

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Programa de doctorado en Medicina 3042



TESIS DOCTORAL

Capacidad predictiva y pronóstica de factores moleculares en cáncer de mama HER2 positivo tratado con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y agentes anti-HER2

D. JOAQUÍN GAVILÁ GREGORI

DIRIGIDA POR:

DRA. DÑA. ANA LLUCH HERNÁNDEZ

DRA. DÑA. AMPARO RUIZ SIMÓN

DR. D. MIGUEL ÁNGEL CLIMENT DURÁN

FEBRERO 2017

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina



Tesis Doctoral:

Capacidad predictiva y pronóstica de factores moleculares en
cáncer de mama HER2 positivo tratado con quimioterapia
neoadyuvante basada en antraciclinas y agentes anti-HER2

Estudios de doctorado cursados:

Programa de Doctorado en Medicina 3042

Doctorando:

D. Joaquín Gavilá Gregori

Directores:

Dr. Dña. Ana Lluch Hernández

Dr. Dña. Amparo Ruiz Simón

Dr. D. Miguel Ángel Climent Durán

Dña. Ana Lluch Hernández, Doctora en Medicina y Catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia. Hemato-oncóloga y jefa del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Dña. Amparo Ruiz Simón, Doctora en Medicina y Oncóloga médica en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

D. Miguel Ángel Climent Durán, Doctor en Medicina y Oncólogo médico en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, **“Capacidad predictiva y pronóstica de factores moleculares en cáncer de mama HER2 positivo tratado con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y agentes anti-HER2”**, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Joaquín Gavilá Gregori y constituye su Tesis para optar al grado de Doctor.

Y para que conste y en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a 10 de Febrero de 2017.



Fdo.: Ana Lluch Fdo.: Amparo Ruiz Fdo.: Miguel Ángel Climent

A Lorena, por ser mi luz, por tanto tiempo que te he quitado, por sacrificarlo todo por mí, por la vida tan maravillosa que me das, porque nada tiene sentido sin vosotros y porque todo, todo te lo debo a ti. Posiblemente te lo he dicho menos veces de las debidas, pero quiero que sepas que te admiro en todos los sentidos.

A Marcos, Martín y Pablo, mis tres soles, por aprender gracias a vosotros lo que es ser feliz y enseñarme a darle importancia a las cosas que realmente la tienen.

A mi madre, por siempre estar a mi lado sin esperar un te quiero a cambio, por ser una inagotable luchadora y enseñarme a serlo, por ser la primera en creer en mí.

A mi padre, por ser la persona que me gustaría ser, porque éste es tu regalo, porque esta tesis resume todo tu esfuerzo vital y tantos momentos sin disfrutar de tu familia.

A mi hermano, por ser mi mejor compañero, por todo lo que hemos pasado y por todos los valores que he aprendido de ti.

Y porque no tendré tiempo suficiente para agradecerlos todo lo que me habéis dado.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Lluch, por su estímulo continuo en realizar esta tesis y ser un ejemplo como persona, investigadora y por su carrera profesional intachable.

A la Dra. Amparo Ruiz, por ser mi segunda madre. Por apoyarme siempre y darme todo por mí. Por ser la mejor maestra a nivel personal y científico. Mil gracias por tu ayuda y sobretodo por haber hecho mejor persona de mí.

Al Dr. Miguel Ángel Climent, la figura a la que algún día querría parecerme. Un gran amigo y mi infalible consejero del que aprendo en cada tertulia. Gracias por creer en mí y mostrarme que la mejor forma de ser respetado es siendo siempre coherente.

Al Dr. Francisco Gozalbo, por todas las mañanas que te he robado con el microscopio, porque esta tesis la deberías haber firmado tú. Gracias por ser un gran amigo dentro y fuera del hospital.

Al Dr. José Antonio López-Guerrero, porque gracias a tu impagable ayuda ha sido posible este trabajo, nunca sabré como agradecerte todo.

A María, Mireia y Gema, porque ellas son las artífices de todo este trabajo. Nunca podré agradecereros vuestra colaboración, sois un equipazo.

Al Dr. Vicente Guillem, mi mentor. Porque has sido una referencia para mí en todos los sentidos, por acogerme como a un hijo desde el primer día. Por darme el primer empujón y todos los que han seguido, por enseñarme a tener los pies en el suelo, por darme todo sin condiciones.

A Ángel Guerrero, mi amigo. Te he echado mucho de menos estos años, pero, esta tesis es tan tuya como mía. Gracias por orientarme en cada paso y en estimularme todos los días.

A las Dras. María José Juan y Elena Oliete, por vuestra ayuda desinteresada desde el primer momento en este proyecto. Sois dos soles que la vida me ha permitido conocer.

Al Servicio de Oncología, con mención especial a Virtudes por ser la mejor persona que conozco y conoceré y a Miguel Ángel por ser el mejor compañero y el mejor “pare” que se puede tener.

A Luís Aparicio, por toda tu ayuda con este proyecto.

Al Dr. Javier Garde, por enseñarme desde el primer día de residencia a cuidar de la mejor manera a los pacientes, por tantas tardes aprendiendo estadística a tu lado, pero sobretodo por demostrarme cada año que eres un gran amigo.

A Charo y Salvador, nunca os podré agradecer toda vuestra impagable ayuda, gracias por tratarme como un hijo más.

A Carmelo, esta vida no podría haber sido tan fantástica sin tu compañía. Eres irrepetible, no hay espacio, líneas, ni texto suficiente para agradecerte el gran amigo que has sido. Te admiro y siempre te querré.

A mis amigos, que son uno de los pilares básicos que sostienen mi vida. En especial a Miquel, siempre a mi lado, pero, sobretodo en los malos momentos. A Pere, amigo desinteresado y grandísima persona, tú sabes que parte de esta tesis es tuya. A Rubén, la mejor sorpresa de estos años, un verdadero amigo, animándome y creyendo en mí todos los días.

Mi más emotiva dedicatoria para todas aquellas pacientes que han permitido realizar esta actividad investigadora, unas por participar en ella, otras por animarme constantemente a llevarla a cabo. A todos aquellos a los que he podido acompañar hasta el final, que me han dado su mano sin perder la sonrisa, y pese a todo el sufrimiento que esta enfermedad conlleva, me han enseñado lo que es ser valiente y disfrutar de cada segundo de la vida. Siempre os llevaré en mi recuerdo.

Para alcanzar algo que nunca has tenido tendrás que hacer algo que nunca hiciste

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades del cáncer de mama	2
1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama.....	2
1.1.2. Historia natural del cáncer de mama	5
1.1.3. Clasificación histológica.....	8
1.1.3.1. Carcinoma ductal.....	8
1.1.3.2. Carcinoma lobulillar	9
1.1.4. Clasificación Inmuno-histoquímica y molecular	10
1.1.5. Estadificación.....	16
1.1.6. Tratamiento quirúrgico del cáncer de mama en estadios iniciales	16
1.1.7. Tratamiento radioterápico adyuvante del cáncer de mama	20
1.1.8. Tratamiento sistémico adyuvante del cáncer de mama.....	22
1.1.8.1. Quimioterapia adyuvante	22
1.1.8.2. Tratamiento adyuvante en tumores HER2 positivo.....	24
1.1.8.3. Hormonoterapia adyuvante	25
1.2. Generalidades del tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama	27
1.2.1. Indicaciones del tratamiento neoadyuvante	27
1.2.2. Cirugía tras tratamiento neoadyuvante	29
1.2.3. Radioterapia tras tratamiento neoadyuvante	32
1.2.4. Tratamiento sistémico neoadyuvante	33
1.2.4.1. Introducción.....	33
1.2.4.2. Estudios no aleatorizados de quimioterapia neoadyuvante	34
1.2.4.3. Estudios aleatorizados de quimioterapia neoadyuvante.....	35
1.2.4.4. Esquema de elección en el tratamiento neoadyuvante	37
1.2.4.5. Estudios de quimioterapia neoadyuvante en CM HER2 positivo.....	39
1.2.5. Valoración de respuesta al tratamiento neoadyuvante	45
1.3. Factores pronósticos y predictivos al tratamiento neoadyuvante.....	46
1.3.1. Introducción: la importancia de la respuesta completa patológica	46
1.3.2. Factores predictivos de RCp	51
1.3.3. Factores pronósticos tras quimioterapia neoadyuvante.....	56
1.4. Mecanismos de resistencia al tratamiento neoadyuvante en población HER2	
positiva	58
1.4.1. Introducción	58
1.4.2. Mecanismo de acción y resistencia a Trastuzumab	60
1.4.3. Activación de la vía de señalización PI3K-AKT como mecanismo de resistencia	
a terapias anti-HER2	64
1.4.3.1. PI3KCA	64
1.4.3.2. AKT.....	73
1.4.3.3. PTEN.....	75
1.4.3.4. 4EBP1.....	79
1.4.4. Infiltrado linfocitario como factor predictivo y pronóstico en CM Her2-positivo	
.....	81
1.4.4.1. Introducción.....	81
1.4.4.2. Papel del TIL como factor pronóstico y predictivo de RCp	84

2. Hipótesis y Objetivos.....	90
2.1. Hipótesis.....	91
2.2. Objetivo Principal	92
2.3. Objetivos Secundarios	92
3. Diseño y Metodología	94
3.1. Diseño	95
3.2. Pacientes	95
3.3. Criterios de Inclusión	96
3.4. Criterios de exclusión.....	97
3.5. Período de estudio.....	97
3.6. Pautas clínicas/quirúrgicas	97
3.7. Recogida de Datos	98
3.8. Determinaciones inmuno-histoquímicas a realizar.....	100
3.9. Estudio del infiltrado linfocitario tumoral	101
3.10. Estudio de mutaciones de PI3KCA	104
3.11. Variables.....	104
3.12. Método estadístico	105
3.13. Aspectos éticos	107
4. Resultados y Desarrollo Argumental	108
4.1. Análisis de la población del estudio	109
4.1.1. Descripción de las principales características de la muestra analizada.....	109
4.1.1.1. Descripción del año del diagnóstico del CM	111
4.1.1.2. Edad de la paciente en el momento del diagnóstico del CM.....	112
4.1.1.3. Tamaño clínico tumoral al diagnóstico del CM.....	112
4.1.1.4. Afectación clínica ganglionar al diagnóstico del CM.....	113
4.1.1.5. Estadio clínico tumoral al diagnóstico del CM	114
4.1.1.6. Características histológicas del tumor primario al diagnóstico del CM .	115
4.1.1.7. Expresión de RH del tumor primario al diagnóstico del CM	118
4.1.1.8. Determinación de HER2 en el tumor primario al diagnóstico del CM ...	120
4.1.1.9. Esquema de QNA e intensidad de dosis administrada	120
4.1.1.10. Tipo de cirugía realizada tras completar la QNA	121
4.1.1.11. Tratamiento adyuvante recibido	122
4.1.2. Evaluación de la respuesta tras la QNA	123
4.1.2.1. Evaluación de la respuesta clínica tras completar la QNA.....	123
4.1.2.2. Evaluación de la respuesta patológica tras la intervención quirúrgica..	124
4.1.3. Análisis de la expresión de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica	125
4.1.4. Análisis de la expresión de las variables según variables clínico-patológicas	130
4.1.4.1. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la edad de la	130
paciente al diagnóstico	130
4.1.4.2. Análisis de la expresión de las variables a estudio según el tamaño clínico	131
tumoral al diagnóstico	131
4.1.4.3. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la afectación	132
clínica ganglionar al diagnóstico	132
4.1.4.4. Análisis de la expresión de las variables a estudio según el grado	133
histológico	133

