pacientes tenían indicación de mastectomía al diagnóstico.

**Tabla 1 Características de las pacientes**

	Número total (%)
<b>Edad, años</b>	
Mediana (Rango)	49 (30-79)
<b>Tumor (cT)*</b>	
Tx	2 (1)
T1	8 (6)
T2	93 (65)
T3	24 (17)
T4	15 (11)
<b>Estado ganglionar</b>	
N0	39 (27)
N1-2	103 (73)
<b>Estadio</b>	
I	6 (4)
II	97 (68)
III	39 (28)
<b>Receptor Hormonal</b>	
RH+	81 (57)
RH-	61 (43)
<b>Test HER2 (1er análisis)</b>	
IHQ <sup>a</sup> 3+	128 (90)
IHQ <sup>a</sup> 2+	14 (10)
FISH/SISH Amplificado	36 (25)
<b>Test HER2 (2º análisis)</b>	
FISH Amplificado	92 (65)
FISH No amplificado	8 (6)
FISH No realizado	42 (29)
<b>Grado</b>	
I	1(1)
II	47 (33)
III	88 (62)
Desconocido	6 (4)
<b>Ki-67</b>	
<20%	24 (17)
20-35%	50 (35)
>35%	68 (48)
<b>Indicación quirúrgica al diagnóstico</b>	
Mastectomía	120 (84)
Tumorectomía	22 (16)

**Nota:** \* Una paciente con un carcinoma lobulillar no medible y otra paciente con un carcinoma oculto de mama .

**Abreviaturas:** cT, tamaño del tumor clínicamente; RH, receptor hormonal, IHQ<sup>a</sup>, inmunohistoquímica, FISH, hibridación in situ con fluorescencia; SISH, hibridación in situ con plata

El 98% de las pacientes completaron los ciclos de tratamiento planeados. El 2% restante (3 pacientes), no pudieron completar la quimioterapia debido a hepatotoxicidad en una paciente, astenia grado III y neutropenia grado II mantenida en otra paciente mayor y, un tromboembolismo pulmonar masivo en la tercera paciente después de cuatro ciclos de quimioterapia.

## **2.- Respuesta Clínica**

La respuesta clínica fue evaluada mediante exploración física, mamografía, ecografía y RNM mamaria.

La exploración física se llevó a cabo de forma basal y cada 3 semanas durante el tratamiento. Las pruebas de imagen se realizaron antes de comenzar el tratamiento y tras la finalización del mismo, muy próximas al momento de la cirugía en la mayoría de las pacientes.

En los primeros años del estudio la RNM mamaria no era una prueba rutinaria por lo que no se realizó en las primeras 18 pacientes.

Debido a que la respuesta clínica por exploración física es subjetiva y no tan precisa y a que no disponíamos de suficientes datos medibles por mamografía, presentamos la RC establecida mediante ecografía y RNM mamaria en la tabla 2.

Un 49% y un 63% de las pacientes obtuvieron una respuesta completa clínica (RC) medida por ecografía y RNM respectivamente.

**Tabla 2 Respuesta Clínica**

<b>Respuesta Clínica (n=142)</b>	<b>n (%) (pacientes evaluables)</b>
<b>Ecografía</b>	
RC	59 (49)
RP	51 (42)
EE	9 (8)
EP	1 (1)
No Evaluable	22 (15)
<b>RNM*</b>	
RC	75 (63)
RP	38 (32)
EE	6 (5)
No Evaluable	23 (16)

**Notas:** \*RNM fue realizada en 124 pacientes; No Evaluable: Enfermedad no medible o no realizada  
**Abreviaturas:** RC: Respuesta Completa; RP: Respuesta Parcial; EE: Enfermedad Estable; EP: Enfermedad Progresiva

### **3.- Cirugía**

Al diagnóstico el 84% de las pacientes tenían indicación de mastectomía. Después del tratamiento neoadyuvante al 66% de las pacientes se les pudo realizar tumorectomía.

La linfadenectomía axilar, BSGC o ningún procedimiento en la axila, se llevó a cabo en el 69%, 22% y 9% de las pacientes, respectivamente.

A aquellas pacientes que tenían una BSGC negativa previa al tratamiento sistémico (10% de las pacientes) no se le realizó ningún procedimiento quirúrgico en la axila en el momento de la cirugía.

#### 4.- Respuesta Patológica

La tasa de RCp definida como la ausencia total de enfermedad invasiva en mama y en axila (ypT0/is ypN0) fue de 51%.

Las tasas de RCp en mama, mama y axila y en diferentes subgrupos de tratamiento se muestran en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3 RCp en Mama y Mama/Axila**

	<b>Mama y axila n (%)</b>	<b>Mama (sin RCp en axila) n (%)</b>
<b>RCp (n=79)</b>	72(51)	7(5)

**Abreviatura:** RCp, respuesta completa patológica

La RCp fue mayor en los carcinomas ductales (53%) que en los lobulillares (14%), en tumores RH negativo (64%) que en los RH positivo (41%), en los grado III (57%) frente a los tumores grado I-II (45%) y en tumores con el valor de Ki-67 > 35 (59%) que los que tenían un valor <20(46%).

**Tabla 4 RCp por Subgrupos**

<b>Respuesta Patológica (n=142)</b>	<b>RCp n (%)</b>	<b>No RCp n (%)</b>
<b>Tamaño del Tumor (RNM)</b>		
</=5 cm	41 (50)	41 (50)
> 5 cm	16 (57)	12 (43)
<b>Ganglios</b>		
Positivos	47 (46)	56 (54)
Negativos	25 (64)	14 (36)
<b>Subtipo Histológico</b>		
Ductal	69 (53)	62 (47)
Lobulillar	1 (14)	6 (86)
Otros	2 (50)	2 (50)
<b>Receptor Hormonal</b>		
RH-	39 (64)	22 (36)
RH+	33 (41)	48 (59)
<b>Ki-67</b>		
<20	11 (46)	13 (54)
20-35	21 (42)	29 (58)
>35	40 (59)	28 (41)
<b>Grado</b>		
I	0 (0)	1 (100)
II	21 (45)	26 (55)
III	50 (57)	38 (43)
<b>Tipos de Quimioterapia</b>		
Pac-T-FEC-T	13 (38)	21 (62)
Pac-T-Myocet-T	44 (54)	37 (46)
Otros	15 (56)	12 (44)

**Abreviaturas:** RCp, respuesta completa patológica.; RNM, resonancia nuclear magnética; RH, receptor hormonal; FEC, 5-fluorouracilo-epirubicina-ciclofosfamida; T, Trastuzumab

En las muestras a las que se le repitió el FISH en la segunda fase del análisis, tratamos de relacionar la tasa de RCp con la amplificación o no del gen HER2 y con los

niveles de amplificación del mismo establecidos mediante el número de copias del gen HER2 y el valor de la ratio gen HER2/CEN17.

Del 8% de estos tumores en los que no se demostró amplificación del gen HER2 ninguno obtuvo RCp.

Del 92% restante que amplificaron, el 58% obtuvo una RCp.

En 4 de ellos se demostró coamplificación. Dos obtuvieron RCp y los otros dos, un grado 3 y 4 de respuesta según Miller & Payne.

A mayor número de copias del gen HER2 y mayor valor de la ratio gen HER2/CEN, mayor tasa de RCp con significación estadística ( $p=0.004$  y  $0.002$  respectivamente) (tabla 5).

**Tabla 5 RCp según niveles de amplificación del gen HER2 (Test Chi-cuadrado-Pearson)**

<b>Respuesta Patológica (n=100)</b>	<b>RCp n (%)</b>	<b>No RCp n (%)</b>
<b>Número de copias del gen HER2 (<math>p=0.004</math>)</b>		
<6	1 (9)	10 (91)
6-10	6 (43)	8 (57)
>10	46 (61)	29 (39)
<b>Ratio genHER2/CEN17 (<math>p=0.002</math>)</b>		
<2	2 (17)	10 (83)
2-5	10 (40)	15 (60)
5-10	25 (58)	18 (42)
>10	16 (80)	4 (20)

**Abreviaturas:** RCp, respuesta completa patológica; FISH, hibridación in situ con fluorescencia CEN17, centrómero del cromosoma 17

Analizamos tres puntos de corte diferentes para el Ki-67 y los relacionamos con la RCp.

Los tumores con un Ki-67>20%, especialmente en aquellos que eran >35%, alcanzaron una mayor tasa de RCp sin significación estadística (p=0.17).

Los tumores grado 3 y que, además, tenían un número de copias>10, obtenían también una mayor tasa de RCp pero sin significación estadística. No se vio relación entre otros factores clínico-biológicos, el grado de expresión de HER2 y la respuesta patológica.

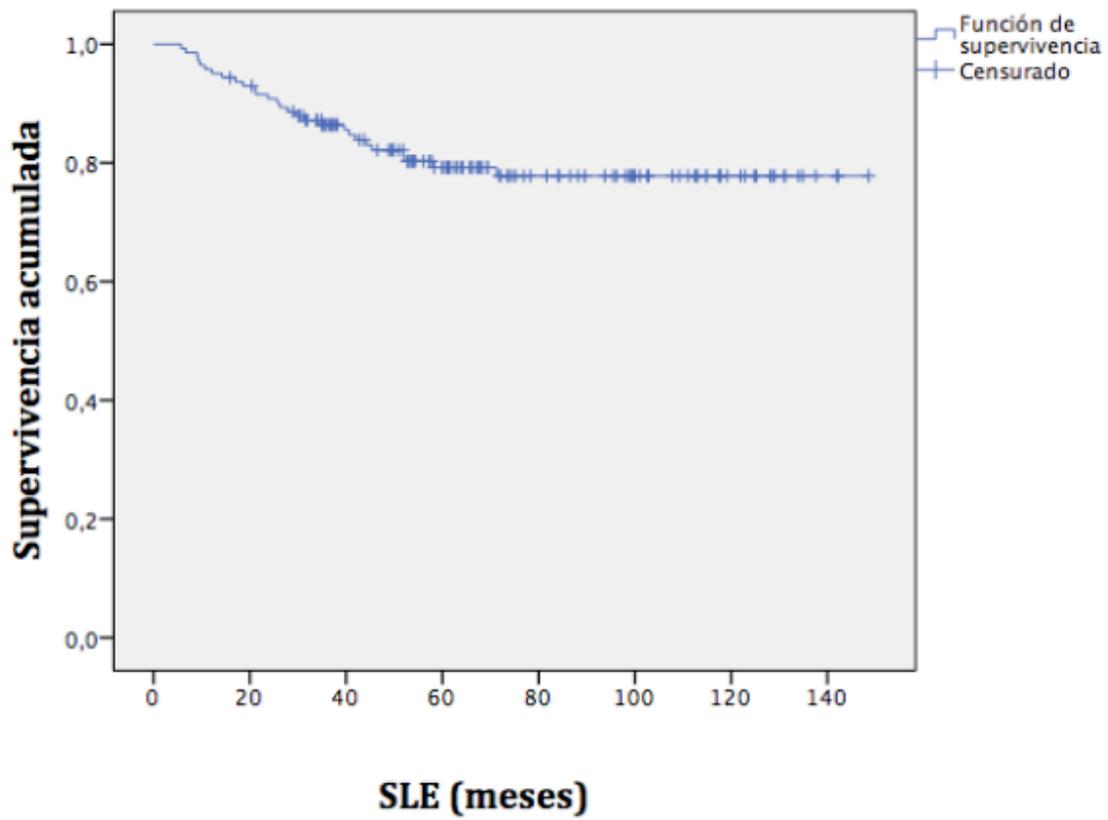
El 61% y 68% de las pacientes que obtuvieron RC clínica medida por ecografía y RNM respectivamente, alcanzaron RCp.

La RCp fue mayor en las pacientes que recibieron paclitaxel-trastuzumab (PT) seguido de *Myocet*/ciclofosfamida/trastuzumab (54%) frente a las que recibieron PT seguido de FEC/trastuzumab (38%), pero el número de pacientes asignado a cada grupo fue pequeño para poder sacar diferencias estadísticamente significativas.

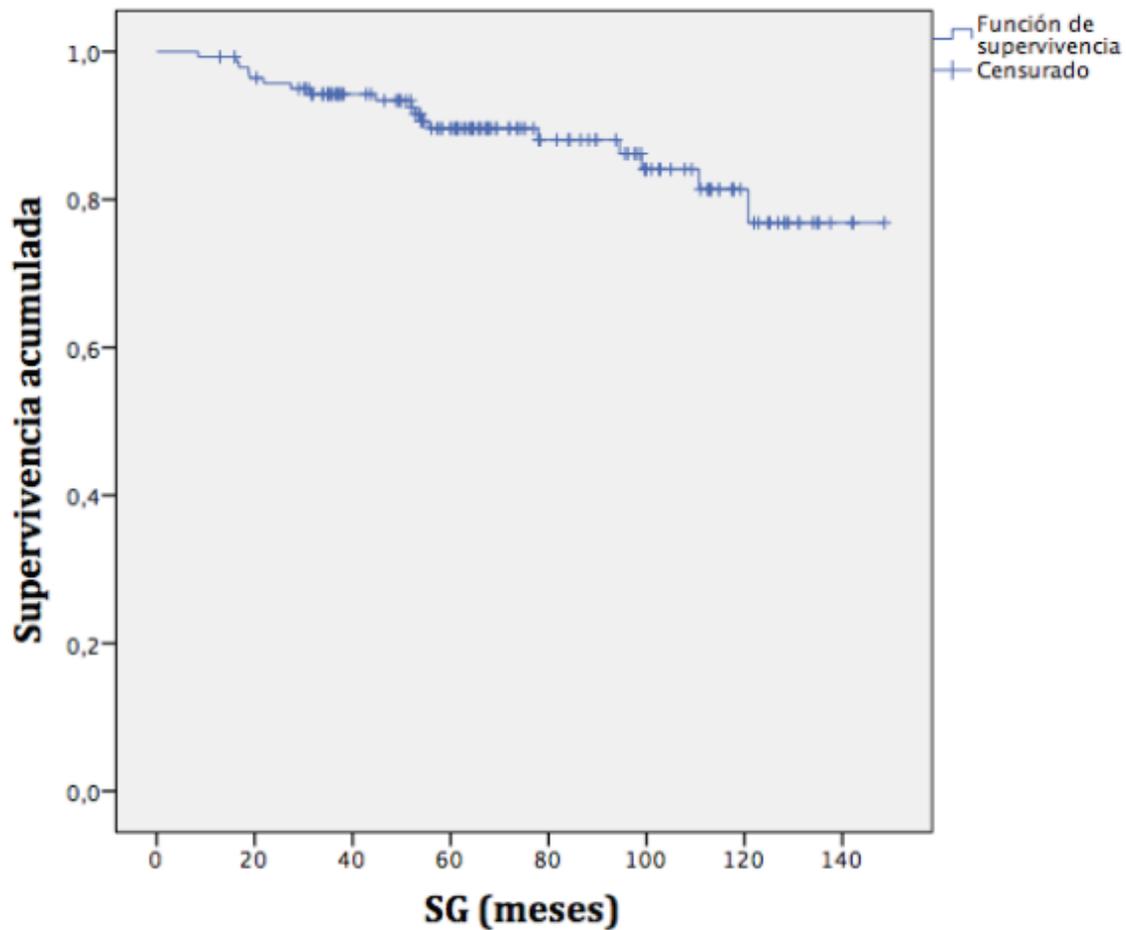
## **5.- Eficacia a largo plazo (SLE y SG)**

En el momento del último análisis en marzo de 2019 y con una mediana de seguimiento de 67 meses, 28 pacientes han sufrido una recaída de la enfermedad (20%) y 18 pacientes fallecieron (13%). Todas las muertes, excepto dos casos, se relacionaron con el cáncer de mama.

Las curvas de SLE y SG se muestran en las figuras 22 y 23, respectivamente.