4.1.4.5. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la expresión de KI67	134
4.1.4.6. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la expresión de receptores hormonales.....	135
4.1.5. Análisis de la expresión de las variables a estudio en la enfermedad residual	136
4.1.6. Análisis comparativo de la expresión de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica y la enfermedad residual correspondiente	138
4.2. Tasa de respuesta completa patológica y análisis de factores predictivos de respuesta completa patológica.....	139
4.3. Factores predictivos de respuesta completa patológica en el análisis de regresión logística univariante y multivariante.....	145
4.4. Supervivencia libre de progresión y análisis de factores pronósticos.....	147
4.4.1. SLP en función de las variables clínicas	149
4.4.2. SLP en función de las variables histo-patológicas	150
4.4.3. SLP en función de la RCp	152
4.4.4. SLP en función de la alteración de la vía PI3K	153
4.4.5. SLP en función del infiltrado linfocitario estromal	155
4.4.6. Factores pronósticos de SLP en el análisis de regresión logística multivariante	156
4.5. Supervivencia global y análisis de factores pronósticos.....	156
4.5.1. SG en función de las variables clínicas	159
4.5.2. SG en función de las variables histo-patológicas.....	161
4.5.3. SG en función de la RCp.....	163
4.5.4. SG en función de la alteración en la vía PI3K.....	163
4.5.5. SG en función del infiltrado linfocitario estromal	166
4.5.6. Factores pronósticos de SG en el análisis de regresión logística multivariante	167
5. Discusión.....	168
6. Conclusiones	193
7. Bibliografía.....	196
8. Anexos	228

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Cáncer más frecuente en mujeres europeas.

Figura 2. Número de casos de cáncer en mujeres españolas.

Figura 3. Porcentaje de muertes por cáncer de mama en España.

Figura 4 y 5. Alteraciones celulares que confieren malignidad.

Figura 6. Carcinoma ductal in situ.

Figura 7. Carcinoma ductal infiltrante.

Figura 8. Carcinoma lobulillar in situ.

Figura 9. Carcinoma lobulillar infiltrante.

Figura 10. Algoritmo del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama en estadios iniciales.

Figura 11. Asociación entre supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global (SG) con las tres definiciones de respuesta completa patológica (RCp).

Figura 12. Asociación entre supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global (SG) con la respuesta completa patológica (RCp).

Figura 13. Resumen mecanismos de acción de Trastuzumab.

Figura 14. Mecanismos de resistencia a trastuzumab: formas truncadas (p95) y mutaciones en HER2.

Figura 15. Vía de señalización de fosfatidinositol 3-quinasa (PI3K).

Figura 16. Mecanismo de acción de 4EBP1.

Figura 17. Tasa de respuestas completas patológicas según la categoría de TIL.

Figura 18. Diagrama de selección de pacientes.

Figura 19. Estandarización y guías para la evaluación del TIL.

Figura 20. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el año de diagnóstico del CM.

Figura 21. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la edad al diagnóstico del CM.

Figura 22. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según tamaño clínico tumoral al diagnóstico del CM.

Figura 23. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según afectación clínica ganglionar al diagnóstico del CM.

Figura 24. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según estadio clínico al diagnóstico de CM.

Figura 25. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el tipo histológico al diagnóstico de CM.

Figura 26. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el grado histológico al diagnóstico de CM.

Figura 27. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión de KI67 al diagnóstico de CM.

Figura 28. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión de los receptores hormonales al diagnóstico de CM.

Figura 29. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión del receptor estrogénico al diagnóstico de CM.

Figura 30. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión del receptor de progesterona al diagnóstico de CM.

Figura 31. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión de HER2 al diagnóstico de CM.

Figura 32. Distribución de las pacientes según el esquema de quimioterapia neoadyuvante utilizado.

Figura 33. Distribución de las pacientes según el tipo de cirugía practicada tras la quimioterapia neoadyuvante.

Figura 34. Análisis de la expresión de PTEN mediante la técnica de IRS score en la biopsia diagnóstica.

Figura 35. Análisis de la expresión de PTEN mediante la técnica de Hscore en la biopsia diagnóstica.

Figura 36. Análisis de la expresión de PAKT mediante la técnica de Hscore en la biopsia diagnóstica.

Figura 37. Análisis de la expresión de P4EBP1 mediante la técnica de Hscore en la biopsia diagnóstica.

Figura 38. Análisis del estado mutacional de PIKCA en la biopsia diagnóstica.

Figura 39. Análisis del infiltrado linfocitario tumoral estromal en la biopsia diagnóstica.

Figura 40. Supervivencia libre de progresión en la población global del estudio.

Figura 41. Supervivencia libre de progresión en función del tamaño tumoral al diagnóstico.

Figura 42. Supervivencia libre de progresión en función del estadio clínico al diagnóstico.

Figura 43. Supervivencia libre de progresión en función de la expresión del receptor hormonal.

Figura 44. Supervivencia libre de progresión en función de la amplificación del gen HER2 en la enfermedad residual.

Figura 45. Supervivencia libre de enfermedad en función de la RCp.

Figura 46. Supervivencia libre de enfermedad en función de la progresión de PTEN mediante IRS-score.

Figura 47. Supervivencia libre de progresión en función de la expresión elevada de PTEN en la biopsia diagnóstica y/o enfermedad residual.

Figura 48. Supervivencia libre de progresión en función de la activación de la vía PI3K.

Figura 49. Supervivencia libre de progresión en función del TIL estromal en la biopsia diagnóstica.

Figura 50. Supervivencia global en la población global del estudio.

Figura 51. Supervivencia global en función de la edad al diagnóstico de las pacientes.

Figura 52. Supervivencia global en función del tamaño tumoral al diagnóstico.

Figura 53. Supervivencia global en función del estadio clínico al diagnóstico.

Figura 54. Supervivencia global en función de la expresión de los RH en la biopsia diagnóstica.

Figura 55. Supervivencia global en función de la amplificación del gen HER2 en la enfermedad residual.

Figura 56. Supervivencia global en función de la respuesta completa patológica.

Figura 57. Supervivencia global en función de la expresión de PTEN según IRS-score en la biopsia diagnóstica.

Figura 58. Supervivencia global en función de la sobre-expresión de PTEN en la biopsia diagnóstica o en la enfermedad residual.

Figura 59. Supervivencia global en función de la alteración de la vía PI3K.

Figura 60. Supervivencia global en función del infiltrado linfocitario estromal en la biopsia diagnóstica.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos histológicos /moleculares del cáncer de mama infiltrante.

Tabla 2. Clasificación IHQ y comportamiento de los subtipos histológicos del cáncer de mama infiltrante.

Tabla 3. Supervivencia global y recaída locorregional en estudios que comparan la mastectomía radical con la cirugía conservadora.

Tabla 4. Estudios publicados con Trastuzumab adyuvante.

Tabla 5. Estudios publicados con hormonoterapia adyuvante.

Tabla 6. Estudios no aleatorizados de quimioterapia neoadyuvante en CM operable.

Tabla 7. Diferentes Clasificaciones de la respuesta completa patológica.

Tabla 8. Factores biológicos y patológicos asociados con respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

Tabla 9. Estudios que exploran la eficacia de la QNA según subtipos de CM clasificados genética o inmuno-histoquímicamente.

Tabla 10. Resultados clínicos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratado con trastuzumab, pertuzumab y lapatinib de acuerdo al estado de PI3KCA.

Tabla 11. Resultados clínicos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratado con trastuzumab y lapatinib de acuerdo al estado de AKT.

Tabla 12. Resultados clínicos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratado con trastuzumab, pertuzumab y lapatinib de acuerdo al estado de PTEN.

Tabla 13. Características basales de las pacientes incluidas en el estudio.

Tabla 14. Evaluación de la Respuesta Clínica tras el tratamiento neoadyuvante.

Tabla 15. Evaluación de la Respuesta Patológica tras el tratamiento neoadyuvante.

Tabla 16. Análisis de la determinación de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica.

Tabla 17. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la edad.

Tabla 18. Análisis de la expresión de variables a estudio en función del tamaño clínico tumoral.

Tabla 19. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la afectación clínica ganglionar.

Tabla 20. Análisis de la expresión de variables a estudio en función del grado histológico.

Tabla 21. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la expresión de KI67.

Tabla 22. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la expresión de receptores hormonales.

Tabla 23. Análisis de la determinación de las variables a estudio en la enfermedad residual.

Tabla 24. Análisis de la expresión de las variables a estudio en la enfermedad residual.

Tabla 25. Concordancia entre la biopsia diagnóstica y la enfermedad residual.

Tabla 26. Factores predictivos asociados a RCp.

Tabla 27. Factores predictivos asociados a RCp en el subgrupo de tumores RH positivos.

Tabla 28. Factores predictivos asociados a RCp en el subgrupo de tumores RH negativos.

Tabla 29. Factores predictivos de RCp en el análisis de regresión logística univariante.

Tabla 30. Tasa de SLP a 5 años según los distintos factores pronósticos a estudio.

Tabla 31. Tasa de SG a 5 años según los distintos factores pronósticos a estudio.

LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

4EBP1	Proteína 1 de unión al factor de Iniciación 4E
AC	Adriamicina, Ciclofosfamida
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ANAS	Anastrozol
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNO	Arimidex-Nolvadex Trial
ASCO	American Society Cancer Oncology
ATAC	Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination
ATLAS	Adjuvant Tamoxifen Longer Against Shorter
ATTOM	Adjuvant Tamoxifen Treatment Offer More
BCIRG	Breast Cancer International Research Group
BIG1-98	Breast International Group 1-98
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CALGB	Cancer And Leukemia Group B
CC	Cirugía Conservadora
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
CLI	Carcinoma Lobulillar Infiltrante
CLIS	Carcinoma Lobulillar In Situ
CM	Cáncer de Mama
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexate, 5-Fluorouracilo
cN	Estadio Ganglionar Clínico
ColS	Colaboradores
cN	Estadio ganglionar clínico
EIF4E	Factor de iniciación eucariótico 4E
EBCTCG	Early Breast Cancer Trailists' Collaborative Group
EEUU	Estados Unidos
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
EORTC	European Organization for Research and Treatment on Cancer
EPIGEICAM	Grupo de Epidemiología de GEICAM
FAC	5-Fluorouracilo, Adriamicina, Ciclofosfamida
FEC	5-Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida

FDA	Food and Drug Administration
FINHER	Finland Herceptin Trial
FISH	Fluorescent in situ hybridation
FIVO	Fundación Instituto Valenciano de Oncología
GEICAM	Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama
GC	Ganglio Centinela
GSK3	Quinasa glicógeno sintetasa 3
Gy	Grays
HE	Hematoxilina-eosina
HER2	Proteína her2/neu
HERA	Herceptin Adjuvant Trial
HR	Hazard Ratio
IA	Inhibidores de Aromatasa
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalo de Confianza
IES	Intergroup Exemestane Study
IGFR-1	Insulin growth factor receptor 1
IGR	Institut Gustave Roussy
IHQ	Inmuno-histoquimia
KD	Kilodalton
Ki67	Marcador de Proliferación Celular
L	Lapatinib
LA	Linfadenectomía axilar
M	Metástasis
MAPK	Vía de la proteína-quinasa
MRM	Mastectomía Radical Modificada
MS	Mastectomía simple
MTOR	Diana de la rapamicina en células de mamíferos
N	Estadio Ganglionar
N	Tamaño Muestral
NATO	Nolvadex Adjuvant Trial Organization
NCCTG	North Central Cancer Treatment Group
NCI	National Cancer Institute
NGS	Next Generation Sequency
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odd Ratio
OSNA	One step acid nucleic amplification
P	P-valor

P70S6K1	Proteína ribosomal quinasa 1 S6 fosforilada
PAM50	Análisis Genómico PAM50
PD1	Proteína 1 de muerte celular programada
PDK1	Plecstrina de la quinasa dependiente de fosfoinositol
Pi3K	Fosfatidinositol 3-quinasa
Pi3KCA	Unidad catalítica de fosfo-inositol-3-quinasa
pN	Estadio Ganglionar Patológico
PTEN	Fosfatasa y homologo de la tensina
PTZ	Pertuzumab
QNA	Quimioterapia neoadyuvante o primaria
pT	Estadio Tumoral Patológico
RC	Respuestas Completas
RCp	Respuesta completa patológica
RE	Receptores Estrogénicos
REMARK	Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies
RH	Receptores Hormonales
RLR	Recaída Locorregional
RM	Resonancia Magnética
RP	Receptores de Progesterona
RPM	Reconstrucción postmastectomía
RR	Riesgo Relativo
RT	Radioterapia
SG	Supervivencia Global
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SLED	Supervivencia libre de enfermedad a distancia
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
SLR	Supervivencia libre de recaída
TAC	Docetaxel, Adriamicina, Ciclofosfamida
TC	Docetaxel, ciclofosfamida
TEXT	Tamoxifen and Exemestane Trial
TIL	Infiltrado tumoral linfocitario
Tis	Carcinoma In Situ
TN	Triple Negativo
TNM	Clasificación de Tumores Malignos (Tamaño, Afectación Ganglionar, Metástasis)
TTZ	Trastuzumab
VNR	Vinorelbina
WHO	World Health Organization Classification of Tumours

LISTADO DE ANEXOS

Anexo I. Clasificación histológica de los tumores epiteliales de mama propuesta por la OMS.

Anexo II. Tamaño tumoral (T). Clasificación tumoral de la American Joint Committee on cancer (AJCC).

Anexo III. Ganglios linfáticos regionales. Afectación clínica (cN). Clasificación tumoral de la AJCC.

Anexo IV. Afectación patológica ganglios linfáticos (pN). Clasificación tumoral de la AJCC.

Anexo V. Metástasis a distancia (M). Clasificación tumoral de la AJCC.

Anexo VI. Estadios del cáncer de mama. Clasificación tumoral de la AJCC.

Anexo VII. Hoja de consentimiento informado.

1. Introducción

1.1 Generalidades del cáncer de mama

1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es el tumor con mayor incidencia en Europa, en 2012 se diagnosticaron 458.718 casos nuevos (1). En España fueron 25.215, ocupando una posición intermedia entre los países de Europa Oriental y Occidental, con una tasa estandarizada de incidencia de 67.7 casos por 100.000 mujeres tal y como se evidencia en las figuras 1 y 2 (2). La probabilidad que presenta una mujer de desarrollar un CM a lo largo de la vida es de una de cada ocho mujeres (8-11.7%) (1)(2)(3)(4). En los últimos 30 años, la incidencia del CM muestra una tendencia ascendente con un incremento del 2-3% anual, justificado posiblemente por el incremento de la esperanza de vida media, cambios en los patrones reproductivos y en los hábitos de vida, junto a un aumento en la administración de forma indiscriminada y durante largos periodos de tiempo de terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas en países desarrollados como Estados Unidos (5).

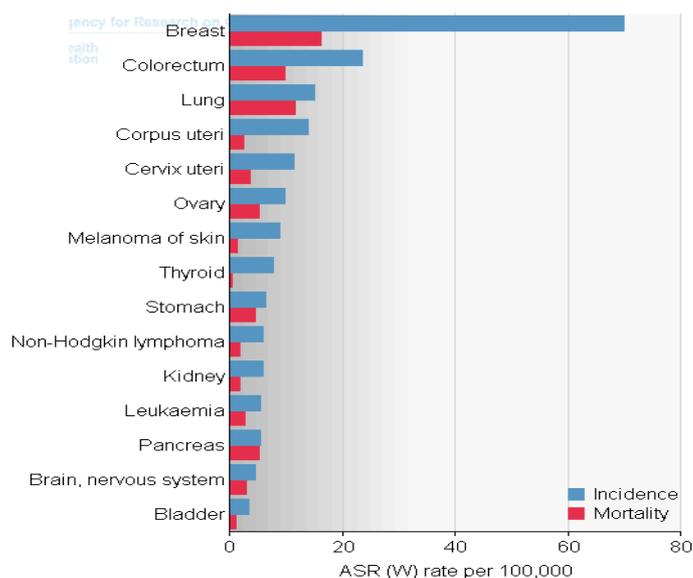


Figura 1. Cáncer de mama es el tumor con mayor incidencia en mujeres en Europa. Tomada de web GLOBOCAN (1)

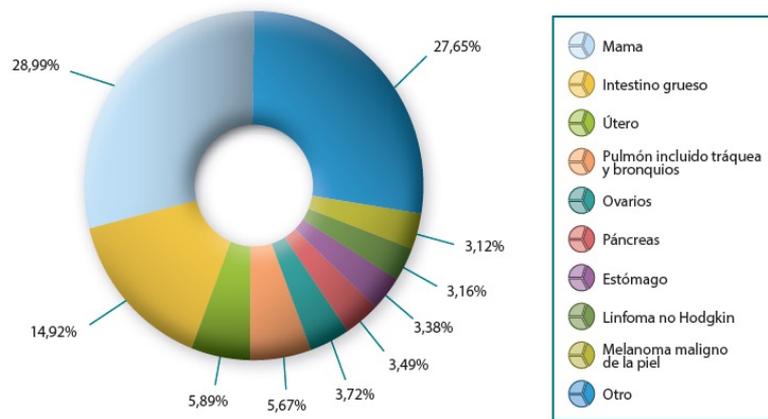


Figura 2. Incidencia de cáncer en mujeres españolas en el año 2012 (Porcentaje). El CM representa el 29% de todos los cánceres en las mujeres españolas. Tomada de Las cifras de Cáncer en España 2016(2)

En el año 2012 fue la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en España (6.075 muertes) seguido en segundo lugar por el cáncer de colon (5.985 muertes) (GLOBOCAN 2012) (figura 3). La tasa de mortalidad por CM en España aumentó hasta el inicio de los años 90, alcanzando un pico de 25 por cada 100.000 mujeres y descendiendo posteriormente un 2% anual desde 1993. En un período de seguimiento entre los años 1952-2011 se produjeron dos puntos de descenso marcado en los años 1993 y 2000, manteniéndose la curva estable en el año 2005, debido al desarrollo de programas de diagnóstico precoz y avances en las técnicas diagnósticas, tratamiento quirúrgico, radioterápico y sistémico (6).

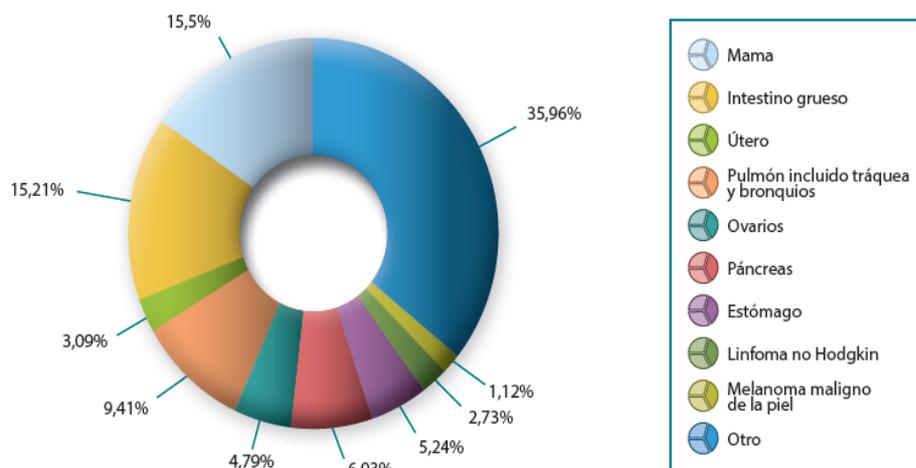


Figura 3. Mortalidad estimada por tipo de cáncer en mujeres (porcentaje). Tomada de las cifras de Cáncer en España 2016 (2)

Respecto a la supervivencia global (SG), según los datos recientes del estudio EUROCORE-5, entre los años 1999-2007 la SG estimada por CM en el primer año después del diagnóstico es del 96%, disminuye progresivamente hasta un 86% a los tres años y al 82% tras cinco años (7).