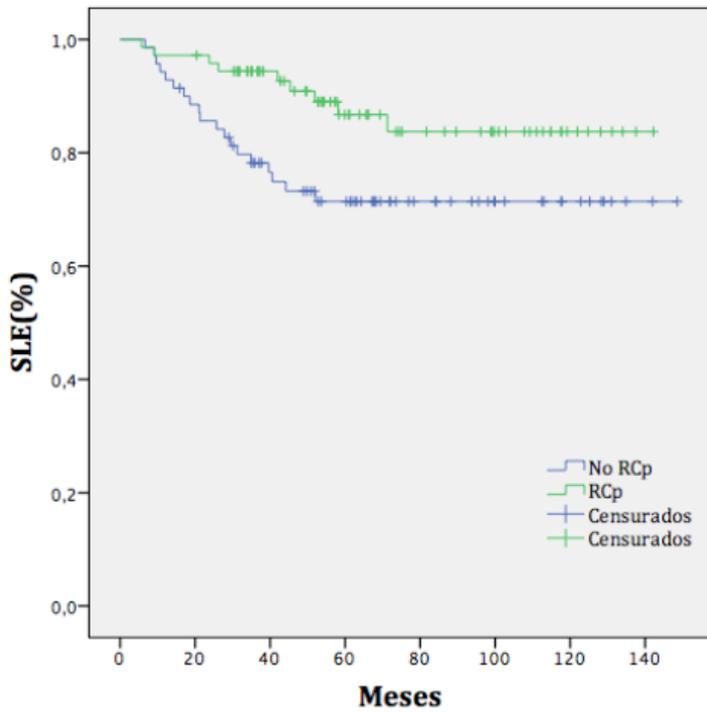
**Fig 22 SLE según el método de Kaplan-Meyer**  
**Abreviatura: SLE, supervivencia libre de enfermedad**



**Fig 23 SG según el método de Kaplan-Meier**  
**Abreviatura: SG, supervivencia global**

Demostramos una asociación entre la RCp y una mejora en la SLE con significación estadística ( $p=0.02$ ) y, una tendencia a mejorar la supervivencia en estas pacientes que alcanzan RCp pero sin significación estadística ( $p=0.12$ ) (figuras 24 y 25).

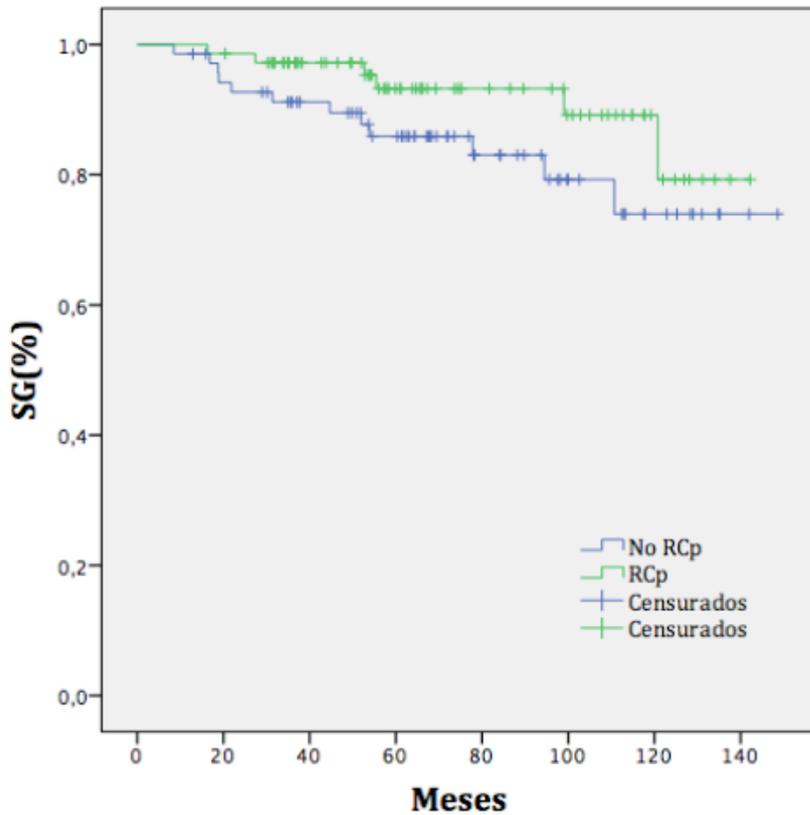
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,846	1	,028



**Fig 24 SLE en función de la respuesta patológica**

**Abreviaturas:** SLE, supervivencia libre de enfermedad; RCp, respuesta completa patológica

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,371	1	,124



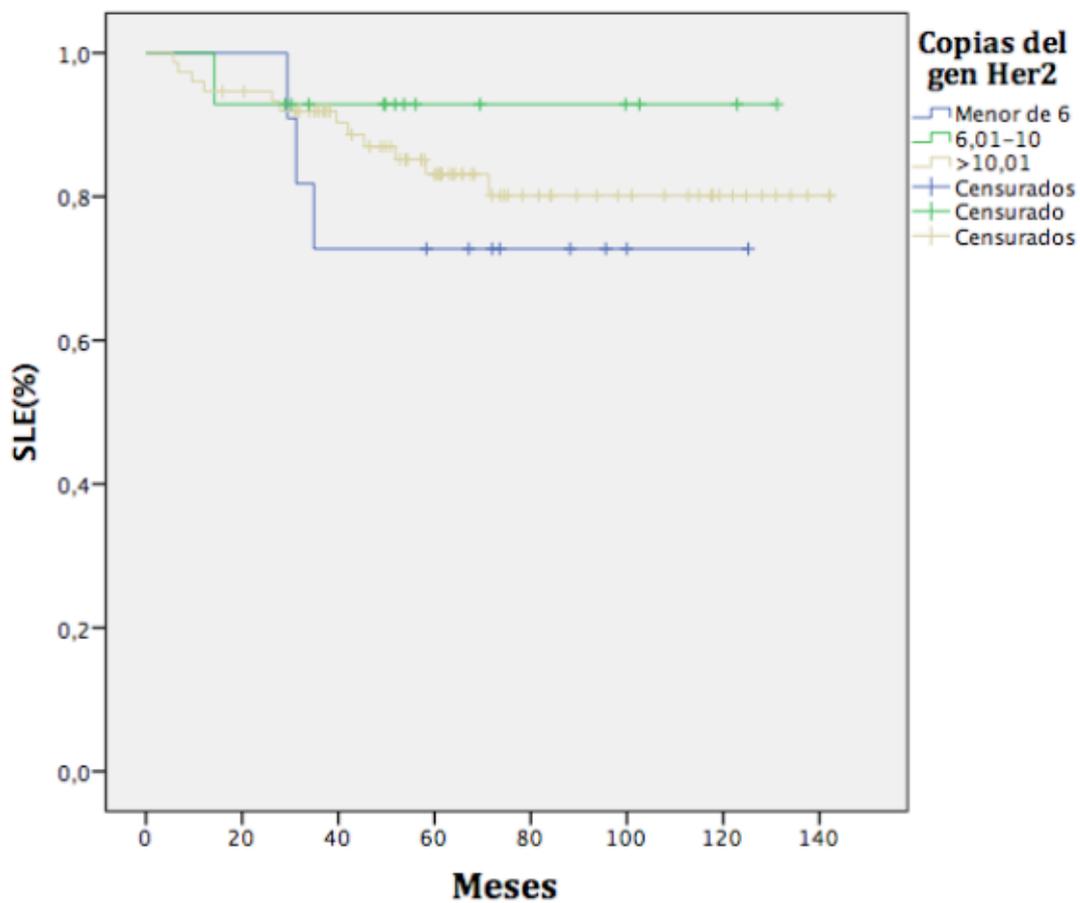
**Fig 25 SG en función de la respuesta patológica**

**Abreviaturas:** SG, supervivencia global; RCp, respuesta completa patológica

Relacionamos también el nivel de amplificación del gen HER2, según el número de copias del gen y según la ratio gen HER2/CEN17, con la supervivencia. Aunque, no pudimos demostrar una asociación estadísticamente significativa entre la supervivencia y los niveles de amplificación. Parece que numéricamente las pacientes cuyos tumores amplifican más recaen menos y viven más (figuras 26-29).

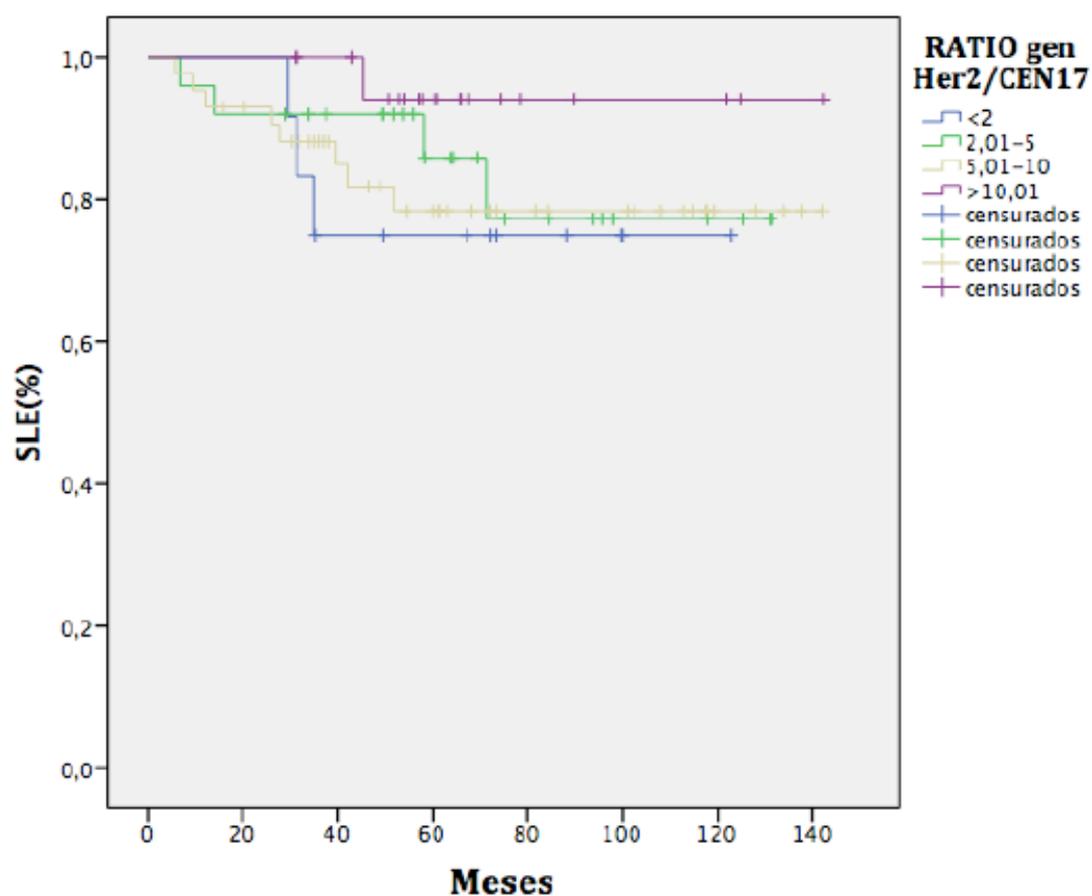
No pudimos establecer una relación entre el resto de factores clínico-patológicos con la supervivencia.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,205	2	,548



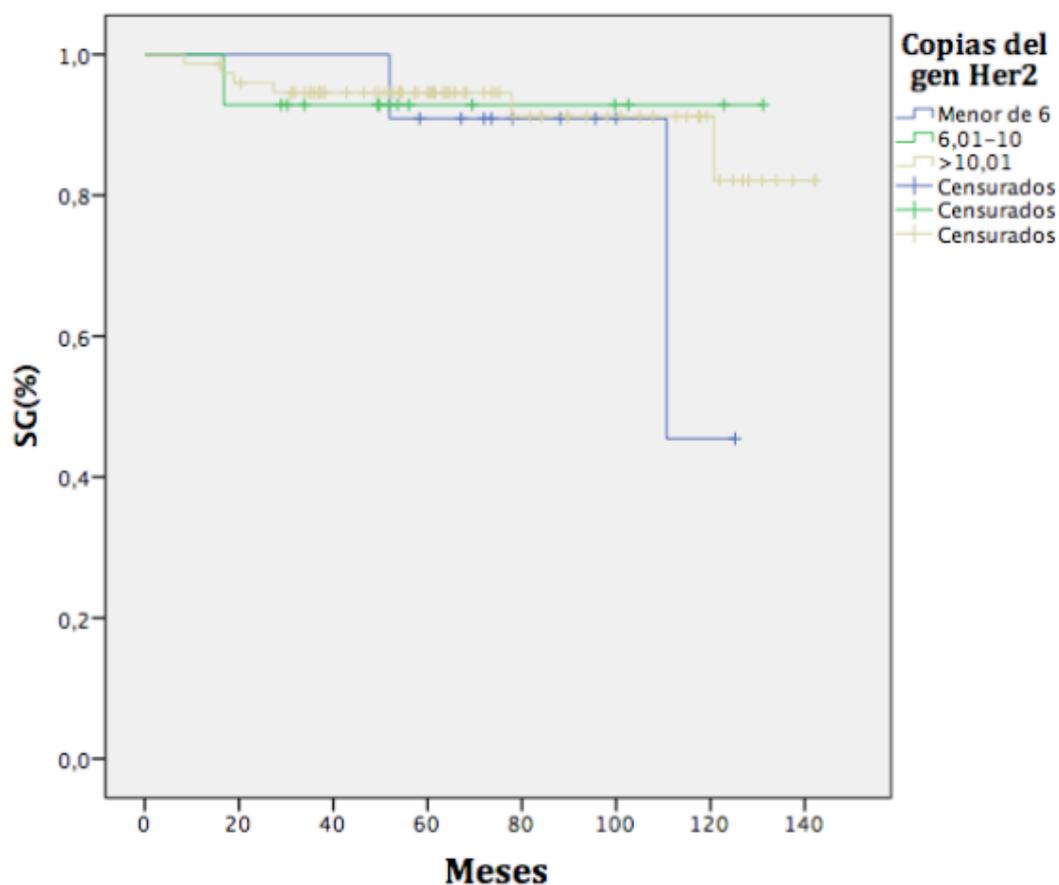
**Fig 26 SLE en función del número de copias del gen HER2**  
**Abreviaturas: SLE, supervivencia libre de enfermedad**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,638	3	,451



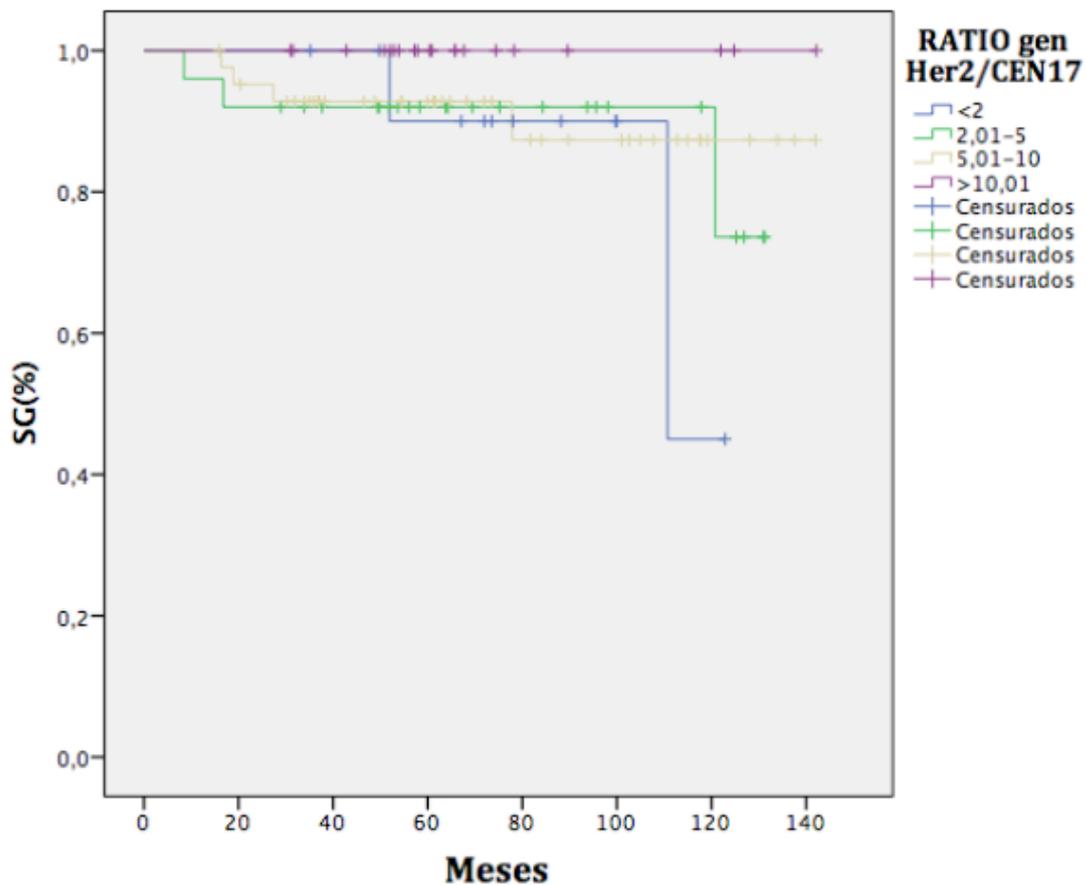
**Fig 27 SLE en función del valor RATIO gen Her2/CEN17**  
**Abreviatura:** SLE, supervivencia libre de enfermedad;  
**CEN17,** centrómero del cromosoma 17

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,959	2	,619



**Fig 28 SG en función del número de copias del gen HER2**  
**Abreviatura: SG, supervivencia global**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,696	3	,441



**Figura 29 SG en función del valor RATIO gen Her2/CEN17**  
**Abreviatura:** SG, supervivencia global; CEN17, centrómero del cromosoma 17

## **6. Cardiotoxicidad**

Debido a la potencial cardiotoxicidad asociada a las antraciclinas y trastuzumab, fue muy importante durante el estudio conocer y manejar los diferentes factores de riesgo cardiovascular de las pacientes y monitorizar la función cardiaca.

La edad al diagnóstico, el índice de masa corporal (IMC), la hipertensión arterial, la dislipemia, la existencia de enfermedad cardiovascular previa al diagnóstico de cáncer o el haber recibido previamente radioterapia son factores de riesgo cardiovascular conocidos en pacientes con cáncer de mama que se trataron con antraciclinas y trastuzumab.

Los factores de riesgo para desarrollar un evento cardiaco en esta cohorte de pacientes se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6 Factores de riesgo cardiovascular**

<b>Factores de riesgo cardiovascular Basales</b>	<b>Número total, n (%)</b>
<b>Edad al diagnóstico</b>	
<50	77 (54)
50-59	31 (22)
≥ 60 years	34 (24)
<b>IMC Basal*</b>	
<25	60 (42)
25-30	47 (33)
>30	35 (25)
<b>Hipertensión Arterial con medicación antihipertensiva activa</b>	
Sí	30 (21)
No	112 (79)
<b>Dislipemia</b>	
Sí	24 (17)
No	118 (83)
<b>Radioterapia sobre mama Izquierda</b>	
Si	78 (55)
No	64 (45)
<b>Tipo de Antraciclina</b>	
Epirrubicina	34 (24)
Doxorrubicina Liposomal	86 (61)
Doxorrubicina Clásica	22 (15)

**Abreviaturas:** IMC, índice de masa corporal

Al diagnóstico, todas las pacientes tenían una adecuada función cardiaca con una FEVI>50% medida por ecocardiograma.

El ecocardiograma se repitió después de la quimioterapia y durante el seguimiento, al menos 6-12 meses después de haber terminado el trastuzumab adyuvante, en el 70 y 72% de las pacientes respectivamente.

Al finalizar el tratamiento quimioterápico, cinco pacientes presentaron una reducción de la FEVI<50% (3.5% de las pacientes). Los factores de riesgo cardiovascular en estas pacientes se detallan en la tabla 7.

**Table 7 Factores de riesgo cardiovascular en las pacientes que sufrieron un descenso de la FEVI < 50%**

	Edad al diagnóstico	IMC>25	Hipertensión Arterial	Dislipemia	Radioterapia sobre mama izquierda	Tipo de Antraciclina
<b>Paciente 1</b>	57	No	No	No	No	Epirubicina
<b>Paciente 2</b>	44	Sí	No	No	Sí	Myocet
<b>Paciente 3</b>	54	Sí	Sí	No	Sí	Myocet
<b>Paciente 4</b>	73	Sí	Sí	No	Sí	Myocet
<b>Paciente 5</b>	63	No	No	No	Sí	Myocet

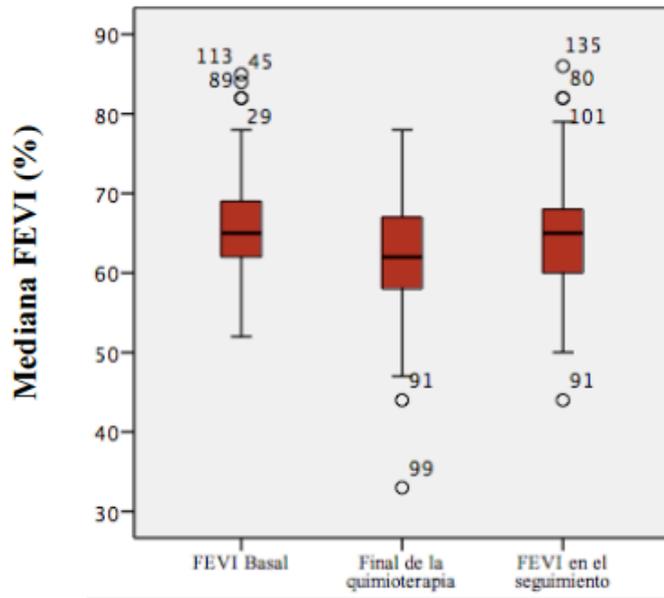
**Abreviaturas:** IMC, índice de masa corporal

De estas pacientes, cuatro no mostraron síntomas de insuficiencia cardiaca y recuperaron rápidamente la fracción de eyección después de haber suspendido temporalmente el trastuzumab. Una paciente no recibió trastuzumab adyuvante. Tres pacientes habían recibido radioterapia sobre la mama izquierda y dos tenían una historia de hipertensión arterial previa.

La quinta paciente que sufrió una disminución de la FEVI < 50% no recibió trastuzumab adyuvante y desarrolló en los años sucesivos una disfunción severa del ventrículo izquierdo.

Esta paciente tenía un elevado IMC y recibió radioterapia sobre la mama izquierda que son factores conocidos de riesgo de enfermedad cardiovascular.

La FEVI basal, al finalizar la quimioterapia y más de seis meses después de finalizar el trastuzumab adyuvante se representan en la figura 30.



**Figura 30 FEVI Basal, final de la quimioterapia y FEVI en el seguimiento**  
**Abreviatura:** FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo

## V DISCUSIÓN

El tratamiento sistémico primario en cáncer de mama precoz HER2 positivo es un tratamiento estándar y afianzado en la práctica asistencial.

Las pacientes se benefician del mismo favoreciendo cirugías conservadoras, aumento de tasas de respuestas patológicas y beneficios en supervivencia a largo plazo.

Supone también un buen escenario para ver el comportamiento in vivo de los tumores y establecer nuevas hipótesis y líneas de investigación.

Asimismo, es una práctica que requiere la participación estrecha y coordinada de varias disciplinas médicas ( radiodiagnóstico, anatomía patológica, cirugía, oncología médica y radioterápica).

Por todos estos motivos el análisis de esta serie de pacientes, diagnosticadas, tratadas homogéneamente, operadas y seguidas a largo plazo en nuestra unidad supone una fuente muy rica de información, aprendizaje y autocrítica con el objetivo de mejorar en el manejo y evolución de nuestras pacientes. Son datos de la vida real, términos muy en auge en la actualidad, que permiten confirmar o no la evidencia aportada por los ensayos clínicos no sólo en oncología sino en las diferentes áreas de la medicina que participan en el proceso.

Dada la incidencia del subtipo HER2 positivo que supone un 15-20% de todos los cánceres de mama, las campañas de screening y la concienciación de la mujer y la sociedad sobre el cáncer ha hecho que el diagnóstico de la enfermedad en estadios II-III sea cada vez menor. Por ello una serie de 142 pacientes en un único centro hospitalario en esta indicación es un buen número para el análisis de resultados.

El primer hándicap en este subtipo de cáncer de mama ocurre pronto y se encuentra al diagnóstico. Como hemos visto, la determinación de la sobreexpresión

proteica o amplificación del gen HER2 por parte del patólogo es crucial para la eficacia del tratamiento.

Aunque la FDA ha aprobado tanto la IHQ como la ISH como métodos de medida válidos para la determinación de positividad de HER2, sabemos que la ISH es un método más fiable y preciso. Las pacientes incluidas en los ensayos clínicos en cáncer de mama metastásico HER2 positivo tenían más respuestas cuando la expresión se había medido por FISH que cuando se había realizado con IHQ.<sup>290</sup>

En nuestra serie, al igual que en otras de esa época, la expresión de HER2 se midió en la mayoría de las pacientes por IHQ dejando la ISH para los casos dudosos y realizándose sólo en 36 pacientes.

Por éste motivo quisimos repetir a posteriori el FISH en las muestras de la biopsia diagnóstica, en aquellas de las que disponíamos de material, en un centro diferente al nuestro, de referencia para la determinación de HER2. Dispusimos de 100 muestras y vimos que el 92% de ellas amplificaban HER2.

Este nivel de concordancia alto nos lleva a la conclusión de que la IHQ al diagnóstico fue realizada y valorada de forma correcta por parte de nuestros patólogos.

Press en el año 2005 publica una serie de 2600 pacientes que se incluyeron en ensayos clínicos del BCIRG y comparó la determinación de HER2 (por IHQ y FISH) realizada en laboratorios locales frente a la llevada a cabo (por FISH) en dos laboratorios de referencia a nivel central.

Vio que el nivel de concordancia era mayor (92%) cuando las determinaciones se habían realizado por FISH en los laboratorios locales que cuando se llevaron a cabo por IHQ en estos mismos centros (79%).<sup>291</sup>

En nuestro caso el nivel de concordancia entre la expresión por IHQ y por FISH fue alto. Del 92% de las pacientes cuyos tumores amplificaban, el 92% tenía una expresión IHQ de 3+.

El grado de concordancia entre la IHQ y el FISH que existe en la literatura tanto en adyuvancia en 104 muestras del estudio B-31<sup>292</sup> o en enfermedad metastásica donde se analizaron 623 muestras de pacientes que participaron en tres estudios pivotaes de trastuzumab<sup>293</sup> fue del 82%.

Owens publica una serie donde analiza 6556 muestras y ve que el grado de concordancia entre la IHQ y el FISH es del 92%<sup>294</sup>, similar al observado por nosotros.

En cuanto al grado de discordancia entre la IHQ y el FISH, la explicación que dan los autores es que la determinación por IHQ es menos reproducible que el FISH ya que depende de diferentes formas de procesar el tejido, distinta metodología para la realización de la IHQ y a que, la interpretación de los resultados es subjetiva.

Los mayores grados de discordancia ocurren con los HER2 2+ considerados en su mayoría por estos autores como resultados falsos positivos.

En nuestra serie, del 8% de tumores en los que no se demostró amplificación, 5 habían sido diagnosticados como 3+ y 3 tumores como 2+ en nuestro hospital.

En el segundo análisis, al repetir la IHQ en estas muestras se vio que ninguna tenía una expresión de 3+ (cuatro resultados 2+ y cuatro 0/1+ a partes iguales).

## **PRIMER OBJETIVO DEL ESTUDIO: EFICACIA DEL TRATAMIENTO**

La primera forma que tenemos en neoadyuvancia para ver que un tratamiento es eficaz es que el tumor reduzca su tamaño. No todos los métodos de medida que utilizamos para ver esta respuesta clínica son igual de eficaces. La exploración física es

muy subjetiva y no reproducible. La mamografía convencional no delimita bien el tamaño, no distingue bien zonas de fibrosis o cambios atribuibles a la quimioterapia y no es capaz de discernir entre malignidad o benignidad de las microcalcificaciones. La ecografía, aunque es un método óptimo para delimitar el tamaño y ver de forma eficaz la afectación o no de los ganglios axilares, tampoco es reproducible dada la subjetividad de la misma.<sup>260</sup>

La RNM ha demostrado ser superior a la mamografía y la ecografía en la valoración de la extensión del tumor al inicio del tratamiento y en la valoración del tumor residual tras la neoadyuvancia.<sup>125,126</sup>

En nuestra serie vimos que el grado de predicción de respuestas patológicas completas fue alto con la ecografía y RNM. Así, el 61 y 65% de los tumores que alcanzaron respuesta completa clínica por ecografía y RNM respectivamente, obtuvieron una RCp, percibiendo por tanto una leve superioridad de la RNM en este contexto.

En cuanto a la respuesta patológica sabemos que es un parámetro que predice mejor que la respuesta clínica la eficacia del tratamiento y la evolución posterior de las pacientes.

Nuestra tasa de RCp, considerada ésta como ausencia de enfermedad invasiva tanto en mama como en axila, fue del 51%. Si a este porcentaje le añadimos el 5% de las pacientes que hicieron RCp en mama y a las que no se realizó ningún procedimiento en axila en el momento de la cirugía por ser clínica y patológicamente N0, tras practicar la BSGC antes de iniciar el tratamiento sistémico primario, la tasa de RCp asciende al 56%.

Esta tasa de RCp es elevada y comparable a otros estudios dónde se emplearon los mismos esquemas de tratamiento de quimioterapia (antraciclina y taxanos) asociados a trastuzumab.

En el estudio fase III de Buzdar<sup>295</sup> se analiza la administración de FEC y paclitaxel con trastuzumab, administrado éste último en combinación con el taxano o concurrente con la antraciclina y el taxano, obteniendo unas tasas de RCp del 56 y 54% respectivamente. Los autores concluyen que, administrar de forma concurrente el trastuzumab con la antraciclina no aporta mayor beneficio y, como veremos más adelante, sí un riesgo mayor de cardiotoxicidad.

En este sentido, la mayor tasa de RCp observada con respecto a nuestra serie puede deberse a que en ese estudio la respuesta patológica sólo se mide en la mama (objetivo primario), mientras que nuestra definición de RCp es más restrictiva. Por otro lado, el concluir que la antraciclina administrada de forma concurrente con trastuzumab no aporta beneficio en base a un solo estudio y siendo la respuesta patológica un objetivo intermedio, es anticipado. Habrá que esperar a ver beneficio a largo plazo y el efecto que tiene en la cardiotoxicidad con el tiempo.

En nuestra serie, por este motivo y para disminuir el posible daño cardiaco utilizamos antraciclinas menos cardiotóxicas como son la epirrubicina (igual que en el estudio de Buzdar) y la doxorubicina liposomal<sup>277</sup>. Así, 34 pacientes fueron tratadas con epirrubicina y 81 pacientes con *Myocet* alcanzando una mayor tasas de RCp éstas últimas (38% y 54% respectivamente). Sin embargo, el número de pacientes asignados a cada grupo es pequeño para sacar conclusiones estadísticamente significativas.

En otras series similares a la nuestra como las publicadas por Buzdar<sup>205</sup> o Pernas<sup>296</sup> en las que también se utilizó FEC como parte del tratamiento, las tasas de RCp fueron superiores a las observadas por nosotros, 65.2% y 61.4%, respectivamente. Esto puede deberse a diferentes factores: Buzdar incluyó 42 pacientes con un elevado porcentaje de estadios I-II, ninguno presentaba cáncer de mama inflamatorio y el sistema de valoración de respuesta patológica fue el del MDACC, menos validado.

Pernas incluyó 83 pacientes, el 77% y 71% eran tumores con expresión negativa para RH y grado 3 respectivamente frente al 43% y 27% de nuestra serie, lo que confiere mayor probabilidad de respuesta al tratamiento.

Existe poca evidencia que apoye el uso de antraciclinas liposomales en neoadyuvancia. La mayoría de las series las utilizan de forma concomitante con los taxanos en vez de secuencial y un mayor número de ciclos.<sup>297-300</sup>

En otros estudios publicados que utilizaron también antraciclinas, taxanos y trastuzumab, las tasas de RCp fueron menores (32-45%).<sup>206,207,301,302</sup> En ellos, el trastuzumab no siempre se administraba de forma concurrente con la antraciclina y la definición de RCp no incluía la valoración conjunta de mama y axila.