Una excelente fuente de datos epidemiológicos nacional es el estudio retrospectivo “El Álamo” desarrollado por el grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM), que recoge datos demográficos, evolutivos y terapéuticos de 10.675 pacientes diagnosticados de CM en 35 hospitales españoles entre 1990 y 2000. Existen tres registros diferentes que incluyen períodos de tiempo consecutivos: El Álamo I recoge datos de pacientes diagnosticados entre 1990-1993; El Álamo II entre 1994-1997 y el más reciente El Álamo III entre 1998-2000. La supervivencia descrita en el Álamo III a los cinco años tras el diagnóstico fue superior al 80%. Una comparación entre los estudios Álamo I y Álamo II muestra un incremento estadísticamente significativo de la supervivencia en el segundo estudio (83% a los 5 años) respecto al primero (75% a los 5 años), debido posiblemente al incremento de

casos diagnosticados en estadio I, pero, también a mejoras terapéuticas, tal y como estudios anteriores habían evidenciado (8).

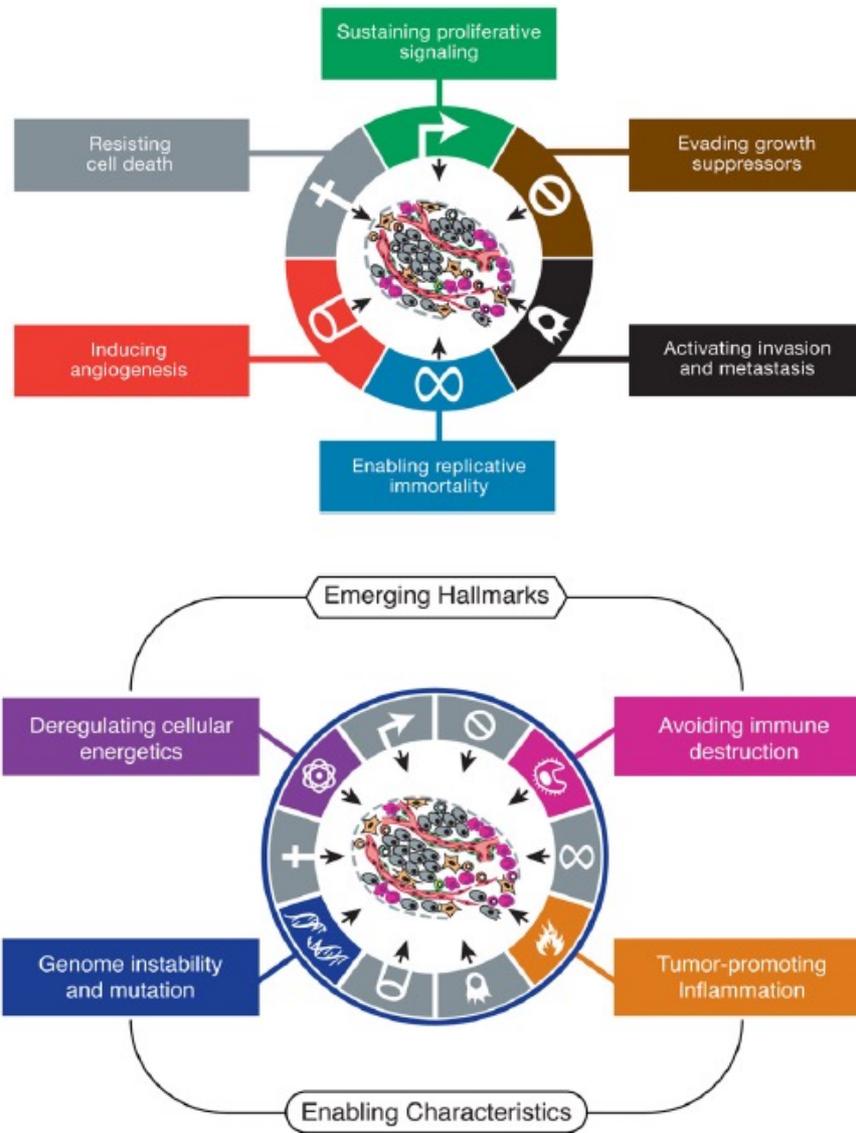
Múltiples factores de riesgo se han descrito implicados en el desarrollo de la enfermedad y son determinantes en el tratamiento y pronóstico de la misma; entre ellos encontramos: predisposición genética, edad avanzada, menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad, consumo de alcohol o tabaco, dieta rica en grasas, obesidad, ausencia de ejercicio físico, uso de terapia hormonal sustitutiva, enfermedad mamaria proliferativa, carcinoma de la mama contralateral o endometrio, radiaciones ionizantes sobre tórax (8–23).

En cuanto a la predisposición genética, los antecedentes familiares representan un factor de riesgo para el cáncer de mama; entre el 5 y el 10% de los cánceres de mama son atribuibles a la herencia de un gen autosómico dominante. La probabilidad de la herencia genética aumenta cuando son múltiples los familiares afectados y el cáncer aparece a edades tempranas. Las mutaciones de la línea germinal en: los genes BRCA1-BRCA2, el gen supresor tumoral p53 y el gen ATM (ataxia - telangiectasia) explican la mayor parte de los cánceres familiares con herencia autosómica (24,25).

1.1.2. Historia natural del cáncer de mama

Existen múltiples factores implicados en las modificaciones de las células del tejido normal hasta su evolución al CM. No hay una causa única sino que es el resultado de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos los que conduce a que una célula normal adquiera características tumorales. El crecimiento celular es un proceso regulado que responde a las necesidades específicas del organismo. En ocasiones, tal y como ilustran las figuras 4 y 5, debido a causas tanto exógenas como endógenas, los controles que regulan la multiplicación celular, desde proliferación celular, muerte celular y la angiogénesis entre otros, no funcionan adecuadamente y una célula empieza a crecer de forma descontrolada originando lo que conocemos como

neoplasia, cáncer o “tumor” (26). En la última década se han añadido otras características como son el metabolismo energético, la inflamación y la capacidad de estas células de evitar la reacción inmune del organismo huésped (27).



Figuras 4 y 5. Alteraciones celulares que confieren malignidad. Tomada de Hanahan y Weinberg(27). Las células tumorales han de presentar seis alteraciones esenciales en su fisiología que conjuntamente comportarán crecimiento maligno.

El tejido mamario sufre una acumulación de estos cambios genéticos y epigenéticos que convierten a una célula normal en una célula neoplásica atravesando por diferentes etapas histopatológicas en función de características morfológicas e inmuno-histoquímicas, como son: la hiperplasia benigna, la hiperplasia atípica, el carcinoma ductal in situ o no infiltrante y finalmente el carcinoma infiltrante. El proceso de iniciación, progresión y desarrollo hasta la metástasis tumoral es desconocido (26,27).

En el CM invasivo o infiltrante, en la historia natural de la enfermedad van a influir tres aspectos: velocidad de crecimiento del tumor, vías de diseminación local y vías de diseminación a distancia. Como todos los tumores de naturaleza epitelial, los principales mecanismos de diseminación del CM son la vía linfática y la vía hematógena, responsables respectivamente de las recaídas loco-regionales (RLR) y recaídas a distancia. El pronóstico de la paciente será peor cuanto mayor es el tamaño tumoral y mayor número de metástasis ganglionares axilares (9,28).

Desde el desarrollo de los programas de diagnóstico precoz, aproximadamente el 90% de los CM son diagnosticados en estadios localizados y localmente avanzados, tan sólo el 10% presentan diseminación a distancia al diagnóstico (8). En cuanto al tamaño tumoral más de la mitad de los mismos se tratarán de tumores menores a 5 cm. El 60% de los pacientes no presentarán afectación ganglionar. Por otro lado, en el CM avanzado las localizaciones metastásicas más frecuentes son el esqueleto óseo, pulmón, hígado, ganglios y sistema nervioso central (8,10).

Entre los factores pronósticos importantes del CM se encuentran la edad de la paciente, el tamaño del tumor, la presencia de metástasis a ganglios linfáticos, el

subtipo histológico, el grado histológico y la expresión en el tejido tumoral de receptores hormonales (RH), estrógenos (RE) y progesterona (RP), así como el gen HER2/neu y su proteína correspondiente HER2 (29,30). Estos últimos han cobrado gran relevancia en los últimos años, siendo objeto de investigaciones debido a que influyen de manera significativa en el pronóstico de la paciente y en la conducta médica que se debe seguir (31,32).

1.1.3. Clasificación histológica

La clasificación histológica del CM se basa en la evaluación histopatológica de las muestras obtenidas mediante punción, biopsia o intervención quirúrgica. La más empleada es la clasificación WHO (World Health Organization Classification of Tumours) / OMS (Organización Mundial de la Salud) 2012 (33) (Anexo I).

En el CM, con diferencia, los dos subtipos histológicos descritos con mayor frecuencia son el subtipo ductal que abarca el 80-85% de los casos y el lobulillar (15-20%). Ambos los dividiremos según su capacidad invasiva en infiltrantes y no infiltrantes o in situ.

1.1.3.1. Carcinoma ductal

- a) *Carcinoma ductal in situ (CDIS)*. Se trata de una proliferación no invasiva que representa el 15-20% de todos los CM (34) (figura 6).

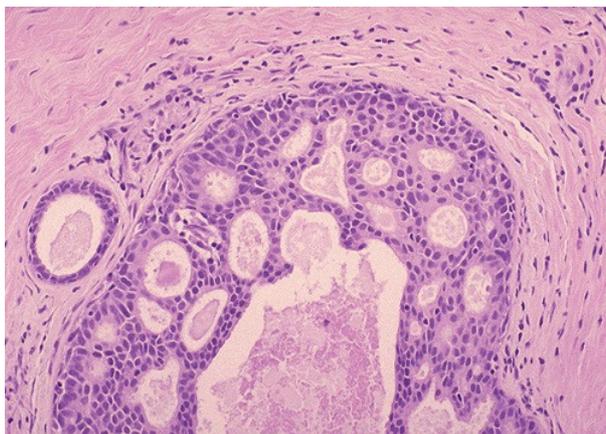


Figura 6. Carcinoma ductal in situ.