Con la introducción del doble bloqueo con pertuzumab y trastuzumab asociado a quimioterapia las tasas de RCp han aumentado, con cifras entre el 45-66%. Los diferentes estudios utilizan de forma distinta el doble bloqueo. En el estudio Neosphere que motivó la aprobación en neoadyuvancia HER2 se asocia sólo al taxano. La antraciclina se da después de la cirugía y sin asociarla a terapia antiHER2. La tasa de RCp en la población por intención de tratar fue del 46%. Es de destacar en este estudio un 17% de RCp en las pacientes que recibieron sólo terapia dirigida sin quimioterapia. Si a priori pudiéramos identificar a esas pacientes, conseguiríamos un gran beneficio a expensas de baja o nula toxicidad al no precisar quimioterapia.<sup>214</sup>

El estudio Tryphaena (ensayo clínico fase II) analizó la administración secuencial de antraciclina y taxano ambos con doble bloqueo, con otra rama de antraciclina sin terapia antiHER2, seguida de taxano más terapia antiHER2 y un tercer brazo de platino y taxano más terapia antiHER2 sin antraciclina.<sup>216</sup> Toda la quimioterapia se administró antes de la cirugía. El objetivo primario del estudio fue

cardiotoxicidad pero las tasas de RCp, objetivo secundario del estudio, fueron muy altas, llegando al 66%.

En estos dos estudios la respuesta patológica se medía exclusivamente en la mama. Definiciones más restrictivas como la utilizada en nuestra serie teniendo en cuenta también la axila, probablemente haría que el porcentaje de RCp disminuyera.

Un estudio de similar diseño al Tryphaena fue el Berenice, estudio fase II no randomizado que analizó la secuencia de la antraciclina clásica a dosis densas con paclitaxel frente a FEC seguido de docetaxel y el doble bloqueo con pertuzumab y trastuzumab de forma concomitante con el taxano en ambos brazos. Se observaron unas elevadas tasas de RCp (61,8% y 60,7% respectivamente), superiores a las alcanzadas en el estudio Neosphere y con buen perfil de seguridad a nivel cardíaco.<sup>303</sup>

Con estos estudios y los diferentes esquemas administrados de quimioterapia se vuelve a abrir el debate de la necesidad o no de las antraciclinas como parte del tratamiento. En el ensayo clínico fase III holandés de Van Ramshorst se analizan 438 pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, estadios II-III en neoadyuvancia con 2 brazos de tratamiento. Uno con antraciclina (3 ciclos de FEC seguido de 6 ciclos de carboplatino y paclitaxel) frente a otro sin ella (9 ciclos de carboplatino y paclitaxel) y ambos con pertuzumab y trastuzumab administrados de forma concomitante con la quimioterapia desde el inicio en ambos brazos. Se vio que las tasas de RCp (ausencia de enfermedad invasiva en mama y axila medidas según las guías nacionales holandesas) fueron elevadas y similares con ambos esquemas, 67% y 68% respectivamente. Aunque el seguimiento es corto (19 meses) los autores concluyen que quizás con el doble bloqueo se podría prescindir de la antraciclina en pacientes seleccionadas, en las que pudiéramos disponer de marcadores predictores de beneficio o de cardiotoxicidad por antraciclinas.<sup>304</sup>

El doble bloqueo con lapatinib y trastuzumab asociado a quimioterapia ha sido analizado en diferentes estudios observándose un aumento de las tasas de RCp frente a la monoterapia con terapia dirigida y quimioterapia.

En el estudio fase III NeoALTTO <sup>208</sup>, paclitaxel se combina con trastuzumab, lapatinib o la combinación, antes de la cirugía, administrando la antraciclina tras la misma. A pesar de alcanzarse tasas de RCp más altas con la combinación (51%) frente a las monoterapias (29 y 25%) se observó una mayor toxicidad secundaria al Lapatinib consistente en diarrea o alteración de las enzimas hepáticas.

Tras un seguimiento de 3,7 años, no se observan diferencias significativas tanto en la SLE como en la SG de las pacientes.<sup>282</sup>

Otros estudios más pequeños con Lapatinib como parte del doble bloqueo que utilizan antraciclinas y taxanos de forma secuencial previamente a la cirugía como el B-41, CHER-LOB o GeparQuinto demuestran tasas elevadas de RCp pero no hay datos publicados de beneficio a largo plazo.<sup>209-211</sup>

Con todos estos datos sabemos que el doble bloqueo con pertuzumab, trastuzumab y un taxano es un estándar en neoadyuvancia HER2 positiva pero nos quedan dudas de cuál es el papel de las antraciclinas, su beneficio a largo plazo y qué pacientes serán candidatas a desescalar tratamiento y poder obtener una RCp sólo con terapia dirigida sin quimioterapia.

En este sentido, datos publicados recientemente con un seguimiento a 3 años del ensayo clínico fase III KRISTINE<sup>305</sup> en el que se comparaban dos esquemas de tratamiento sin antraciclina, T-DM1 con pertuzumab por un lado y docetaxel, carboplatino con trastuzumab y pertuzumab, por otro, se vio que las pacientes que recibían T-DM1 tenían una SLE menor y presentaban más recaídas antes de la cirugía, aunque tenían un intervalo libre de enfermedad a distancia similar a las pacientes del

otro brazo. En este estudio el tratamiento adyuvante en cada grupo se realizaba con TDM-1 y pertuzumab por un lado y, con pertuzumab más trastuzumab por otro, ambos durante un año. Los autores concluyen que es muy importante poder seleccionar a aquellas pacientes que se benefician de esquemas convencionales de quimioterapia en neoadyuvancia HER2 positiva.

Otro de los objetivos de nuestro trabajo fue ver qué número de pacientes podían ser rescatadas para cirugía conservadora teniendo la indicación de mastectomía al diagnóstico.

La indicación de mastectomía al diagnóstico fue elevada en nuestra serie (84%). Esto puede explicarse debido a la incidencia de tumores cT3 y cT4 y a la relación entre tamaño del tumor y tamaño de la mama en los tumores cT2.

Después del tratamiento neoadyuvante la tasa de cirugía conservadora fue elevada en nuestra serie, 66% de las pacientes, en comparación con otras series publicadas más antiguas y en población HER2 no conocida.<sup>306-308</sup>

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de pacientes registradas en la base de datos nacional americana del cáncer, que habían recibido neoadyuvancia, para valorar la tasa de cirugía conservadora tras la misma. Se analizaron 59.063 casos que recibieron tratamiento desde el año 2006 al 2011. Se vio que ajustando por factores como edad, grado histológico, RH negativo y tamaño del tumor, aquellas pacientes que tenían al diagnóstico tumores mayores de 3cm y recibían neoadyuvancia, tenía una mayor tasa de cirugías conservadoras <sup>62</sup> frente a las pacientes en las que se realizaba cirugía primaria. Esta serie no aporta datos en población HER2 positiva.<sup>309</sup>

En los estudios en los que se aportan datos de cirugía, ya en población específica HER2 positiva tratadas con quimioterapia y trastuzumab o lapatinib, las tasas de cirugía

conservadora aumentan y oscilan entre el 50-64%.<sup>205,209,301</sup> Con el doble bloqueo y quimioterapia pueden llegar al 69%<sup>208,210</sup>

Esto lo atribuimos a la elevada tasa de RCp en esta población de pacientes HER2 positivas.

En cuanto a la cirugía conservadora tras el tratamiento sistémico primario se ha publicado en algunos estudios y meta-análisis el posible aumento de recidivas locales en este contexto.<sup>183,310,311</sup>

En la experiencia del MD Anderson se sugiere que el aumento de recidivas locales puede estar relacionado con otros factores biológicos como la afectación ganglionar cN2 o cN3, la invasión linfo-vascular, que la enfermedad residual tenga una distribución multifocal o debido a tumores residuales mayores de 2 cm en vez de relacionarse con el momento en que se pone la quimioterapia.<sup>312,313</sup>

Actualmente con una mejor selección de las pacientes y la participación de equipos multidisciplinares bien coordinados, la tasa de recidivas locorregionales asociada a la cirugía conservadora tras neoadyuvancia se ha equiparado a la que ocurre tras cirugía primaria.<sup>314</sup>

Por último, dentro de este primer objetivo de eficacia del tratamiento evaluamos si las pacientes que hacían RCp vivían más tiempo sin recaer o morir.

Como sabemos, en cáncer de mama HER2 positivo la RCp se relaciona con una mayor SLE y SG, según el metaanálisis de Broglio que incluye a 5500 pacientes con este subtipo tumoral.<sup>315</sup>

Pudimos demostrar en nuestra serie una asociación entre la RCp y una mejora en la SLE ( $p=0.02$ ) y una tendencia a mejorar la SG ( $p=0.12$ ).

La ausencia de asociación estadísticamente significativa entre la RCp y la SG puede explicarse por el número bajo de muertes en el momento del análisis de los datos

y por la mejora en los tratamientos para el cáncer de mama metastásico HER2 positivo. Ninguna de las pacientes en nuestra serie recibió pertuzumab como parte del tratamiento neoadyuvante.

Esta relación entre RCp y mejora en la SLE que observamos en nuestras pacientes a nivel individual no se puede extrapolar a la RCp obtenida en un ensayo clínico concreto. En este último caso, la RCp no puede usarse como objetivo subrogado de beneficio a largo plazo y es necesario en estos estudios un tiempo de seguimiento largo para demostrar supervivencia.<sup>316</sup>

## **SEGUNDO OBJETIVO DEL ESTUDIO: RELACIONAR DIFERENTES ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS CON LA EFICACIA**

Identificamos cuatro factores biológicos relacionados con una mejor respuesta al tratamiento: los RH negativos, el Ki67>20%, el grado 3 y el nivel de expresión del gen HER2.

La mayor tasa de RCp observadas en los tumores RH negativo frente a los tumores RH positivo ( $p=0.006$ ) se ha visto en otras series y estudios en el tratamiento neoadyuvante de los tumores HER2 positivos.<sup>214</sup> Esto puede ser debido a la resistencia cruzada entre la vía HER2 y la del receptor de estrógeno lo que confiere resistencia a las terapias dirigidas a cada una de ellas.<sup>206,212,214,282</sup>

El valor del Ki-67 como factor pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento se ha definido en diferentes estudios<sup>78,317</sup>, pero existe controversia sobre cuál es el mejor método para medirlo y estandarizarlo, cuál es el punto de corte óptimo que pueda predecir mejor qué tumores van a responder al tratamiento, si este punto de

corte es similar para los diferentes subtipos biológicos y si el Ki-67 que medimos en la biopsia por aguja gruesa es representativo de lo que ocurre en el resto del tumor.<sup>87,318</sup>

Un punto de corte del Ki-67 de 20 puede ser un factor pronóstico estadísticamente significativo para los subtipos luminales B HER2 negativos. Sin embargo, para los tumores triple negativos y HER2 positivos este punto de corte pronóstico o predictor de respuesta, es más elevado. Así se han publicado valores medios de Ki-67 desde un 35 a un 40% para tumores HER2 positivos y de hasta un 50% para los triple negativos.<sup>319,320</sup>

En nuestra serie analizamos tres puntos de corte diferentes para el Ki-67 y los relacionamos con la RCp, la SLE y la SG.

Los tumores con un Ki-67>20%, especialmente en aquellos que eran >35%, alcanzaron una mayor tasa de RCp sin significación estadística ( $p=0.17$ ) y ningún grupo demostró beneficio a largo plazo en supervivencia.

En nuestra serie no encontramos un punto de corte óptimo del Ki-67 que nos sirva para valorar respuesta a tratamiento si no que, el Ki-67 debe ser tomado como un valor continuo y en el caso de los tumores HER2 positivos que son agresivos y frecuentemente presentan índices de proliferación elevados, a mayor Ki-67 mayor probabilidad de respuesta al tratamiento. La falta de asociación estadísticamente significativa con la RCp en nuestra serie puede ser debido al pequeño número de casos en cada grupo.

La correlación entre el grado histológico y el pronóstico ha sido confirmada en múltiples estudios y ayuda a los clínicos a la toma de decisiones terapéuticas.<sup>76,81,321-324</sup> Su valor como factor independiente predictor de respuesta al tratamiento neoadyuvante no está tan claro.<sup>325,326</sup> En nuestra serie los tumores grado III obtuvieron una tasa mayor de RCp que los tumores grado I-II sin significación estadística ( $p=0.23$ ).

En cuanto a los niveles de expresión de la proteína o amplificación de gen HER2 y su relación, tanto con la respuesta a la terapia antiHER2 como con la supervivencia de las pacientes, existen datos controvertidos en la literatura.

En cáncer de mama metastásico existe una relación clara. Ya desde el primer estudio de Slamon, que motivó la aprobación de trastuzumab con taxano, se vio que los tumores que tenía una expresión de HER2 3+ respondían mejor que los que tenían expresión proteica de 2+<sup>204</sup>. La relación entre los niveles de expresión proteica con la supervivencia se comprobó posteriormente en otras series.<sup>327</sup>

En cuanto al nivel de amplificación del gen se vio también en diferentes estudios publicados que a mayor intensidad en la amplificación existía mayor número de respuestas, y esto se relacionaba con beneficio a largo plazo en mejoras en la SLE y SG.<sup>328-330</sup>

En adyuvancia HER2 positiva también se quiso relacionar la intensidad de expresión o los niveles de amplificación del gen Her 2 con el beneficio de trastuzumab a corto y largo plazo. Los resultados en los estudios publicados no demuestran una asociación positiva entre ambos.

Así en el estudio fase III N9831, donde se analizaba el papel de adriamicina y ciclofosfamida seguida de paclitaxel con o sin trastuzumab en población HER2 positiva de alto riesgo, se estudió en cerca de 1000 pacientes la expresión de HER2 mediante la realización del test de 21 genes, Oncotype DX. Se vio que los diferentes niveles de expresión de HER2 no tenían relación con el beneficio de trastuzumab medido como supervivencia libre de recurrencia a distancia aunque sí se vio beneficio en los tumores RH positivo incluidos en esta población HER2 positiva. Los autores no encuentran una explicación clara al respecto. Las hipótesis que barajan son que estas pacientes obtienen un gran beneficio de la terapia endocrina, que suelen ser tumores más resistentes a

trastuzumab o que existe una interacción entre la quimioterapia, la terapia endocrina y la antiHER2.<sup>331</sup>

En el estudio HERA en adyuvancia tampoco se pudo demostrar una asociación entre los niveles de amplificación de HER2 (Ratio HER2/CEN17, número de copias del gen HER2 o la polisomía del 17) con los beneficios de trastuzumab administrado después de la quimioterapia durante 1 año. Los autores concluyen que la amplificación del gen HER2 puede llevar consigo la amplificación de otros genes como el TOP2A que puede tener un papel en la sensibilidad de los tumores a las antraciclinas, enmascarando ésto la relación entre la amplificación del gen HER2 y el pronóstico.<sup>332</sup>

En este mismo estudio HERA se quiso ver si el nivel de expresión de HER2 a nivel proteico tenía relación con el beneficio de trastuzumab en cuanto a SLE. Se vio que no existía asociación.<sup>333</sup>

Si nos centramos en la neoadyuvancia HER2 positiva, ya en los primeros estudios como el de Burstein y colaboradores en donde paclitaxel y trastuzumab se administraban previamente a la cirugía en cáncer de mama HER2 positivo estadios II-III, administrando en adyuvancia la adriamicina y ciclofosfamida. Se vio que aquellos tumores con una expresión proteica de HER2 de 3+ respondían mejor que los tumores con expresión de 2+.<sup>334</sup>

En otra serie francesa de 93 pacientes con cáncer de mama HER2 positivo estadios II-III que recibían docetaxel o docetaxel y carboplatino con trastuzumab previo a la cirugía, se vio que aquellos tumores que tenían un nivel de amplificación alto del gen HER2 (número de copias del gen HER2 >10) tenían una mayor tasa de RCp (56%) frente a los tumores cuya amplificación del gen era baja (número de copias del gen entre 6-10) cuya tasa de RCp fue del 22% con significación estadística ( $p < 0.005$ ).

En esta serie no se vio relación entre los diferentes niveles de amplificación de HER2, la RCp y otros parámetros clínico-patológicos como el tamaño, la afectación ganglionar, el grado, la expresión de RH o el grado de expresión proteica de HER2. Los autores concluyen que la amplificación del gen HER2 es el único factor predictor de RCp, por lo que es muy importante hacer un diagnóstico preciso del mismo de cara a aportar el mayor beneficio a las pacientes.<sup>335</sup>

Estos datos concuerdan con lo observado en nuestra serie. A mayor número de copias del gen HER2 y mayor valor del Ratio gen HER2/CEN17, mayor tasa de RCp con significación estadística ( $p=0.004$  y  $0.002$  respectivamente). Además, parece que las pacientes cuyos tumores amplificaban más y alcanzaban RCp demostraban cierta tendencia a obtener mejor SLE y SG pero sin alcanzar la significación estadística.

Estos datos se confirman con la introducción del doble bloqueo con pertuzumab y quimioterapia. En el estudio Neosphere un análisis de biomarcadores vio que la expresión alta de la proteína HER2 se relacionaba con una mayor tasa de RCp en el brazo de pertuzumab, trastuzumab y docetaxel, siendo el único factor predictivo de respuesta a tratamiento.<sup>336</sup>

En este estudio también se vio que los tumores RH negativo obtenían una mayor tasa de RCp. La explicación molecular al respecto es que estos tumores que expresan o no RH tienen una expresión génica diferente y que la respuesta diferente al tratamiento viene determinada por vías de señalización diferentes.

Así los tumores RH negativo tiene una expresión mayor de la ratio HER2/HER3, de mRNA de EGFR, del dominio extracelular de HER2 (sHER2), de mRNA de HER2 y de expresión proteica de HER2 siendo como hemos dicho, la sobreexpresión de HER2, el factor pronóstico y predictivo más importante en este subtipo biológico.<sup>336</sup>

En el estudio Tryphaena se vuelve a confirmar que los niveles de expresión de la proteína o del mRNA de HER2 son el factor predictor más importante de respuesta al tratamiento obteniendo una mayor tasa de RCp frente a los tumores con un nivel más bajo de expresión o amplificación.<sup>337</sup>

A diferencia de otros estudios como el HERA, no se vio asociación entre una expresión mayor del gen TOP2A y la respuesta al tratamiento tanto en el brazo de antraciclina como en el que no la llevaba.<sup>337</sup>

### **TERCER OBJETIVO DEL ESTUDIO: CARDIOTOXICIDAD**

La administración concomitante de trastuzumab y las antraciclinas clásicas (fundamentalmente adriamicina/doxorubicina que es la más utilizada en cáncer de mama) es cardiopélica y no está permitido su uso a nivel clínico.

En los últimos años, debido a la monitorización estrecha de la función cardíaca y al uso de antraciclinas menos cardiopélicas como la epirrubina y formulaciones liposomales, la incidencia de insuficiencia cardíaca asociada a trastuzumab y antraciclinas ha disminuido de forma significativa.<sup>206,295,297,338</sup>

Para monitorizar la función cardíaca en nuestra serie utilizamos la ecocardiografía en dos dimensiones siguiendo las guías vigentes al respecto. Esta técnica de imagen tiene un bajo coste y no conlleva irradiación para las pacientes. Sin embargo, actualmente sabemos que no es capaz de predecir de forma precisa el desarrollo de cardiotoxicidad. Existen nuevas pruebas de imagen que aportan información más precisa en estadios precoces y pueden cuantificar la deformación del miocardio (strain) como un marcador de contractilidad. Estas nuevas técnicas ecocardiográficas como el

strain longitudinal global (SLG), nos aportan información que puede predecir la disfunción cardiaca.<sup>288,339</sup>

Los biomarcadores conocidos para la detección precoz del daño miocárdico como la troponina o la fracción amino terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) son herramientas útiles para monitorizar la función cardiaca. Han sido estudiados como predictores precoces de daño cardiaco en pacientes que recibieron antraciclinas y terapias antiHER2 con resultados dispares.<sup>340,341</sup>

Después de un período de seguimiento largo nuestros datos muestran una incidencia baja de eventos cardiacos: el 2.95% de nuestras pacientes sufrió un descenso asintomático y reversible de la FEVI y 0.64% de ellas una disfunción ventricular sintomática. Ambos eventos cardiacos se relacionaron con la existencia de otros factores de riesgo cardiovascular como un elevado IMC, tensión arterial elevada o radioterapia sobre la mama izquierda.

Esta incidencia baja de eventos cardiacos no nos permite hacer una asociación estadísticamente significativa entre ellos y el perfil de cardiotoxicidad de los diferentes tratamientos de quimioterapia recibidos. Las 5 pacientes que sufrieron un descenso de la FEVI <50% al final de la quimioterapia habían recibido antraciclinas de forma concomitante con trastuzumab, en vez de recibirlo de forma secuencial.

Esta incidencia de cardiotoxicidad baja es comparable a la de otros estudios que emplean antraciclinas, taxanos y trastuzumab.

En el estudio NOAH a pesar del uso concomitante de doxorrubicina, paclitaxel y trastuzumab la incidencia de insuficiencia cardiaca sintomática fue menor del 2%.<sup>206</sup>

En el estudio de Buzdar cuando se utilizó la epirrubicina de forma concurrente con trastuzumab la incidencia de bajadas asintomáticas de la FEVI fue del 4.6%. No hubo casos de insuficiencia cardiaca sintomática.<sup>295</sup>

En el estudio de Gavilá en el que se administró doxorubicina liposomal, como en nuestra serie, pero de forma concomitante con paclitaxel y trastuzumab y un mayor número de ciclos se observaron en un 14.5% disminución asintomática de la FEVI > del 10% respecto a la basal pero no hubo ningún caso de insuficiencia cardiaca congestiva.<sup>297</sup>

La introducción del doble bloqueo de la vía HER2 en la neoadyuvancia no ha supuesto un aumento significativo de la cardiotoxicidad.

En el estudio Neosphere en el cual no se administra antraciclinas previamente a la cirugía, la mediana de descenso asintomático de la FEVI fue del 4-5% y similar en los diferentes brazos de tratamiento. No hubo casos de insuficiencia cardiaca congestiva.<sup>206</sup>

Cuando se añaden las antraciclinas al doble bloqueo en los diferentes estudios publicados se sigue manteniendo un buen perfil de seguridad cardiaca.

En el estudio Tryphaena en el brazo en el que se utiliza FEC secuencialmente con docetaxel asociados ambos a pertuzumab y trastuzumab, vemos descensos de la FEVI >del 10% con respecto a la basal en un 5.6% de las pacientes. No hubo datos de bajadas sintomáticas de la FEVI en este grupo.<sup>216</sup>

En la cohorte HER2 positiva del estudio GeparSepto donde se administraba paclitaxel convencional o nab-paclitaxel secuencialmente con FEC, ambos con pertuzumab y trastuzumab concomitante se observaron un 7.6% de descensos asintomáticos de la FEVI. En el 2% de ellos los descensos fueron < 50% y en el 0.4% hubo descensos de > del 10% frente al basal. 4 pacientes sufrieron insuficiencia cardiaca congestiva (1% de los casos).<sup>342</sup>

En el estudio fase III TRAIN-2 que compara FEC seguido de paclitaxel-carboplatino frente a carboplatino-paclitaxel y ambos brazos con pertuzumab y trastuzumab concomitante, se vio que los descensos asintomáticos de la FEVI ocurrieron

en el 5% de las pacientes en el brazo de antraciclina frente al 3% en las que no la llevaban. Durante la adyuvancia estos descensos no se recuperaron en un tercio de las pacientes.

Además, se vio disfunción sintomática del ventrículo izquierdo en 2 pacientes en el brazo de antraciclina.<sup>304</sup>

En el estudio Berenice se quiso ver si la doxorubicina a dosis densas frente a la epirubicina, ambas con un taxano administrado de forma secuencial y con el doble bloqueo de pertuzumab y trastuzumab en ambos brazos era bien tolerado desde el punto de vista cardiaco. La incidencia de insuficiencia cardiaca congestiva fue del 1.5% en el brazo de la doxorubicina y no hubo episodios de este tipo con la epirubicina.<sup>343</sup>

En cuanto a los descensos asintomáticos de la FEVI, ocurrieron en el 6.5% de las pacientes que recibieron doxorubicina frente al 2% con epirubicina.<sup>343</sup>

Existen pocas series donde se analice la cardiotoxicidad asociada a doxorubicina liposomal con doble bloqueo con pertuzumab y trastuzumab en neoadyuvancia HER2 positiva. En el ensayo clínico fase II Opti-HER-HEART, donde se administra doxorubicina liposomal con paclitaxel y el doble bloqueo de forma concomitante, se vio que la incidencia de eventos cardiacos fue del 2.4% durante la neoadyuvancia, consistentes en descensos asintomáticos y reversibles de la FEVI en 2 pacientes. Durante la adyuvancia un 5.1% de las pacientes sufrieron un descenso transitorio y asintomático de la FEVI con recuperación en el 100% de las pacientes.<sup>344</sup>

Por tanto, aunque la incidencia de cardiotoxicidad en todos estos estudios y en particular en nuestra serie, es baja, sería deseable poder evitarla a través de una mejor selección de las pacientes y la corrección de los factores de riesgo cardiovascular (IMC, hipertensión arterial, dislipemia) desde el principio, no sólo mediante mejoras en la

dieta o potenciando el ejercicio físico sino también con medicación. La administración temprana de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (tipo enalapril o ramipril) o beta-bloqueantes (tipo carvedilol o bisoprolol) o una combinación de ambos ha producido mejoras importantes en la función cardiaca de las pacientes con cáncer de mama que recibieron antraciclinas. Esto lleva consigo la necesidad de una colaboración conjunta entre cardiólogos y oncólogos desde el inicio del tratamiento.<sup>132,287,345,346</sup>

## **LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Este trabajo refleja de forma fidedigna datos del mundo real, en una serie tratada de forma homogénea en nuestro centro, lo que le confiere un valor importante a la hora de analizar cómo trabajamos, lo cerca o no que estamos de las buenas prácticas clínicas y lo que debemos mejorar.

Sin embargo, por ser un estudio de práctica diaria en un centro hospitalario público universitario de primer nivel pero con una carga asistencial elevada en todas las especialidades que participaron en el manejo, tiene una serie de limitaciones:

1).- Es un estudio retrospectivo, con un número de pacientes elevado para el subtipo biológico HER2 positivo y con la indicación de tratamiento sistémico primario, pero supone un número pequeño de casos para poder sacar conclusiones contundentes desde el punto de vista estadístico en cada uno de los objetivos del mismo.

2).- Desde la primera paciente incluida en el 2005 hasta la última en 2016 ha ido cambiando la forma de diagnosticar el cáncer de mama HER2 positivo, de evaluar la respuesta durante el tratamiento, la forma de operar, de valorar la respuesta patológica e incluso las guías de manejo de la cardiotoxicidad, con lo que existe un sesgo claro a la hora de sacar las conclusiones.

Así las guías ASCO-CAP para la determinación de HER2 no son las mismas para todas las pacientes, la disponibilidad de la RNM mamaria para la valoración basal y final del tratamiento no es total dado que en los primeros años del estudio su uso no era un estándar, la BSGC pasó de hacerse al diagnóstico inicial a realizarse en el mismo acto quirúrgico después del tratamiento sistémico, las técnicas quirúrgicas y las indicaciones de cirugía conservadora cambiaron también en el tiempo; la respuesta patológica cambió de sistema de evaluación y en cuanto al control de la cardiotoxicidad actualmente está más protocolizado y se hace de forma regular siguiendo las recomendaciones vigentes. De ahí que no todas las pacientes en nuestra serie tuvieron el ecocardiograma en el mismo momento del seguimiento.

3).- Aunque la mediana de seguimiento de nuestras pacientes es de 5 años y medio, debido al escaso número de eventos, necesitamos más tiempo para demostrar de forma clara beneficio en supervivencia y ver cómo evoluciona la cardiotoxicidad años después de haber finalizado el tratamiento.

## **VI CONCLUSIONES**

**1).- El tratamiento sistémico primario en cáncer de mama HER2 positivo, estadios I-III con una secuencia de antraciclinas, taxanos y trastuzumab ha sido eficaz en los siguientes términos:**

- Hemos obtenido una tasa de RC clínica del 63%
- Esta RC clínica se correlacionó bien con la RCp, entendiendo ésta como la ausencia de enfermedad invasiva tanto en mama como en axila.
- La tasa de RCp fue de un 51%
- Estas RCp permitieron una tasa de cirugía conservadora del 66% cuando el 84% de las pacientes al diagnóstico tenían indicación de mastectomía.
- Observamos una asociación entre la RCp y la SLE con significación estadística y una tendencia a mejorar la SG en estas pacientes.

**2).- Los factores clínico-patológicos que se relacionaron con la eficacia han sido los siguientes:**

- En cuanto a la expresión de HER2: obtuvimos una alta correlación entre la IHQ realizada en nuestro centro con el FISH realizado en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago años después del diagnóstico inicial (92%).
- Los tumores con un mayor nivel de amplificación del gen HER2 son los que obtuvieron mayor tasa de RCp. Numéricamente las pacientes cuyos tumores amplificaban más e hicieron RCp, obtuvieron una SLE y SG mayor pero sin significación estadística.

- Los tumores RH negativo, grado 3 y con un Ki-67>35% obtuvieron mayor tasa de RCp.

- No pudimos demostrar una asociación entre la edad de las pacientes, el tamaño del tumor, la afectación o no ganglionar, el estadio o el tipo de tratamiento recibido con una mayor tasa de RCp ni con beneficio en supervivencia.

**3).- Observamos un buen perfil de seguridad cardiaca atribuido al uso de antraciclinas menos cardiotóxicas ya una estrecha monitorización cardiaca.**

## VII BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. *National Cancer Institute Bethesda, MD*. 2019.
3. <https://www.seom.org/es/noticias-las-cifras-del-cancer-en-espana-2019>. Las cifras del cáncer de mama en España 2019. SEOM. 2019.
4. <https://www.sergas.es/saude-publica/Documents/4447/BEG XXIX-1pdf>. Boletín Epidemiológico de Galicia. 2017;XXIX(1):1-15.
5. <https://www.seom.org/es/noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018>. Las cifras del cáncer en España 2018. SEOM. 2018.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
7. Martin M, Mahillo E, Llombart-Cussac A, et al. The "El Alamo" project (1990-1997): two consecutive hospital-based studies of breast cancer outcomes in Spain. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(7):508-518.
8. Martin M, Pollán M, Jara, C, López-Tarruella, S, Carrasco, E. Proyecto El Álamo III. Encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama en hospitales del grupo GEICAM 1998-2001. 2014:1-168.
9. Kristin N. Anderson, Richard B. Schwab, and Maria Elena Martinez. Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;144(1):1-10.
10. Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(1):73-85.
11. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. *National Cancer Institute Bethesda, MD*. based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.
12. Jatoi I, Anderson WF, Rao SR, Devesa SS. Breast cancer trends among black and white women in the United States. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7836-7841.
13. <documents/document/acspc-046381.pdf> Aahwcoagcr. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2015.
14. <046405.pdf>. hwcoagcrdda-. American Cancer Society. Cancer facts and figures for Hispanics/Latinos, 2015-2017. 2015.
15. Richard J Santen M, De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al. Benign Breast Disease in Women. *Endotext [Internet] South Dartmouth (MA): MDTextcom, Inc; 2000-2018*.
16. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(3):229-237.