- b) Carcinoma ductal infiltrante.* El carcinoma ductal infiltrante (CDI) es la forma invasiva del carcinoma ductal y como se ha comentado previamente es el subtipo histológico más frecuente del CM (35) (figura 7).

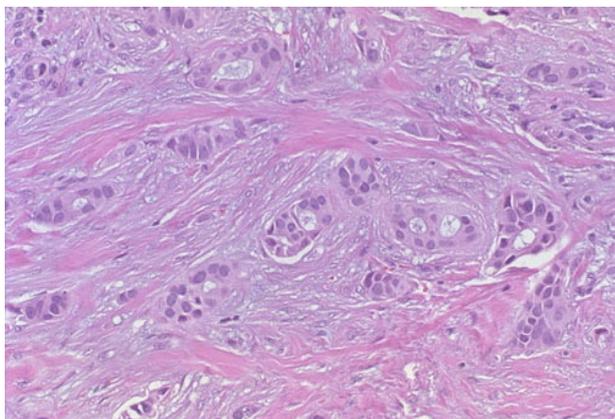


Figura 7. Carcinoma ductal infiltrante.

1.1.3.2. Carcinoma lobulillar

- a) Carcinoma lobulillar in situ (CLIS).* Se trata de un subtipo poco frecuente, representando el 0.5-4% de todas los CM (36) (figura 8).

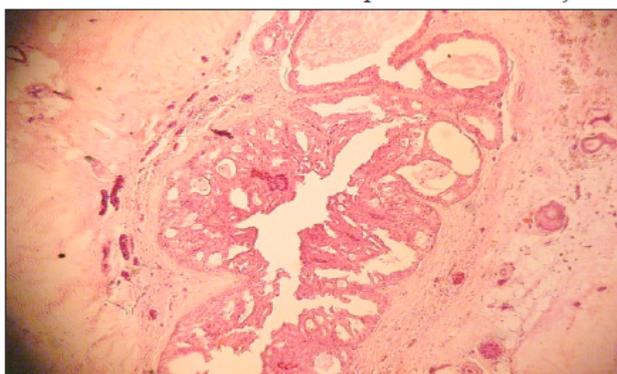


Figura 8. Carcinoma lobulillar in situ.

b) Carcinoma lobulillar infiltrante. El carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) se origina en los acinos glandulares y representa el 5% de los CM y con frecuencia es multicéntrico y bilateral (37) (figura 9).

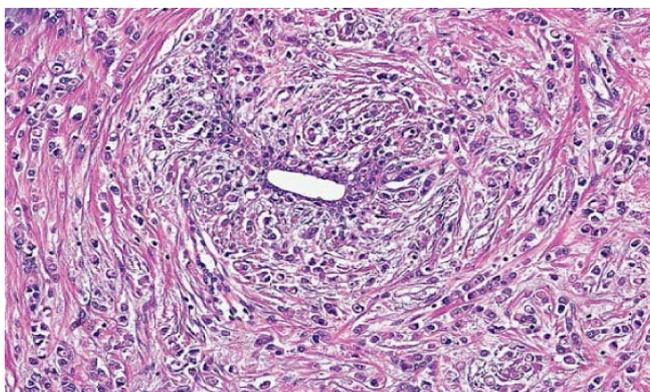


Figura 9. Carcinoma lobulillar infiltrante.

1.1.4. Clasificación Inmuno-histoquímica y molecular

El CM no puede ser considerada como una enfermedad única, y por tanto, con un idéntico tratamiento en cualquier escenario. Con el conocimiento de factores como el grado histológico, el índice de proliferación, la expresión de RH y más recientemente de la proteína HER2, podemos combinar estos tres aspectos y clasificar el CM en diferentes subtipos con un tratamiento específico para cada uno de ellos.

La sobre-expresión de los RH, RE y RP, se considera como el mejor marcador pronóstico y predictivo en esta enfermedad y define una población de pacientes con CM candidatas a recibir una terapia hormonal (38). A finales del siglo XIX el doctor Beatson objetivó tras la extirpación de los ovarios en una paciente con CM una clara reducción en el tamaño tumoral. Fue la primera señal de la dependencia de este tipo de neoplasia de las hormonas femeninas.

Multitud de estudios han confirmado que la SG y la supervivencia libre de progresión (SLP) son mayores en pacientes con CM RE+/RP+, esto junto a la existencia de terapias hormonales específicas obligan a su determinación en la práctica clínica habitual. La sobre-expresión de RE se asocia también con tumores bien diferenciados. El RP parece ser un factor predictivo independiente, en especial en mujeres postmenopáusicas, donde su falta de expresión se traduce con un peor pronóstico (39,40).

Los genes que codifican los receptores de factores de crecimiento son uno de los más alterados en el proceso de carcinogénesis, siendo su amplificación una de las alteraciones celulares más conocidas, y en particular la del gen HER2/neu. Entre el 15-25% de los cánceres de mama tienen el gen HER2/neu amplificado, lo que produce una sobreexpresión de la proteína HER2. Estos son los tumores que se conocen como HER2 positivo (41). La proteína HER2 es una glicoproteína transmembrana de 185 kilodaltons (KD), con actividad de receptor tirosín-quinasa; pertenece a la familia de los EGFR (epidermal growth factor receptor: receptor del factor de crecimiento epidérmico,) y, junto con los otros tres miembros de esta familia, interviene en el crecimiento, la diferenciación y supervivencia celular (42). A diferencia de otras proteínas de la familia, HER2 no tiene ningún ligando extra-membrana conocido.

La sobre-expresión de HER2 es debida a una amplificación del gen HER2/neu, que se produce en las fases tempranas de desarrollo del CM, presentándose con más frecuencia en el carcinoma ductal in situ (41). La amplificación del gen HER2/neu

produce un aumento de los niveles de ácido ribonucleico mensajero ARNm de HER2 y la sobre-expresión del receptor HER2 en la superficie celular, de manera que los niveles de proteína HER2 son superiores en la superficie de las células HER2 positivas que en el epitelio mamario normal.

Los tumores HER2 positivos se caracterizan por la sobre-expresión de genes relacionados con una mayor agresividad biológica, como los implicados en procesos de proteólisis y angiogénesis. Por todo ello, los tumores HER2 positivos siempre han estado relacionados con un peor pronóstico, tanto en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) como a la SG. Además, existen datos confirmando que HER2 es un importante factor predictivo de resistencia a la quimioterapia y al tratamiento hormonal en el cáncer de mama (43,44).

Como consecuencia de los hallazgos en relación a la amplificación del gen HER2/neu, se incorporó la determinación de HER2 a la práctica clínica habitual. Existen varios métodos para determinar el estado de HER2. La técnica más utilizada en nuestro medio, debido a su elevada sensibilidad y especificidad, y a que es la más económica, es la técnica de inmuno-histoquímica (IHQ), que determinan la sobre-expresión de la proteína HER2 en el tejido tumoral. La intensidad de la tinción es valorada por un observador mediante una escala semi-cuantitativa que va de 0 (ausencia de detección) a 3 (expresión intensa). Se considera que HER2 es positivo cuando el valor es 3+, es negativo si 0 ó 1+ y dudoso en caso 2+.

La técnica de FISH (fluorescent in situ hybridation) permite discriminar la positividad en los casos de IHQ 2+, debiéndose realizar de forma obligatoria en estos casos con IHQ 2+ y consiste en la detección de la amplificación del gen HER2/neu. Este método permite evaluar directamente el número de copias del gen, utilizando sondas marcadas de ADN complementario para detectar las secuencias específicas por hibridación y comparándolo con un control, Es necesario para una determinación adecuada: un ratio mayor de 2 con un conteo de al menos 500 núcleos. Esta técnica

tiene una elevada sensibilidad y especificidad, superior a la IHQ, pero por el contrario, es más cara y no está disponible en todos los centros; con ella se obtiene resultados cuantitativos y objetivos, es decir, el resultado es positivo o negativo.

En la práctica, la mayor parte de los diagnósticos de rutina se realiza mediante hematoxilina-eosina (HE) y técnicas de IHQ. Diversos estudios sugieren que, con un limitado número de marcadores inmuno-histoquímicos (RE, RP, HER2, queratinas basales o de alto peso molecular, queratinas lumbinales o de bajo peso molecular, P63 y EGFR como marcadores más relevantes, grado histológico, marcadores de proliferación como KI-67), se pueden catalogar los carcinomas de mama en subtipos equivalentes a aquéllos basados en perfiles de expresión génica (45,46). La ventaja del estudio IHQ es que utiliza marcadores que se encuentran disponibles en la mayoría de los servicios de Anatomía Patológica y por otro lado, puede aplicarse sobre material archivado del que se puede obtener información clínica y evolutiva.

En este sentido, el análisis conjunto de la expresión de RE, RP, HER2 y Ki67 con punto de corte del 14% ofrece un grado de concordancia del 70-80% al comparar el subtipo inmuno-histoquímico y molecular (45) (tabla 1).

Tabla 1. Subtipos histológicos /moleculares del cáncer de mama infiltrante. Tomada de Cheang y col(45).

Subtipo	RE	RP	HER2/neu	Índice proliferación (Ki-67)
Luminal A	+	γ/o +	-	Bajo (<14%)
Luminal B	+	γ/o +	-	Alto (>14%)
HER2	-	-	+	Alto
Basal	-	-	-	Alto

RE: receptores estrogénicos, RP: receptores progesterona, HER2: proteína her2, Ki67: índice de proliferación celular tumoral.

En el momento actual, nos encontramos en un período de transición donde el análisis de los perfiles de expresión génica se está incorporando a la práctica habitual. Estas técnicas moleculares, podrían ofrecer mayor información al clasificar el CM, sin embargo, en la mayoría de los hospitales su uso se encuentra limitado ya que son técnicas caras y pendientes de una validación definitiva.

Desde hace unos años se conoce que la diversidad clínica y pronóstica en el CM se establece a nivel molecular y que tumores con características clínicas y patológicas similares pueden tener comportamientos diferentes. Sofisticadas tecnologías como los microarrays de expresión génica permiten analizar simultáneamente la expresión de miles de genes para crear un “retrato” molecular del tumor. Perou y colaboradores (col)(46) fueron los primeros en mencionar esta nueva clasificación.

A través del análisis de microarrays de cDNA de 38 CM el Grupo de Stanford definió una lista de genes que reveló la existencia de cinco subtipos moleculares de CM: Luminal A y B, Basal-like, Claudin-Low y HER2 (46). Cheang y cols estudiaron 357 CM confirmando la existencia de los 5 subtipos moleculares y su correlación la IHQ (45). La plataforma genómica que analiza 50 genes y permite clasificar el CM en estos subtipos moleculares se conoce como PAM50. Sus principales características se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación IHQ y comportamiento de los subtipos histológicos del cáncer de mama infiltrante.

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A (50-60%)	RE(+) y/o RP (+)	Subtipo más común
	HER2/neu(-)	Bajo grado histológico
	CK 8/18 (+)	Buen pronóstico
		Respuesta hormonal

Luminal B (10-20%)	RE(+) y/o RP (+)	Mayor grado histológico e índice proliferativo
	HER2/neu(+)	Quimiorresistentes
Basal-like	RE(-) y/o RP (-)	Relativamente hormonorresistentes Subtipo agresivo. Mal pronóstico
	HER2/neu(-)	Alto grado histológico
	CK 5/6 (+) y/o EGFR (+)	Alto índice mitótico
	Vimentina (+)	Riesgo en edades tempranas
Her2 (+); RE(-) (10-15%)	RE(-) y/o RP (-)	Buena respuesta a quimioterapia Menos común. Altamente agresivo
	HER2/neu(+)	Alto grado histológico Riesgo en mujeres < 40 años
Claudin – Low (12-14%)	Baja expresión de claudina 3,4,7, cingulina y E-cadherina	Muy quimiosensibles Alto grado (medular, metaplásico)
		Mal pronóstico Quimiosensibilidad intermedia entre basal y luminal

RE: receptores estrogénicos, RP: receptores progesterona, HER2/neu: proteína her2, CK: citoqueratinas, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

La importancia pronóstica de esta subclasificación radica en que siendo los subtipos A y B ambos de buen pronóstico, el tipo B responde peor al tratamiento sistémico que los tumores Luminales A. La supervivencia SLE descrita a los 10 años para el subgrupo Luminal A es del 70% y desciende al 53% para los tumores Luminal B y al 51% para los HER2 (45,47).

1.1.5. Estadificación

La American Joint Committee on Cancer (AJCC) (48) clasifica los CM atendiendo a la clasificación TNM. La clasificación refleja tres características que aportan un valor pronóstico, tamaño tumoral (T), afectación ganglionar loco-regional (N) y metástasis a distancia (Anexo II-VI).

1.1.6. Tratamiento quirúrgico del cáncer de mama en estadios iniciales

Los estadios I-II del CM incluyen tumores de hasta 5 cm con y sin afectación axilar y tumores mayores de 5 cm sin afectación axilar. Hasta los años 80-90 la cirugía radical, mastectomía radical modificada (MRM) fue la técnica de elección. Sin embargo, la aparición de ensayos clínicos randomizados que demostraron la equivalencia entre MRM y la combinación de cirugía conservadora (CC) y radioterapia (RT) adyuvante hizo que el tratamiento conservador se convirtiera en la opción terapéutica de primera elección(49–54). Así, la cirugía conservadora de la mama debe ser la primera elección en tumores de hasta 5 cm siempre que no exista alguna de estas contraindicaciones:

- Inadecuada relación tamaño tumoral/volumen mamario.
- Tumores multicéntricos (dos o más tumores en cuadrantes diferentes).
- Microcalcificaciones difusas de aspecto maligno.
- Radioterapia previa sobre región torácica.
- Gestación.
- Persistencia continuada de márgenes positivos tras reiteradas cirugías.
- Enfermedades asociadas como lupus eritematoso activo y esclerodermia.

Los objetivos del tratamiento conservador en el CM infiltrante son la exéresis completa del tumor con márgenes libres y un resultado cosmético aceptable. Este tipo de intervención consiste en la extirpación del tumor con un margen de tejido mamario sano manteniendo intacto el resto de la mama. Incluyen dos tipos de técnicas básicas como la tumorectomía (extirpación del tumor y un margen de tejido sano) o bien una cuadrantectomía (extirpación de un cuadrante de tejido mamario en el que se incluye el tumor).

La exploración clínica y ecográfica de la axila, con punción citológica de las adenopatías sospechosas, aporta la información necesaria para el planteamiento de la técnica quirúrgica a nivel ganglionar. La biopsia selectiva del ganglio centinela (GC) debe ser la técnica de estadificación axilar en caso de no haber enfermedad axilar (55), mientras que, cuando hay confirmación histológica de metástasis axilares, debe indicarse la linfadenectomía de al menos los niveles I y II de Berg.

La técnica de la BSGC ha supuesto una mejor estadificación porque el estudio histológico de los ganglios es más minucioso tanto con las tinciones habituales como con las técnicas de IHQ. Muy recientemente se ha empezado a utilizar un método estandarizado para la detección de metástasis en el GC (One Step Acid Nucleic Amplification, OSNA®) (56).

El método OSNA consiste en una transcripción inversa del mRNA de Citoqueratina 19 con amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) evitando así los pasos de extracción y purificación de ácidos nucleicos. Permite el estudio intraoperatorio del GC en un tiempo aproximado de 30 minutos.

La presencia de macrometastasis (lesión > 2 mm) en el GC será indicación de linfadenectomía axilar, mientras que el hallazgo de micrometástasis (lesiones entre 0,2 mm - 2 mm) o células tumorales aisladas (grupos de células tumorales < 0,2 mm) en el GC no implica la linfadenectomía.

Esta recomendación puede cambiar en los próximos años, ya que la reciente publicación de un estudio fase III por Giuliano ha demostrado que en pacientes con ecografía axilar negativa en los que tras la realización tumorectomía y exéresis del GC axilar (seguido de radioterapia adyuvante) existe afectación metastásica en 1-3 ganglios, no existen diferencias en términos de SLE y SG entre los pacientes que completan un posterior vaciamiento axilar y aquellos que no (57).

En la siguiente figura se muestra el algoritmo terapéutico recomendado para el tratamiento local de los CM en estadio localizado. En los tumores que por su tamaño no permiten un tratamiento conservador, el tratamiento neoadyuvante, previo a la cirugía, pasará a ser el primer eslabón en la cadena del tratamiento.

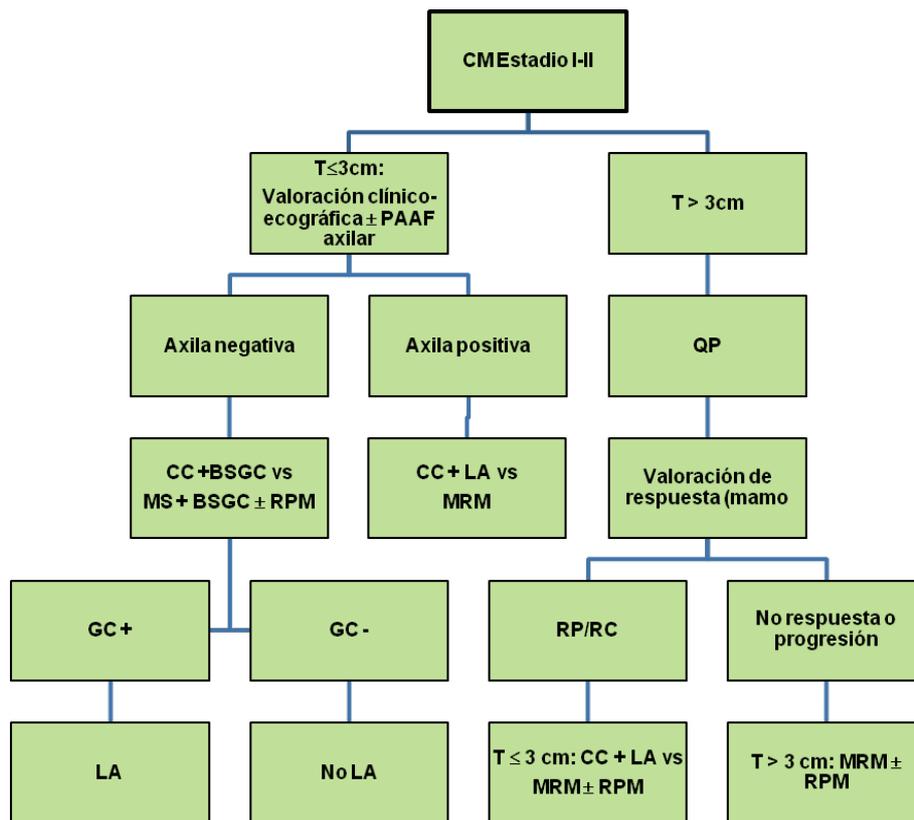


Figura 10. Algoritmo del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama en estadios iniciales.

CC: Cirugía conservadora, GC: Ganglio centinela, QP: Quimioterapia primaria, RP: Respuesta parcial, RC: Respuesta completa, LA: Linfadenectomía axilar, MS: Mastectomía simple, MRM: Mastectomía radical modificada, RPM: Reconstrucción postmastectomía.

1.1.7. Tratamiento radioterápico adyuvante del cáncer de mama

Múltiples estudios aleatorizados han demostrado de forma concluyente que la irradiación de la mama reduce de forma significativa el porcentaje de recidiva local después de CC en el CM (tasa RLR 5-10% vs. 20-40%) (58,59) consiguiendo un buen resultado cosmético y una supervivencia equivalente.

Existe clara evidencia sobre la equivalencia entre CC seguida de radioterapia adyuvante o la MRM en el tratamiento del CM invasivo. Tal y como muestra la tabla 3, existen seis ensayos aleatorizados en los que se comparan ambas opciones. La dosis administrada de RT es de 45-50 Gy (grays) en la totalidad de la mama, seguido de sobredosificación (boost) del lecho quirúrgico hasta una dosis igual o mayor a 60 Gy (en todos excepto en el estudio NSABP06, que no incluyó boost). Globalmente no se objetivan diferencias significativas en términos de SG (49–54).

Tabla 3. Supervivencia global y recaída loco regional en estudios que comparan la mastectomía radical con la cirugía conservadora.