17. Hartmann LC, Degnim AC, Santen RJ, Dupont WD, Ghosh K. Atypical hyperplasia of the breast--risk assessment and management options. *N Engl J Med*. 2015;372(1):78-89.
18. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(3):227-236.
19. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(21):1622-1629.
20. Warner E, Lockwood G, Trichler D, Boyd NF. The risk of breast cancer associated with mammographic parenchymal patterns: a meta-analysis of the published literature to examine the effect of method of classification. *Cancer Detect Prev*. 1992;16(1):67-72.
21. Boyd NF, Martin LJ, Rommens JM, et al. Mammographic density: a heritable risk factor for breast cancer. *Methods Mol Biol*. 2009;472:343-360.
22. Boyd NF. Tamoxifen, mammographic density, and breast cancer prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(9):704-705.
23. T Trinh, S E Christensen, J S Brand, J Cuzick, K Czene, A Sjölander, K Bälter and P Hall. Background risk of breast cancer influences the association between alcohol consumption and mammographic density. *British Journal of Cancer* 2015;113:159-165.
24. Christina Blücher, Sonja C.Stadler. Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8:1-7.
25. Li S, Zhou T, Li C, et al. High metastatic gastric and breast cancer cells consume oleic acid in an AMPK dependent manner. *PLoS One*. 2014;9(5):e97330.
26. Hardy S, Langelier Y, Prentki M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res*. 2000;60(22):6353-6358.
27. D. S. M. Chan, A.R. Vieira, D. Aune, E. V. Bandera, D. C. Greenwood, A. McTiernan, D. Navarro Rosenblatt, I. Thune, R. Vieira, T. Norat. Body mass index and survival in women with breast cancer—systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. *Annals of Oncology*. 2014;25:1901–1914.
28. Li C, Yang L, Zhang D, Jiang W. Systematic review and meta-analysis suggest that dietary cholesterol intake increases risk of breast cancer. *Nutr Res*. 2016;36(7):627-635.
29. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(6):674-688.
30. Chajes V, Torres-Mejia G, Biessy C, et al. omega-3 and omega-6 Polyunsaturated fatty acid intakes and the risk of breast cancer in Mexican women: impact of obesity status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(2):319-326.
31. Alexander DD, Morimoto LM, Mink PJ, Cushing CA. A review and meta-analysis of red and processed meat consumption and breast cancer. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):349-365.
32. Taylor VH, Misra M, Mukherjee SD. Is red meat intake a risk factor for breast cancer among premenopausal women? *Breast Cancer Res Treat*. 2009;117(1):1-8.
33. Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J, Li D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ*. 2013;346:f3706.

34. Schernhammer ES, Holly JM, Pollak MN, Hankinson SE. Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(3):699-704.
35. Bradshaw PT, Khankari NK, Teitelbaum SL, et al. Nutrient pathways and breast cancer risk: the Long Island Breast Cancer Study Project. *Nutr Cancer.* 2013;65(3):345-354.
36. Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS One.* 2013;8(1):e54318.
37. Dong JY, Qin LQ. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(2):315-323.
38. Jung S, Spiegelman D, Baglietto L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(3):219-236.
39. Zhang X, Spiegelman D, Baglietto L, et al. Carotenoid intakes and risk of breast cancer defined by estrogen receptor and progesterone receptor status: a pooled analysis of 18 prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(3):713-725.
40. Dorgan JF, Sowell A, Swanson CA, et al. Relationships of serum carotenoids, retinol, alpha-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control.* 1998;9(1):89-97.
41. Eliassen AH, Hendrickson SJ, Brinton LA, et al. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(24):1905-1916.
42. John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I Epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(5):399-406.
43. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121(2):469-477.
44. Gissel T, Rejnmark L, Mosekilde L, Vestergaard P. Intake of vitamin D and risk of breast cancer--a meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;111(3-5):195-199.
45. Anderson LN, Cotterchio M, Vieth R, Knight JA. Vitamin D and calcium intakes and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(6):1699-1707.
46. Abbas S, Linseisen J, Rohrmann S, et al. Dietary intake of vitamin D and calcium and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nutr Cancer.* 2013;65(2):178-187.
47. Sperati F, Vici P, Maugeri-Sacca M, et al. Vitamin D supplementation and breast cancer prevention: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One.* 2013;8(7):e69269.
48. Li M, Chen P, Li J, Chu R, Xie D, Wang H. Review: the impacts of circulating 25-hydroxyvitamin D levels on cancer patient outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):2327-2336.
49. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014;110(11):2772-2784.

50. Chung M BE, Brendel M, Ip S, Lau J, Lee J, Lichtenstein A, Patel K, Raman G, Tatsioni A, Terasawa T and Trikalinos TA. Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. . *Evid Rep Technol Assess* 2009;183:1-420.
51. Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(22):1581-1591.
52. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA*. 1998;279(7):535-540.
53. Fagherazzi G, Vilier A, Boutron-Ruault MC, Mesrine S, Clavel-Chapelon F. Alcohol consumption and breast cancer risk subtypes in the E3N-EPIC cohort. *Eur J Cancer Prev*. 2015;24(3):209-214.
54. Preston DL, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD, Jr. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res*. 2002;158(2):220-235.
55. Travis LB, Hill DA, Dores GM, et al. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *JAMA*. 2003;290(4):465-475.
56. Clemons M, Loijens L, Goss P. Breast cancer risk following irradiation for Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rev*. 2000;26(4):291-302.
57. Titus-Ernstoff L, Hatch EE, Hoover RN, et al. Long-term cancer risk in women given diethylstilbestrol (DES) during pregnancy. *Br J Cancer*. 2001;84(1):126-133.
58. Steenland K, Whelan E, Deddens J, Stayner L, Ward E. Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort study of 7576 women (United States). *Cancer Causes Control*. 2003;14(6):531-539.
59. Jia Y, Lu Y, Wu K, et al. Does night work increase the risk of breast cancer? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(3):197-206.
60. Kamdar BB, Tergas AI, Mateen FJ, Bhayani NH, Oh J. Night-shift work and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):291-301.
61. Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(11):812-822.
62. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*. 2007;25(11):1329-1333.
63. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res*. 2012;18(2):400-407.
64. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*. 2001;20(34):4621-4628.
65. Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*. 2006;295(12):1379-1388.
66. Antoniou AC, Foulkes WD, Tischkowitz M. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*. 2014;371(17):1651-1652.
67. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006;25(43):5906-5911.

68. Byrnes GB, Southey MC, Hopper JL. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):208.
69. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncol.* 2015;1(7):943-951.
70. Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med.* 2015;372(23):2243-2257.
71. James S. Lawson, Brian Samons, Wendy K. Glenn. Oncogenic viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor virus (MMTV), Bovine Leukemia virus (BLV), Human Papilloma virus (HPV), and Epstein-Barr virus (EBV). *Frontiers in Oncology.* 2018;8:1-18.
72. Tang K-W, Larsson E. Tumour virology in the era of high-throughput genomics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;19(372(1732)).
73. Ohba K, Ichiyama K, Yajima M, et al. In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PLoS One.* 2014;9(5):e97787.
74. Richardson AK, Currie MJ, Robinson BA, et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in breast cancer. *PLoS One.* 2015;10(2):e0118989.
75. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008;216(2):141-150.
76. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;22(3):207-219.
77. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;31(3):209-223.
78. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):174-183.
79. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181-187.
80. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-1474.
81. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-410.
82. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3153-3158.
83. Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, Nordenskjold B. Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast cancer population. South East Swedish Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;53(1):1-8.
84. Rakha EA, Ellis IO. An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 2007;60(12):1300-1306.
85. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol.* 2005;16(11):1723-1739.

86. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, 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):1134-1150.
87. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-1664.
88. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-750.
89. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-1513.
90. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-2223.
91. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1533-1546.
92. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1994;24(1):41-47.
93. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(2):142-153.
94. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-5374.
95. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007;50(4):434-438.
96. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393-10398.
97. Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(6):560-569.
98. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.
99. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-10874.
100. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96.
101. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-1167.

102. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, 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):5222-5232.
103. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol.* 2007;8(8):R157.
104. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-2767.
105. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
106. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2817-2826.
107. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(8):717-729.
108. Metzger Filho O, Ignatiadis M, Sotiriou C. Genomic Grade Index: An important tool for assessing breast cancer tumor grade and prognosis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;77(1):20-29.
109. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, et al. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer.* 2012;12:456.
110. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics.* 2015;8:54.
111. Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol.* 2013;14(11):1067-1076.
112. Dowsett M, Sestak I, Regan MM, et al. Integration of Clinical Variables for the Prediction of Late Distant Recurrence in Patients With Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Treated With 5 Years of Endocrine Therapy: CTS5. *J Clin Oncol.* 2018;36(19):1941-1948.
113. Bayani J, Yao CQ, Quintayo MA, et al. Molecular stratification of early breast cancer identifies drug targets to drive stratified medicine. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3:3.
114. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer.* 2017;75:284-298.
115. Gyorffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res.* 2015;17:11.
116. Loberg M, Lousdal ML, Bretthauer M, Kalager M. Benefits and harms of mammography screening. *Breast Cancer Res.* 2015;17:63.
117. Teertstra HJ, Loo CE, van den Bosch MA, et al. Breast tomosynthesis in clinical practice: initial results. *Eur Radiol.* 2010;20(1):16-24.
118. Diekmann F, Freyer M, Diekmann S, et al. Evaluation of contrast-enhanced digital mammography. *Eur J Radiol.* 2011;78(1):112-121.
119. Fredenberg E, Hemmendorff M, Cederstrom B, Aslund M, Danielsson M. Contrast-enhanced spectral mammography with a photon-counting detector. *Med Phys.* 2010;37(5):2017-2029.

120. Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast US and evaluation of factors that influence them: an analysis of 27,825 patient evaluations. *Radiology*. 2002;225(1):165-175.
121. Herrada J, Iyer RB, Atkinson EN, Sneige N, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Relative value of physical examination, mammography, and breast sonography in evaluating the size of the primary tumor and regional lymph node metastases in women receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997;3(9):1565-1569.
122. Schott AF, Roubidoux MA, Helvie MA, et al. Clinical and radiologic assessments to predict breast cancer pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;92(3):231-238.
123. Croshaw R, Shapiro-Wright H, Svensson E, Erb K, Julian T. Accuracy of clinical examination, digital mammogram, ultrasound, and MRI in determining postneoadjuvant pathologic tumor response in operable breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(11):3160-3163.
124. Sardanelli F, Boetes C, Borisch B, et al. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1296-1316.
125. Lobbes MB, Prevos R, Smidt M, et al. The role of magnetic resonance imaging in assessing residual disease and pathologic complete response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy: a systematic review. *Insights Imaging*. 2013;4(2):163-175.
126. Michael L. Marinovich NH, Petra Macaskill, Francesco Sardanelli, Les Irwig, Eleftherios P. Mamounas, Gunter von Minckwitz, Meagan E. Brennan, Stefano Ciatto†. Meta-Analysis of Magnetic Resonance Imaging in Detecting Residual Breast Cancer After Neoadjuvant Therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:321-333.
127. Menezes GL, Knuttel FM, Stehouwer BL, Pijnappel RM, van den Bosch MA. Magnetic resonance imaging in breast cancer: A literature review and future perspectives. *World J Clin Oncol*. 2014;5(2):61-70.
128. Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99.
129. Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018(38):457-467.
130. Puglisi F, Follador A, Minisini AM, et al. Baseline staging tests after a new diagnosis of breast cancer: further evidence of their limited indications. *Ann Oncol*. 2005;16(2):263-266.
131. Caresia Aroztegui AP, Garcia Vicente AM, Alvarez Ruiz S, et al. 18F-FDG PET/CT in breast cancer: Evidence-based recommendations in initial staging. *Tumour Biol*. 2017;39(10):1010428317728285.
132. Juan F Cueva, Silvia Antolín, Lourdes Calvo, et al. Galician consensus on management of cardiotoxicity in breast cancer: risk factors, prevention an early intervention. *Clinical and Traslational Oncology*. 2017;19:1067-1078.
133. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16):1233-1241.

134. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(16):1227-1232.
135. Bedrosian I, Hu CY, Chang GJ. Population-based study of contralateral prophylactic mastectomy and survival outcomes of breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(6):401-409.
136. Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(13):2553-2559.
137. Veronesi U, Galimberti V, Mariani L, et al. Sentinel node biopsy in breast cancer: early results in 953 patients with negative sentinel node biopsy and no axillary dissection. *Eur J Cancer.* 2005;41(2):231-237.
138. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4807-4816.
139. Terrenato I, D'Alicandro V, Casini B, et al. A cut-off of 2150 cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node may be a powerful predictor of non-sentinel lymph node status in breast cancer patients. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171517.
140. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg.* 2010;252(3):426-432; discussion 432-423.
141. Donker M, Van Tienhoven G, Straver ME, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1303-1310.
142. Oliveira M, Cortes J, Bellet M, et al. Management of the axilla in early breast cancer patients in the genomic era. *Ann Oncol.* 2013;24(5):1163-1170.
143. Thorsten Kuehn IB, Tanja Fehm, Barbara Fleige, Maik Hausschild, Gisela Helms, Annette Lebeau, Cornelia Liedtke, Gunter von Minckwitz VN, Sabine Schmatloch, Peter Schrenk, Annette Staebler, Michael Untch. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *the Lancet Oncology.* 2013;14:609-618.
144. Dr. Judy C. Boughey M, Dr. Vera J. Suman, PhD, Dr. Elizabeth A. Mittendorf, MD, PhD, Dr. Gretchen M. Ahrendt M, Dr. Lee G. Wilke, MD, Dr. Bret Taback, MD, Dr. A. Marilyn, Leitch M, Henry M. Kuerer, MD, PhD, Dr. Monet Bowling, MD, Dr. Teresa S. Flippo-, et al. Sentinel Lymph Node Surgery after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Node-Positive Breast Cancer: The American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z1071 Clinical Trial. *JAMA.* 2013;310 (14):1455-1461.
145. Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;362(6):513-520.
146. EBCTCG: McGale P, Taylor C, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet.* 2014;383(9935):2127-2135.
147. McBride A, Allen P, Woodward W, et al. Locoregional recurrence risk for patients with T1,2 breast cancer with 1-3 positive lymph nodes treated with mastectomy and systemic treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;89(2):392-398.

148. Nagar H, Mittendorf EA, Strom EA, et al. Local-regional recurrence with and without radiation therapy after neoadjuvant chemotherapy and mastectomy for clinically staged T3N0 breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;81(3):782-787.
149. Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, et al. Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7820-7826.
150. Abrams JS. Adjuvant therapy for breast cancer--results from the USA consensus conference. *Breast Cancer*. 2001;8(4):298-304.
151. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-1717.
152. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2005-2014.
153. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(2):111-121.
154. Bartlett J, Canney P, Campbell A, et al. Selecting breast cancer patients for chemotherapy: the opening of the UK OPTIMA trial. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2013;25(2):109-116.
155. Laenkholm AV, Jensen MB, Eriksen JO, et al. PAM50 Risk of Recurrence Score Predicts 10-Year Distant Recurrence in a Comprehensive Danish Cohort of Postmenopausal Women Allocated to 5 Years of Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):735-740.
156. Sestak I, Buus R, Cuzick J, et al. Comparison of the Performance of 6 Prognostic Signatures for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(4):545-553.
157. Jensen MB, Laenkholm AV, Nielsen TO, et al. The Prosigna gene expression assay and responsiveness to adjuvant cyclophosphamide-based chemotherapy in premenopausal high-risk patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2018;20(1):79.
158. Wong WB, Ramsey SD, Barlow WE, Garrison LP, Jr., Veenstra DL. The value of comparative effectiveness research: projected return on investment of the RxPONDER trial (SWOG S1007). *Contemp Clin Trials*. 2012;33(6):1117-1123.
159. Curigliano G, Burstein HJ, E PW, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1700-1712.
160. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-816.
161. Gray DR, Kelly Handley et al. aTTom: long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6.953 women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31s (abstract 5).
162. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(5):436-446.
163. Paganì O, Regan MM, Francis PA, Text, Investigators S, International Breast Cancer Study G. Exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(14):1358-1359.

164. Francis PA, Pagani O, Fleming GF, et al. Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(2):122-137.
165. Blok EJ, Kroep JR, Meershoek-Klein Kranenbarg E, et al. Optimal Duration of Extended Adjuvant Endocrine Therapy for Early Breast Cancer; Results of the IDEAL Trial (BOOG 2006-05). *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(1).
166. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials. *Lancet.* 2015;386(10001):1353-1361.
167. Dhesy-Thind S, Fletcher GG, Blanchette PS, et al. Use of Adjuvant Bisphosphonates and Other Bone-Modifying Agents in Breast Cancer: A Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2017;35(18):2062-2081.
168. NCCN Guidelines Version 3.2018. [www.nccn.org](http://www.nccn.org).
169. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(4):CD006243.
170. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol.* 2014;32(33):3744-3752.
171. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet.* 2017;389(10075):1195-1205.
172. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(14):1273-1283.
173. Slamon DJ, Eiermann W, Robert NJ, Giermek J, Martin M, et al. Ten year follow-up of BCIRG-006 comparing doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2+ early breast cancer. *Cancer Res.* 2015;76(4-suppl): s5-04.
174. Tolaney SM, Barry WT, Dang CT, et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(2):134-141.
175. Earl H, Hiller L, Vallier A, Loi S, Howe D, Higgins. PERSE- PHONE: 6 versus 12 months (m) of adjuvant trastuzumab in patients (pts) with HER2 positive (+) early breast cancer (EBC): Randomised phase 3 non-inferiority trial with de ni- tive 4-year (yr) disease-free survival (DFS) results. *J Clin Oncol.* 2018;36:506.
176. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(2):122-131.
177. Chan A, Delalogue S, Holmes FA, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(3):367-377.
178. Vaz-Luis I, Ottesen RA, Hughes ME, et al. Outcomes by tumor subtype and treatment pattern in women with small, node-negative breast cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol.* 2014;32(20):2142-2150.
179. Hortobagay Gn BGR, Spanos W, Montague E.D, Buzdar AU, Yap H-Y, and Schell F. Multimodal Treatment of Locoregionally Advanced Breast Cancer. *Cancer.* 1983;51:763-768.