	Tto.	n	Seg.	RLR	P	SG	P
			(años)				
Milán⁴⁹	CC + RT	352		2,8 %	No consta	87%	
	MRM	880	6	1,6 %		92 %	HR 0.96
NSABP⁵⁰	CC	634		35 %	p<0,001	58 %	
	CC + RT	628		10 %		62 %	p=0,57
	MRM	589	12	8 %		60 %	
Dinamarca⁵¹	CC + RT	430				79 %	
	MRM	429	6			82 %	
EORTC⁵²	CC + RT	466	13,4	20 %		65 %	
	MRM	436		12 %	p=0,01	66 %	p=0,11

NCI ⁵³	CC + RT	121	10,1	5 %	p=0,17	77 %	p=0,89
	MRM	116		10 %		75 %	
IGR ⁵⁴	CC + RT	88	14,5	9 %	p=0,44	73 %	p=0,19
	MRM	91		14 %		65 %	

Tto: Tratamiento; Seg: Seguimiento; SG: supervivencia global; MRM: mastectomía radical modificada; CC: cirugía conservadora; RT: radioterapia; n: tamaño muestral; p: p-valor; HR: hazard ratio, RLR: recaída loco regional.

Un estudio reciente ha corroborado que la CC seguida de RT es equivalente a MRM en términos de SG (80,9 vs 77,2%, respectivamente) (60).

Referente al tratamiento de sobreimpresión o boost sobre la cicatriz puede realizarse con braquiterapia, que consiste en la aplicación de irradiación en el lecho tumoral mediante vectores de plástico con material radioactivo, habitualmente iridio-192. Tradicionalmente se utilizaba “baja tasa” obligando al aislamiento de las pacientes. Actualmente la técnica empleada es de “alta tasa” dando dosis elevadas en un menor espacio de tiempo, pocos minutos, y habiendo demostrado su utilidad consiguiendo bajas tasas de RLR en pacientes de todas las edades, con cifras entre 1,5% a los 5 años y 5,9% a los 10 años (61).

El papel de la irradiación de las cadenas ganglionares es un tema de controversia actual. Existe consenso internacional de la indicación de RT sobre pared costal y fosa supraclavicular tras mastectomía en pacientes con tumores mayores de 5 cm (62,63). En el estudio Danés 82b en las 234 pacientes con un tamaño tumoral mayor de 5 cm, la RT tras mastectomía se asoció a una reducción de la tasa de RLR (del 42% al 12%; HR=0.28) y una mejora en la tasa de SG a los 10 años (del 33% al 40%) (62). En el estudio Danés 82c en las 161 pacientes con un tamaño tumoral mayor de 5 cm, la asociación de RT tras mastectomía se acompañó de una reducción de la tasa de recidiva local (del 34% al 10%; HR=0.29) (63).

Desde el año 2014, con la publicación del meta-análisis del Early Breast Trialist's Collaborative Group (64) está indicada la RT en pacientes tras mastectomía con tumores menores de 5cm y con afectación ganglionar en 1-3 ganglios axilares. Así en 1314 mujeres se redujo la RLR (riesgo relativo (RR) 0.68, IC 95% 0.57-0.82, p=0.00006) y la mortalidad por CM (RR 0.80, IC 95% 0.67-0.95, p=0.01)(59).

1.1.8. Tratamiento sistémico adyuvante del cáncer de mama

1.1.8.1. Quimioterapia adyuvante

La visión del CM como enfermedad sistémica, reflejado en la presencia de micrometástasis en las fases más iniciales del tumor, justifica la utilidad del tratamiento complementario para obtener una disminución de los riesgos (recidiva y muerte) y en definitiva, obtener una potencial curación de la enfermedad. Tras 20 años de seguimiento, el estudio del Instituto del Cáncer de Milán basado en el esquema de quimioterapia CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate, 5-fluorouracilo) demostró ventajas en SG en las mujeres tratadas con quimioterapia frente a las no tratadas (RR=0.76; IC 95%: 0.60-0.97; p=0.03)(65).

En los años 80 se inician los ensayos que incorporan esquemas con antraciclinas. En el estudio NSABP B-15 se confirmó la equivalencia en beneficio entre cuatro ciclos de AC (Antraciclinas, Ciclofosfamida) y 6 ciclos de CMF en tumores con afectación axilar ipsilateral(66). Posteriormente se publicaron los resultados de un estudio que incluyó 985 mujeres que fueron randomizadas a seis ciclos de FAC (5-fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida) versus seis de CMF. En el grupo con ganglios negativos la SLP y OS fue superior en el brazo de antraciclinas, sin embargo, esta ventaja no se observó en el subgrupo con afectación axilar (67).

Tras el periodo de las antraciclinas como tratamiento estándar del CM sin afectación axilar, siguió la era de los taxanos en el CM con ganglios positivos. En 1998 se presentaron por primera vez datos de eficacia del estudio CALGB 9344. Este estudio

comparaba la eficacia entre la administración de 4 ciclos de AC con un esquema de 4 ciclos de AC seguidos de 4 ciclos de paclitaxel en pacientes con CM y ganglios positivos. Se describió un incremento estadísticamente significativo en la SLP a 5 años del (77% vs 80%) en el brazo con paclitaxel, pero, este beneficio no se tradujo en un aumento en la SG a 5 años (68).

El grupo GEICAM confirmó el beneficio de los taxanos en SLE tanto en ganglios positivos como en ganglios negativos. El estudio GEICAM 9906(69) comparó en pacientes con ganglios positivos FEC (5-fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida) x 6 ciclos frente a FEC x 4 seguido de paclitaxel semanal x 8. El brazo con taxanos se asoció a un incremento en la SLE del 85% vs 79% (HR=0.63; p=0.0008) con una reducción del riesgo de muerte del 22% (HR=0.78, IC95%: 0.57-1.06; p=0.110). En el caso de pacientes con ganglios negativos TAC x 6 fue superior a FAC x 6 en el estudio GEICAM 9805 (70) en términos de SLE, con una reducción del riesgo de recidiva del 32% (87.8% vs 81.8%; HR=0.68; IC 95%:0.49-0.93; p=0.01) sin impactar en SG.

Únicamente el estudio USO-9735 (71) comparó esquemas de antraciclinas (AC) frente a taxanos (TC: docetaxel, ciclofosfamida) en pacientes con ganglios negativos y positivos. Las pacientes que recibieron TC presentaron un beneficio significativo en términos de SLE (86 vs 80%; HR 0.65; p=0.015) independientemente de la afectación axilar metastásica.

Finalmente en cuanto al esquema de taxanos de elección el estudio de Sparano (72), demostró que en pacientes tanto con ganglios positivos como negativos con indicación de quimioterapia adyuvante, los esquemas de paclitaxel semanal y docetaxel cada 3 semanas son superiores a paclitaxel cada 3 semanas y docetaxel semanal.

En resumen, actualmente el esquema quimioterápico adyuvante de elección debe incluir antraciclinas y taxanos administrados bien de forma concomitante o secuencial.

En casos seleccionados, como riesgo de recibir antraciclinas, una opción a tener en cuenta sería el esquema TC.

1.1.8.2. Tratamiento adyuvante en tumores HER2 positivo

Como se ha comentado previamente, aproximadamente el 15-25% de los CM son tumores HER2 positivos. Trastuzumab (TTZ) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio extra-membrana de la proteína HER2. Cuatro estudios que incluyeron un total de 11.000 pacientes, evidenciaron un claro beneficio de las pacientes tratadas con TTZ de forma concomitante o secuencial a la quimioterapia frente a pacientes tratadas con quimioterapia: HERA(73), NSABP-B31/ NCCTG (74), FinHer (75) y BCIRG 006 (76). El beneficio objetivado está descrito tanto en términos de SLE y SG, especialmente en los esquemas que administraron el TTZ de forma concomitante con la QT respecto a la administración secuencial (tabla 4).

Tabla 4. Estudios publicados con Trastuzumab adyuvante.

	HERA	NSABP-B31/NCCTG9831	FINHER	BCIRG006
N	5081	1736/1615	1010	3222
Ramas	a)TTZ 1 año	a) AC-PC	VNR/DC-FEC3 TTZ x 9 sem	a) AC-T
Tto.	b)TTZ 2 años	b) AC-PC-TTZ		b) AC-T+TTZ
	c) Observación	c) AC-PC+TTZ		c) TC+TTZ
		NCCTG9831:		
		a) AC-PC		
		b) AC-PC+TTZ		
Mediana seguimiento	1 año	2 años	5 años	5 años
	96% vs 95,1%	p=0,015	96,4% vs 95,5%	87%

SG	HR 0,76	HR 0,67	p=0,15	92% (p<0,001)
	p=0,26		HR:0,66	91% (p=0,04)
SLP a 5 años	85,8% 77,4%	vs p<0,0001	91% vs 86%	75%
	HR 0,54	HR 0,48	HR 0,58	84%(p<0,001)
	p<0,0001		p=0,005	81%(p=0,04)
RLR		NSABPB31:4% vs 1,7%		
		NCCTG9831: 2,7% vs 1,5%	p=0,01	

Tto: Tratamiento; n: tamaño muestral; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; RLR: recaída locorregional; p: p-valor; HR: hazard ratio; TTZ: trastuzumab, PC: paclitaxel; T: Docetaxel; TCH: docetaxel, carboplatino, trastuzumab; VNR: vinorelbina; FEC: 5-fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamid

1.1.8.3. Hormonoterapia adyuvante

1.1.8.3.1. Tamoxifeno

Tamoxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógenos y actúa como antagonista estrogénico en mama y como agonista en hueso, útero e hígado. Varios estudios han apoyado su uso en adyuvancia en CM. El estudio NATO (Nolvadex Adjuvant Trial Organization) (77) randomizó a 1.285 mujeres pre y postmenopáusicas con CM estadios I y II a recibir tamoxifeno durante 2 años o placebo. Tras 6 años de seguimiento se objetivó en las pacientes tratadas con tamoxifeno una reducción estadísticamente significativa del riesgo de recidiva del 36% (IC 95% 23-47%; p=0.0001) y del riesgo de muerte del 29% (IC 95% 12%-42%; p=0.0062). El ensayo NSABP B14 (78), en 2644 pacientes con CM sin afectación ganglionar se aleatorizaron a recibir tratamiento con tamoxifeno durante 5 años o placebo. Tras 15 años de seguimiento la supervivencia libre de recidiva (SLR) fue del 78% en el brazo de tamoxifeno y del 65% en el brazo de placebo (p<0.0001) mientras que la SG fue del

71 vs 65% respectivamente ($p=0.0008$). Este beneficio fue independiente de la edad y estatus menopáusico de las pacientes. El meta-análisis de Oxford incluyó 30.000 mujeres de 28 ensayos clínicos con CM con y sin afectación ganglionar que fueron randomizadas a recibir o no tamoxifeno durante 5 años. Tras 13 años de seguimiento se objetivó una reducción anual del 30% de la mortalidad por CM (RR= 0.70; $p<0.00001$) (79).