180. Hortobagay G.N, Ames, F.C, Buzdar U.A, Kau S.W, Mcneese R.N, Paulus D, Hug V, Holmes F.A, Romsdahl M.M, Fraschini G, McBride C.M, Martin R.G, Montague E. Management of Stage III Primary Breast Cancer With Primary Chemotherapy, Surgery, and Radiation Therapy. *Cancer*. 1988;62:2507-2516.
181. Bear HD. Indications for neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Semin Oncol*. 1998;25(2 Suppl 3):3-12.
182. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):778-785.
183. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(3):188-194.
184. EBCTCG. Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. *Lancet Oncol*. 2018;19:27-39.
185. von Minckwitz G, Untch M, Nuesch E, et al. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(1):145-156.
186. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*. 2014;384(9938):164-172.
187. Prat A, Galvan P, Jimenez B, et al. Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Core Needle Biopsy Samples with the Prosigna Assay. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):560-566.
188. Alba E, Calvo L, Albanell J, 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):3069-3074.
189. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, 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):5108-5116.
190. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, 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.
191. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, 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 intrinsic subtype--ACOSOG Z1031. *J Clin Oncol*. 2011;29(17):2342-2349.
192. Untch M, Jackisch C, Schneeweiss A, et al. Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (GeparSepto-GBG 69): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(3):345-356.
193. Gianni L, Mansutti M, Anton A, et al. Comparing Neoadjuvant Nab-paclitaxel vs Paclitaxel Both Followed by Anthracycline Regimens in Women With ERBB2/HER2-Negative Breast Cancer-The Evaluating Treatment With Neoadjuvant Abraxane (ETNA) Trial: A Randomized Phase 3 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(3):302-308.

194. Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, et al. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2018;29(7):1497-1508.
195. Caramelo O, Silva C, Caramelo F, Frutuoso C, Almeida-Santos T. The effect of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in BRCA mutated triple negative breast cancers -systematic review and meta-analysis. *Hered Cancer Clin Pract.* 2019;17:11.
196. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003;12(3):541-552.
197. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annu Rev Med.* 2015;66:111-128.
198. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol.* 1992;10(4):599-605.
199. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hamond, Jared N. Schwartz, Karen L. Hagerty, D. Craig Allred, Richard J. Cote, Mitchell Dowsett, Patrick L. Fitzgibbons, Wedad M. Hanna, Amy Langer, Lisa M. McShane, Soonmyung Paik, Mark D. Pegram, Edith A. Perez, Michael F. Press, Anthony Rhodes, Catharine Sturgeon, Sheila E. Taube, Raymond Tubbs, Gail H. Vance, Marc van de Vijver, Thomas M. Wheeler,, Hayes aDF. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:118-145.
200. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hammond, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Updat. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(2):241-256.
201. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2105-2122.
202. Varga Z, Noske A. Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140652.
203. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(3):719-726.
204. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-792.
205. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(16):3676-3685.
206. Gianni L. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet.* 2010:377-384.
207. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human

- epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol*. 2011;29(25):3351-3357.
208. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379(9816):633-640.
  209. Untch M, Loibl S, Bischoff J, et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(2):135-144.
  210. Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A, et al. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1989-1995.
  211. Robidoux A, Tang G, Rastogi P, et al. Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(12):1183-1192.
  212. Carey LA, Berry DA, Cirrincione CT, et al. Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *J Clin Oncol*. 2016;34(6):542-549.
  213. Alba E, Albanell J, de la Haba J, et al. Trastuzumab or lapatinib with standard chemotherapy for HER2-positive breast cancer: results from the GEICAM/2006-14 trial. *Br J Cancer*. 2014;110(5):1139-1147.
  214. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(1):25-32.
  215. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):791-800.
  216. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol*. 2013;24(9):2278-2284.
  217. Foldi J, Mougalian S, Silber A, Pusztai L, et al. Single-arm, neoadjuvant, phase II trial of pertuzumab and trastuzumab administered concomitantly with weekly paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) for stage I-III HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2018;169(2):333-340
  218. Hurvitz SA, Martin M, Symmans WF, et al. Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(1):115-126.
  219. Rimawi MF, Mayer IA, Forero A, et al. Multicenter phase II study of neoadjuvant lapatinib and trastuzumab with hormonal therapy and without chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: TBCRC 006. *J Clin Oncol*. 2013;31(14):1726-1731.

220. Llombart-Cussac A, Cortes J, Pare L, et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(4):545-554.
221. Luque-Cabal M, García Teijido P, Fernández Pérez Y et al. Mechanisms behind the resistance to Trastuzumab in HER2 amplified breast cancer and strategies to overcome it. *Clinical Medicine Insights: Oncology.* 2016;10(S1):21-30.
222. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(8):628-638.
223. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2010;16(16):4226-4235.
224. Duman BB, Sahin B, Acikalin A, Ergin M, Zorludemir S. PTEN, Akt, MAPK, p53 and p95 expression to predict trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer. *J BUON.* 2013;18(1):44-50.
225. Mitra D, Brumlik MJ, Okamgba SU, et al. An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(8):2152-2162.
226. Ocana A, Gil-Martin M, Antolin S, et al. Efficacy and safety of dasatinib with trastuzumab and paclitaxel in first line HER2-positive metastatic breast cancer: results from the phase II GEICAM/2010-04 study. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2018.
227. Cheng H, Ballman K, Vassilakopoulou M, et al. EGFR expression is associated with decreased benefit from trastuzumab in the NCCTG N9831 (Alliance) trial. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1065-1071.
228. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 Study. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2585-2592.
229. Hellyer NJ, Kim MS, Koland JG. Heregulin-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and Akt via the ErbB2/ErbB3 co-receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42153-42161.
230. Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(8):724-734.
231. Gallardo A, Lerma E, Escuin D, et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br J Cancer.* 2012;106(8):1367-1373.
232. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Lind SE, Thor AD. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle.* 2011;10(17):2959-2966.
233. Chakraborty AK, Zerillo C, DiGiovanna MP. In vitro and in vivo studies of the combination of IGF1R inhibitor figitumumab (CP-751,871) with HER2 inhibitors trastuzumab and neratinib. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;152(3):533-544.
234. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, 3rd, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(5):1471-1477.

235. Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, et al. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res.* 2010;70(1):299-308.
236. Liang K, Esteva FJ, Albarracin C, et al. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell.* 2010;18(5):423-435.
237. Liu D, Yang Z, Wang T, et al. beta2-AR signaling controls trastuzumab resistance-dependent pathway. *Oncogene.* 2016;35(1):47-58.
238. Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, et al. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer.* 2002;99(6):783-791.
239. Raina D, Uchida Y, Kharbanda A, et al. Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Oncogene.* 2014;33(26):3422-3431.
240. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcborg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol.* 2013;6:1.
241. Sherene Loi, Anita Giobbie-Hurder, Andrea Gombos, Thomas Bachelot, Rina Hui, Giuseppe Curigliano, Mario Campone, Laura Biganzoli,, Hervé Bonnefoi GJ, Rupert Bartsch, Manuela Rabaglio-Poretti, Roswitha Kammler, Rudolf Maibach, Mark J Smyth, Angelo Di Leo, Marco Colleoni, Giuseppe Viale, Meredith M Regan, Fabrice André, for the International Breast Cancer Study Group and the Breast International Group\*. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b–2 trial. *Lancet Oncol.* 2019.
242. Huang C, Park CC, Hilsenbeck SG, et al. Beta1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res.* 2011;13(4):R84.
243. 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.
244. Carpten JD, Faber AL, Horn C, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 2007;448(7152):439-444.
245. Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15587-15591.
246. Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, et al. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell.* 2009;16(2):115-125.
247. Wang Y, Liu Y, Du Y, Yin W, Lu J. The predictive role of phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss, phosphoinositol-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation, and PI3K pathway activation in sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(6):633-642.
248. Majewski IJ, Nuciforo P, Mitterpergher L, et al. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1334-1339.
249. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in

- human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):166-173.
250. Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z, et al. Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):816-829.
251. Andre F, O'Regan R, Ozguroglu M, et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(6):580-591.
252. Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortes J, et al. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3761-3766.
253. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64(11):3981-3986.
254. Xia W, Bacus S, Hegde P, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(20):7795-7800.
255. Wang YC, Morrison G, Gillihan R, et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers--role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6):R121.
256. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1999;79(7-8):1220-1226.
257. Lee AV, Cui X, Oesterreich S. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12 Suppl):4429s-4435s; discussion 4411s-4412s.
258. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol*. 2009;27(33):5529-5537.
259. Johnston S, Pippin J Jr, Pivot X, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(33):5538-5546.
260. Woolf DK, Padhani AR, Makris A. Magnetic Resonance Imaging, Digital Mammography, and Sonography: Tumor Characteristics and Tumor Biology in Primary Setting. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2015;2015(51):15-20.
261. Semiglazov V. RECISt for Response (Clinical and Imaging) in Neoadjuvant Clinical Trials in Operable Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2015;2015(51):21-23.
262. Valentina Iotti, Sara Ravaioli, Rita Vacondio, Chiara Coriani, Sabrina Caffarri, Roberto Sghedoni, Andrea Nitrosi, Moira Ragazzi, Elisa Gasparini, Cristina Masini, Giancarlo Bisagni, Giuseppe Falco, Guglielmo Ferrari, Luca Braglia, Alberto Del Prato, Ivana Malavolti, Vladimiro Ginocchi and Pierpaolo Pattacini. Contrast-enhanced spectral mammography in neoadjuvant chemotherapy monitoring: a comparison with breast magnetic resonance imaging. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2017;19:1-13.

263. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, 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):1796-1804.
264. Marchio C, Sapino A. The pathologic complete response open question in primary therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2011;2011(43):86-90.
265. Carey LA, Metzger R, Dees EC, et al. American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(15):1137-1142.
266. Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast*. 2003;12(5):320-327.
267. Mathilde Touvier PF, Mathilde His, Teresa Norat, Doris S. M. Chan, Jacques Blacher, Serge Hercberg, Pilar Galan, Nathalie Druesne-Pecollo and Paule Latino-Martel. Systematic Review with Meta-Analysis Cholesterol and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Nutrition*. 2015;114:347-257.
268. W. Fraser Symmans FP, Christos Hatzis, Radhika Rajan, Henry Kuerer, Vicente Valero, Lina Assad, Anna Poniecka, Bryan Hennessy, Marjorie Green, Aman U. Buzdar, S. Eva Singletary, Gabriel N. Hortobagyi, and Lajos Pusztai. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25:4414-4422.
269. Hatzis C, Pusztai L, Valero V, et al. A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA*. 2011;305(18):1873-1881.
270. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg*. 1995;180(3):297-306.
271. Broglio KR, Quintana M, Foster M, et al. Association of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Breast Cancer With Long-Term Outcomes: A Meta-Analysis. *JAMA Oncol*. 2016;2(6):751-760.
272. von Minckwitz G, Fontanella C. Comprehensive Review on the Surrogate Endpoints of Efficacy Proposed or Hypothesized in the Scientific Community Today. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2015;2015(51):29-31.
273. Prowell TM, Pazdur R. Pathological complete response and accelerated drug approval in early breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2438-2441.
274. Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, et al. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J Clin Oncol*. 2007;25(25):3991-4008.
275. Doyle JJ, Neugut AI, Jacobson JS, Grann VR, Hershman DL. Chemotherapy and cardiotoxicity in older breast cancer patients: a population-based study. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8597-8605.
276. Valagussa P, Zambetti M, Biasi S, Moliterni A, Zucali R, Bonadonna G. Cardiac effects following adjuvant chemotherapy and breast irradiation in operable breast cancer. *Ann Oncol*. 1994;5(3):209-216.
277. Gerald Batist, Gopal Ramakrishnan, Chandra Sekhar Rao, Aruna Chandrasekharan, John Gutheil, Troy Guthrie, Pankaj Shah AK, Madhavan Krishnan Nair, Karen Hoelzer, Katherine Tkaczuk, Youn Choi Park, Group and Lily W Lee. For the Study Group. Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-

- Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared With Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19:1444-1454.
278. Ewer MS, Martin FJ, Henderson C, Shapiro CL, Benjamin RS, Gabizon AA. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Semin Oncol*. 2004;31(6 Suppl 13):161-181.
279. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7811-7819.
280. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1231-1238.
281. Martine J. Piccart-Gebhart, Marion Procter, Brian Leyland-Jones, Aron Goldhirsch, Michael Untch, Ian Smith, Luca Gianni, Jose Baselga, Richard Bell, Christian Jackisch, David Cameron, Mitch Dowsett, Carlos H. Barrios, Günther Steger, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
282. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *The Lancet Oncology*. 2014;15(10):1137-1146.
283. Paszat LF, Mackillop WJ, Groome PA, Boyd C, Schulze K, Holowaty E. Mortality from myocardial infarction after adjuvant radiotherapy for breast cancer in the surveillance, epidemiology, and end-results cancer registries. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2625-2631.
284. EBCTCG. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 2000;355(9217):1757-1770.
285. Nixon AJ, Manola J, Gelman R, et al. No long-term increase in cardiac-related mortality after breast-conserving surgery and radiation therapy using modern techniques. *J Clin Oncol*. 1998;16(4):1374-1379.
286. Patt DA, Goodwin JS, Kuo YF, et al. Cardiac morbidity of adjuvant radiotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7475-7482.
287. Teresa Lopez Fernandez, Ana Martin Garcia, Ana Santaballa Beltran, et al. Cardio-Onco-hematología en la práctica clínica. Documento de consenso y recomendaciones. *Rev Esp Cardiol*. 2017:1-13.
288. Paaladinesh Thavendiranathan, Frederic Poulin, Ki-Dong Lim, Juan Carlos Plana, Anna Woo, Thomas H. Marwick. Use of Myocardial Strain Imaging by Echocardiography for the Early Detection of Cardiotoxicity in Patients During and After Cancer Chemotherapy: A Systematic Review. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(25):2751-2768.
289. Henri C, Heinonen T, Tardif JC. The Role of Biomarkers in Decreasing Risk of Cardiac Toxicity after Cancer Therapy. *Biomark Cancer*. 2016;8(Suppl 2):39-45.
290. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer*. 2005;6(3):240-246.

291. Press MF, Sauter G, Bernstein L, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6598-6607.
292. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. Real-world performance of HER2 testing-- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(11):852-854.
293. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93(1):3-11.
294. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer.* 2004;5(1):63-69.
295. Buzdar AU, Suman VJ, Meric-Bernstam F, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC-75) followed by paclitaxel plus trastuzumab versus paclitaxel plus trastuzumab followed by FEC-75 plus trastuzumab as neoadjuvant treatment for patients with HER2-positive breast cancer (Z1041): a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2013;14(13):1317-1325.
296. Sonia Pernas, Miguel Gil-Gil, María Ochoa de Oiza, Anna Guna, Fina Climent, Anna Petit, Maria Jesus Pla, Amparo Garcia-Tejedor, Ana López-Ojeda, Cati Falo, Adela Fernández-Ortega, Carlos Mesía, Francisco Javier Pérez Martin, Ander Urruticoechea, Josep Ramon Germa. Efficacy and safety of concurrent trastuzumab plus weekly paclitaxel-FEC as primary therapy for HER2-positive breast cancer in everyday clinical practice. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134:1161-1168.
297. Gavila J, Guerrero A, Climent MA, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant chemotherapy with concurrent liposomal-encapsulated doxorubicin, paclitaxel and trastuzumab for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer in clinical practice. *Int J Clin Oncol.* 2015;20(3):480-489.
298. Anton A, Ruiz A, Plazaola A, et al. Phase II clinical trial of liposomal-encapsulated doxorubicin citrate and docetaxel, associated with trastuzumab, as neoadjuvant treatment in stages II and IIIA HER2-overexpressing breast cancer patients. GEICAM 2003-03 study. *Ann Oncol.* 2011;22(1):74-79.
299. Tuxen MK, Cold S, Tange UB, Balslev E, Nielsen DL. Phase II study of neoadjuvant pegylated liposomal doxorubicin and cyclophosphamide +/- trastuzumab followed by docetaxel in locally advanced breast cancer. *Acta Oncol.* 2014;53(10):1440-1445.
300. Moises Uriarte-Pinto, Angeles Escolano-Pueyo, Vicente Gimeno-Ballester, Oihana Pascual-Martínez, María Reyes Abad-Sazatornil, María Jose Agustín-Ferrández. Trastuzumab, non-pegylated liposomal-encapsulated doxorubicin and paclitaxel in the neoadjuvant setting of HER-2 positive breast cancer. *Int J Clin Pharm.* 2016;36:446-453.
301. Untch M, Rezai M, Loibl S, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol.* 2010;28(12):2024-2031.
302. Ismael G, Hegg R, Muehlbauer S, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive,

- clinical stage I-III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):869-878.
303. S. M. Swain, M.S. Ewer, G. Viale, S. Delaloge, J.M. Ferrero, M. Verrill, R. Colomer, C. Vieira, T. L. Werner, H. Douyhwaite, D. Bradley, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and standard anthracycline- and taxane-based chemotherapy for the neoadjuvant treatment of patients with HER2-positive localized breast cancer (BERENICE): a phase II, open-label, multicenter, multinational cardiac safety study. *Annals of Oncology.* 2018;29:646-653.
  304. van Ramshorst MS, van der Voort A, van Werkhoven ED, et al. Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(12):1630-1640.
  305. Hurvitz SA, Martin M, Jung KH, et al. Neoadjuvant Trastuzumab Emtansine and Pertuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Three-Year Outcomes From the Phase III KRISTINE Study. *J Clin Oncol.* 2019;37: 1-11.
  306. Bernard Fisher AB, Eleftherios Mamounas, Samuel Wieand, Andre Robidoux, Richard G. Margolese,, Anatolia B. Cruz J, Edwin R. Fisher, D. Lawrence Wickerham, Norman Wolmark, Arthur DeCillis, James L. Hoehn, Alan W. Lees, and Nikolay V. Dimitrov. Effect of Preoperative Chemotherapy on Local-Regional Disease in Women With Operable Breast Cancer: Findings From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *Journal of Clinical Oncology.* 1997;15:2483-2493.
  307. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001(30):96-102.
  308. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol.* 2001;19(22):4224-4237.
  309. Killelea BK, Yang VQ, Mougalian S, et al. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer increases the rate of breast conservation: results from the National Cancer Database. *J Am Coll Surg.* 2015;220(6):1063-1069.
  310. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Surg.* 2007;94(10):1189-1200.
  311. Rouzier R, Extra JM, Carton M, et al. Primary chemotherapy for operable breast cancer: incidence and prognostic significance of ipsilateral breast tumor recurrence after breast-conserving surgery. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3828-3835.
  312. Chen AM, Meric-Bernstam F, Hunt KK, et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy: the MD Anderson cancer center experience. *J Clin Oncol.* 2004;22(12):2303-2312.
  313. Chen AM, Meric-Bernstam F, Hunt KK, et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2005;103(4):689-695.
  314. Buchholz TA, Mittendorf EA, Hunt KK. Surgical Considerations After Neoadjuvant Chemotherapy: Breast Conservation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2015;2015(51):11-14.
  315. Kristine R. Broglio, Melanie Quintana, Margaret Foster, Melissa Olinger, Anna McGlothlin, Scott M. Berry, Jean-Francois Boileau, Christine Brezden-Masley, Stephen Chia, Susan Dent, Karen Gelmon, Alexander Paterson, Daniel Rayson,

- Donald A. Berry. Association of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Breast Cancer With Long-Term Outcomes. A Meta-Analysis. *JAMA Oncol.* 2016;E1-E10.
316. E. L. Korn, M.C Sachs, L.M McShane. Statistical controversies in clinical research: assessing pathologic complete response as a trial-level surrogate end point for early-stage breast cancer. *Annals of Oncology.* 2016;27:10–15.
  317. Denkert C, Loibl S, Muller BM, et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2786-2793.
  318. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast.* 2015;24 Suppl 2:S67-72.
  319. Rumiko Tashima, Reiki Nishimura, Tomofumi Osako, Yasuyuki Nishiyama, Yasuhiro Okumura, Masahiro Nakano, Mamiko Fujisue, Yasuo Toyozumi, Nobuyuki Arima. Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki-67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study. *PLoS One.* 2015;15:1-10.
  320. Alfonso Sánchez-Muñoz, Victor Navarro-Pérez, Yessica Plata-Fernández, Angela Santonja, Ignacio Moreno, Nuria Ribelles, Emilio Alba. Proliferation Determined by Ki-67 Defines Different Pathologic Response to Neoadjuvant Trastuzumab-Based Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer.* 2015.
  321. Wolff B. Histological grading in carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 1966;20(1):36-40.
  322. Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer.* 1984;53(3 Suppl):712-723.
  323. Contesso G, Mouriessé H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol.* 1987;5(9):1378-1386.
  324. Dabbs DJ. Ductal carcinoma of breast: nuclear grade as a predictor of S-phase fraction. *Hum Pathol.* 1993;24(6):652-656.
  325. Ellis P, Smith I, Ashley S, et al. Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998;16(1):107-114.
  326. Chang J, Powles TJ, Allred DC, et al. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(10):3058-3063.
  327. Desmedt C, Sperinde J, Piette F, et al. Quantitation of HER2 expression or HER2:HER2 dimers and differential survival in a cohort of metastatic breast cancer patients carefully selected for trastuzumab treatment primarily by FISH. *Diagn Mol Pathol.* 2009;18(1):22-29.
  328. Fuchs EM, Kostler WJ, Horvat R, et al. High-level ERBB2 gene amplification is associated with a particularly short time-to-metastasis, but results in a high rate of complete response once trastuzumab-based therapy is offered in the metastatic setting. *Int J Cancer.* 2014;135(1):224-231.
  329. Lipton A, Kostler WJ, Leitzel K, et al. Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence in situ hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Cancer.* 2010;116(22):5168-5178.

330. Giuliani R, Durbecq V, Di Leo A, et al. Phosphorylated HER-2 tyrosine kinase and Her-2/neu gene amplification as predictive factors of response to trastuzumab in patients with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer (MBC). *Eur J Cancer*. 2007;43(4):725-735.
331. Perez EA, Baehner FL, Butler SM, et al. The relationship between quantitative human epidermal growth factor receptor 2 gene expression by the 21-gene reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and adjuvant trastuzumab benefit in Alliance N9831. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):133.
332. Dowsett M, Procter M, McCaskill-Stevens W, et al. Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the HERA Trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(18):2962-2969.
333. Zabaglo L, Stoss O, Ruschoff J, et al. HER2 staining intensity in HER2-positive disease: relationship with FISH amplification and clinical outcome in the HERA trial of adjuvant trastuzumab. *Ann Oncol*. 2013;24(11):2761-2766.
334. Burstein HJ, Harris LN, Gelman R, et al. Preoperative therapy with trastuzumab and paclitaxel followed by sequential adjuvant doxorubicin/cyclophosphamide for HER2 overexpressing stage II or III breast cancer: a pilot study. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):46-53.
335. Arnould L, Arveux P, Couturier J, et al. Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clin Cancer Res*. 2007;13(21):6404-6409.
336. Bianchini G, Kiermaier A, Bianchi GV, et al. Biomarker analysis of the NeoSphere study: pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel versus trastuzumab plus docetaxel, pertuzumab plus trastuzumab, or pertuzumab plus docetaxel for the neoadjuvant treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):16.
337. Schneeweiss A, Chia S, Hegg R, et al. Evaluating the predictive value of biomarkers for efficacy outcomes in response to pertuzumab- and trastuzumab-based therapy: an exploratory analysis of the TRYPHAENA study. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):R73.
338. Gerald Batist†, Jeremy Barton, Philip Chaikin, Christine Swenson and Lauri Welles. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3(12):1739-1751.
339. Mehta LS, Watson KE, Barac A, Beckie TM, Bittner V, Cruz-Flores S, Dent S, Kondapalli L, Ky B, Okwuosa T, Piña IL, Volgman AS. Cardiovascular Disease and Breast Cancer: Where These Entities Intersect: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(8):e30-e66.
340. Cardinale D, Colomco A, Torrisi R, Sandri MT, Civelli M, Salvatici M. Trastuzumab-induced cardiotoxicity: clinical and prognostic implications of troponin I evaluation. *J Clin Oncol*. 2010;28(25):3910-3916.
341. Noam Ponde IB, Matteo Lambertini, Michael Ewer, Christine Campbell, Helene Ameels, Dimitrios Zardavas, Serena Di Cosimo, José Baselga, Jens Huober, Miguel Izquierdo, Debora Fumagalli, Ivana Bozovic-Spasojevic, Marion Maetens, Nadia Harbeck, Lajos Pusztai, Michael Berghorn, Young-Hyuck Im, Manuel Ruiz Borrego, Dar-Ren Chen, Richard Rodeheffer, Martine Piccart, Thomas Suter, Evandro de Azambuja. Cardiac biomarkers for early detection and prediction of trastuzumab and/or lapatinib-induced cardiotoxicity in patients with HER2-positive

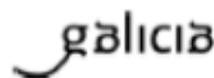
- early-stage breast cancer: a NeoALTTO sub-study (BIG 1-06). *Breast Cancer Research and Treatment*. 2018;168:631-638.
342. Loibl S, Jackisch C, Schneeweiss A, et al. Dual HER2-blockade with pertuzumab and trastuzumab in HER2-positive early breast cancer: a subanalysis of data from the randomized phase III GeparSepto trial. *Ann Oncol*. 2017;28(3):497-504.
343. Swain SM, Ewer MS, Viale G, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and standard anthracycline- and taxane-based chemotherapy for the neoadjuvant treatment of patients with HER2-positive localized breast cancer (BERENICE): a phase II, open-label, multicenter, multinational cardiac safety study. *Ann Oncol*. 2018;29(3):646-653.
344. Gavila J, Oliveira M, Pascual T, et al. Safety, activity, and molecular heterogeneity following neoadjuvant non-pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel, trastuzumab, and pertuzumab in HER2-positive breast cancer (Opti-HER HEART): an open-label, single-group, multicenter, phase 2 trial. *BMC Med*. 2019;17(1):8.
345. Ammon M, Arenja N, Leibundgut G, Buechel RR, Kuster GM, Kaufmann BA. Cardiovascular management of cancer patients with chemotherapy-associated left ventricular systolic dysfunction in real-world clinical practice. *J Card Fail*. 2013;19(9):629-634.
346. Oliveira GH, Mukerji S, Hernandez AV, Qattan MY, Banchs J, Durand JB, et al. Incidence, predictors, and impact on survival of left ventricular systolic dysfunction and recovery in advanced cancer patients. *Am J Cardiol*. 2014;113(11):1893-1898.

## VIII ANEXOS

### ANEXO 1: Aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética de Investigación de Galicia



Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética de Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel. 881 546425; [ceig@serges.es](mailto:ceig@serges.es)



#### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA-FERROL

Carlos Rodríguez Moreno, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

#### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 12/17/2015 el estudio:

**Título:** Tratamiento Sistémico Primario en pacientes con Cáncer de mama Her2 positivo Estadios II - III: Correlación de Respuesta Patológica Completa con parámetros clínicos y patológicos. Relación de dicha respuesta con la Supervivencia libre de enfermedad y Supervivencia global

**Promotor:** Servicio de Oncología Médica

**Tipo de estudio:** Otros

**Versión:**

**Código del Promotor:** SAN-TRA-2015-01

**Código de Registro:** 2015/660

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de A Coruña	Silvia Antolín Novoa

En Santiago de Compostela, a  
El secretario

NOMBRE  
RODRIGUEZ  
MORENO CARLOS  
- NIF 05614327G

Formado digitalmente por RODRIGUEZ MORENO CARLOS - NIF 05614327G  
Número de identificación DNI: 05614327G  
URL de firma: [www.serges.es](http://www.serges.es)  
URL de verificación: [www.serges.es](http://www.serges.es)  
Fecha: 2015.12.22 09:55:55 +0100

## ANEXO 2: Conformidad de la dirección del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña para la realización del proyecto de investigación



### CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

D. José Manuel Vázquez Rodríguez, Coordinador de Docencia e I+D+i del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

### C E R T I F I C A

Que conozco la propuesta realizada por el Promotor Servicio de Oncología Médica para que sea realizado en este Centro el estudio clínico con código de protocolo SAN-TRA-2015-01 titulado **"TRATAMIENTO SISTÉMICO PRIMARIO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Her2 POSITIVO ESTADIOS II – III: CORRELACIÓN DE RESPUESTA PATOLÓGICA COMPLETA CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS. RELACIÓN DE DICHA RESPUESTA CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD Y SUPERVIVENCIA GLOBAL"**, contando con la colaboración como Investigadora Principal de D<sup>a</sup>. SILVIA ANTOLÍN NOVOA.

Que acepta la realización de dicho estudio clínico en este Centro, el cual no comenzará a ejecutarse hasta que se disponga de la correspondiente autorización del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia.

Lo que firma en A Coruña, a 23 Diciembre 2015

**Xerencia de Xestión Integrada  
Coordinador de Docencia, I+D+i**

Fdo.: D. José Manuel Vázquez Rodríguez  
Coordinador de Docencia e I+D+i

Xerencia de Xestión Integrada

www.galiciasalude.es  
Tel. 981 178 000  
Xubias de Arriba, 84  
15006 A Coruña

066418  
J.C. 47

## ANEXO 3: Consentimiento informado de las pacientes



BIOBANCO A CORUÑA

### DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**TÍTULO PROYECTO INVESTIGACIÓN:** Tratamiento Sistémico Primario en pacientes con Cáncer de mama Her2 positivo Estadios II - III: Correlación de Respuesta Patológica Completa con parámetros clínicos y patológicos. Relación de dicha respuesta con la Supervivencia Libre de enfermedad y Supervivencia global  
**IDENTIDAD RESPONSABLE:** Silvia Antolín Novoa  
**SERVICIO MÉDICO:** Unidad de Mama. Servicio de Oncología  
**CENTRO HOSPITALARIO:** Xerencia Xestión Integrada A Coruña

#### FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en el proyecto de investigación "Tratamiento Sistémico Primario en pacientes con Cáncer de mama Her2 positivo Estadios II - III: Correlación de Respuesta Patológica Completa con parámetros clínicos y patológicos. Relación de dicha respuesta con la Supervivencia Libre de enfermedad y Supervivencia global."

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para ser utilizadas en investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlos y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de este Proyecto de Investigación es conocer las características del cáncer de mama y la respuesta al tratamiento de las pacientes afectadas que acepten participar con nosotros, con el fin de establecer las estrategias de prevención, diagnóstico y seguimiento clínico necesarias para mejorar la atención sanitaria proporcionada. En concreto, queremos analizar la respuesta al tratamiento en aquellas pacientes cuyo tumor ha dado positivo en la determinación del gen conocido como HER-2, una prueba que se realiza como parte de la atención sanitaria que se proporciona a las pacientes afectadas de cáncer de mama, y que aporta información relevante para establecer el tratamiento a administrar en cada caso concreto.

Debe saber que la realización de este proyecto de investigación será previamente autorizada por el Comité de Ética de Investigación de Galicia.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de Investigación y el Biobanco están reguladas por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM), el Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.

#### MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

**MUESTRAS BIOLÓGICAS:** Para el desarrollo de nuestro proyecto le solicitamos que nos autorice a utilizar las muestras de tejido y sangre que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar esta investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XOGAC), bajo la responsabilidad de Dña. Silvia Antolín Novoa, Investigadora principal de este estudio.

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que derivan de su adecuada atención médica.-

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimizadas.