La duración más allá de cinco años ha sido apoyada por el estudio ATTOM (Adjuvant Tamoxifen Treatment Offer More) y el estudio ATLAS (Adjuvant Tamoxifen Longer Against Shorter) tras analizar recientemente los resultados a 15 años de seguimiento. En el primero se evidenció una reducción del 25% en el riesgo de recaída y una disminución del 23% en el riesgo de muerte en las pacientes que recibieron tamoxifeno durante 10 años en comparación con las que lo recibieron cinco años. Estos resultados fueron confirmados en el estudio internacional ATLAS (617 recurrencias a los 10 años en 3.428 mujeres en el grupo con tratamiento prolongado vs. 711 en 3.418 en las pacientes tratadas durante 5 años) (80).

1.1.8.3.2. Inhibidores de aromatasa

El desarrollo de los inhibidores de la aromatasa (IA), enzima que sintetiza estrógenos a partir de andrógenos, ha permitido una estrategia alternativa a la inhibición de los estrógenos endógenos en mujeres postmenopáusicas con CM o bien en mujeres premenopáusicas con supresión química o quirúrgica de la función ovárica. Actualmente disponemos de la tercera generación de IA, que incluye los IA no esteroideos (anastrozol y letrozol) y los esteroideos (exemestano), estos últimos con una unión irreversible y covalente a la aromatasa. Múltiples estudios han comparado la actividad de los IA frente a tamoxifeno, ya sea desde el inicio del tratamiento adyuvante o de forma secuencial (81,82).

La tabla 5 refleja los datos de distintos estudios aleatorizados de hormonoterapia adyuvante en mujeres post-menopáusicas con CM precoz hormonosensible que demuestran la superioridad de los IA frente a tamoxifeno, con mejoría significativa en la SLP y una menor tasa de RLR (83–87).

Tabla 5. Estudios publicados con hormonoterapia adyuvante.

	ATAC ⁸³	BIG 1-98 ⁸⁴	IES ⁸⁵	ARNO ⁸⁶	MA17 ⁸⁷
Esquema (año y tto)	a)5TAM b)5ANAS	a)2TAM+3LET b)5TAM c)2LET+3TAM d)5LET	a)5TAM b)2-3TAM +2-3EXE	a)5TAM b)2TAM +3ANAS	a)5TAM+5PLACEBO b)5TAM+5LET
N	6241	8028	4742	3123	5187
Ganglios afectos RH+	34%	41%	50%	27%	46%
SLP HR	84%	99,8%	81%	100%	100%
	0,87	0,81	0,68	0,59	0,57
	(95%vs92)	(84%vs 81%)	(91%vs 86,8%)		(94,4% vs 89,9%)
P	0,01	0,003	0,001	<0,0009	0,001
RLR		HR: 0,80	HR: 0,44	HR: 0,66	HR: 0,61

N: tamaño muestral; RH: receptores hormonales; SLP: supervivencia libre de progresión; HR: hazard ratio; p: p-valor; RLR: recaída locorregional; TAM: tamoxifeno, LET: letrozol, EXE: exemestano, ANAS: anastrozol.

1.2. Generalidades del tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama

1.2.1. Indicaciones del tratamiento neoadyuvante

La quimioterapia neoadyuvante (QNA) se define como el tratamiento sistémico antes del tratamiento loco-regional definitivo del CM. Existen múltiples sinónimos: tratamiento primario sistémico, quimioterapia de inducción o quimioterapia preoperatoria. Tradicionalmente, el uso del tratamiento sistémico primario o quimioterapia neoadyuvante del CM fue establecido para pacientes con tumores

localmente avanzados, donde la cirugía y/o radioterapia no podían controlar localmente la enfermedad (88–90). Actualmente, el tratamiento neoadyuvante del CM es considerado estándar para el estadio clínico III y en seleccionados casos de estadios IIA y IIB con grandes tumores con el objetivo de incrementar la posibilidad de una cirugía conservadora de mama (88,91). La QNA se comenzó a utilizar a finales de la década de los sesenta, y los primeros resultados fueron publicados en los setenta (89,90). Más recientemente también se indica en tumores triple negativos (TN) y HER2, mayores o iguales a 2 cm o con ganglios positivos, buscando alcanzar la respuesta completa patológica (RCp) como factor de buen pronóstico a largo plazo(88).

La indicación o no de la QNA, no solamente le concierne al oncólogo médico, sino que, es necesaria la colaboración de un grupo multidisciplinario compuesto entre otros por cirujanos, oncólogos, radiólogos, patólogos y radioterapeutas. La participación conjunta de estas diferentes disciplinas ha incrementado el éxito terapéutico de las pacientes con CM (92).

La combinación de QNA seguida de cirugía, radioterapia y tratamiento hormonoterápico y/o anti-HER2 adyuvante en los casos indicados ha mejorado el pronóstico de estas pacientes (93). Además de mejorar las opciones de CC la QNA permite evaluar la respuesta tumoral, lo cual hace que sea una excelente herramienta para la evaluación in vivo de la sensibilidad tumoral a los agentes de quimioterapia. La ventaja más clara en este aspecto es la capacidad de disminuir el tamaño tumoral primario, que permite la CC y también la disminución de carga tumoral en los ganglios linfáticos axilares. Además de todos estos beneficios, como posteriormente desarrollaremos en profundidad en siguientes capítulos, aquellas pacientes que tras el tratamiento neoadyuvante no reste tumor en la mama ni en la axila, definido como RCp, presentarán un excelente pronóstico a largo plazo. En base a este concepto, se ha desarrollado la aprobación acelerada de aquellos fármacos, tanto por la FDA (Food

and Drug Administration) y EMA (European Medicines Agency), que incrementen de forma significativa la tasa de RCp (94).

Finalmente, la neoadyuvancia se ha convertido en el marco ideal para la búsqueda de factores pronósticos y predictivos de respuesta ya que nos ofrece una oportunidad única para analizar y comparar múltiples variables en tumores vírgenes de tratamiento antes, durante y tras el mismo.

En base a todo lo comentado los objetivos primordiales de la QNA son (95):

1. Convertir tumores irreseccables en operables.
2. Incrementar la tasa de cirugías conservadoras.
3. Aumentar la tasa de respuestas completas patológicas.
4. Obtener información in vivo de la respuesta a los agentes terapéuticos.
5. Búsqueda de factores predictivos y pronósticos.
6. Incrementar la supervivencia libre de enfermedad y global.

1.2.2. Cirugía tras tratamiento neoadyuvante

Uno de los objetivos principales de la QNA es aumentar la probabilidad de una CC en una paciente inicialmente candidata a mastectomía.

Antes de iniciar el tratamiento neoadyuvante es necesario marcar previamente con clips radio-opacos el lecho tumoral antes de empezar la QNA (96), especialmente si la probabilidad de respuesta completa es alta como en los tumores TN o en los tumores HER2 positivos que reciben TTZ; este hecho facilitará enormemente la labor de cirujanos y patólogos.

En ocasiones, existen circunstancias que dificultan al finalizar el tratamiento la CC. Los patrones de respuestas del tumor a la quimioterapia son complejos y heterogéneos,

y oscilan desde una respuesta concéntrica hasta reducirse la enfermedad a un pequeño nódulo (ideal para la CC) a respuestas fragmentadas con restos dispersos en el lecho del tumor con gran riesgo de recidiva local si se realiza una cirugía conservadora.

Otro aspecto a tener en cuenta es la cantidad de tejido mamario que debe extirparse durante la tumorectomía en las pacientes que responden a la QNA. En esta circunstancia, la cuestión es si la extirpación del tejido debería tener en cuenta el tamaño inicial del tumor o si debería limitarse a un borde adecuado alrededor del tumor residual tras la respuesta a la quimioterapia. La respuesta depende generalmente de la configuración inicial del tumor (si el tumor inicial está bien delimitado o es irregular; de la presencia o ausencia de microcalcificaciones sospechosas, que indicarían un componente intraductal extenso; del cociente tamaño tumoral/tamaño mamaros y del resultado cosmético si fuera necesario realizar una escisión amplia. Es sensato programar la tumorectomía de acuerdo con el tamaño tumoral residual tras la quimioterapia; sin embargo, se debe valorar cuidadosamente el estado de los márgenes quirúrgicos, y el cirujano debe estar preparado para realizar una resección adicional si se detecta que los bordes están afectados en la evaluación anatómo-patológica. La valoración del tipo de respuesta (enfermedad estable, respuesta parcial o completa) y patrón (concéntrica o fragmentada) mediante técnicas de imagen, en especial por Resonancia Magnética (RM), puede facilitar esta decisión quirúrgica (97,98).

Otro aspecto a valorar es el manejo de la axila; la implantación de la técnica del ganglio centinela en la cirugía del CM ha llevado a estudiar este procedimiento en el escenario de la QNA y a discutir cuál es el momento ideal para practicarla (99). La mayor ventaja de realizar el ganglio centinela antes de la QNA es que asegura un correcto estadificación axilar antes del tratamiento. Los resultados de los estudios de QNA señalan que ésta erradicará entre el 20 y el 40% de la inicial enfermedad presente en los ganglios axilares. Si esta esterilización de la enfermedad ocurriera

selectivamente en el ganglio centinela pero no en otros ganglios axilares, el estudio del ganglio centinela realizado tras la quimioterapia se asociaría con una tasa de falsos negativos inaceptable; sin embargo, hasta el momento no hay datos que corroboren que la tasa de falsos negativos es superior cuando el procedimiento se realiza después de la quimioterapia que cuando se realiza antes (100).

Uno de los ensayos clínicos que analizó el papel del ganglio centinela tras quimioterapia primaria con mayor número de pacientes fue el estudio NSABP B-27(101), en que 428 pacientes fueron sometidas a la técnica del ganglio centinela y después a un vaciamiento axilar reglado; se identificó el ganglio centinela en el 85% de los casos y la tasa de falsos negativos fue del 11%. Un meta-análisis de 21 estudios con 1.273 sometidos al mismo proceso encontró resultados parejos, con un 90% de identificación del ganglio centinela y un 12% de falsos negativos, datos similares a los comunicados cuando la técnica se realiza antes de la quimioterapia(102).

La cuestión de si esta técnica es precisa en pacientes con afectación ganglionar conocida antes de la quimioterapia con negativización clínica tras ella continúa siendo controvertida y son necesarios más datos obtenidos de forma prospectiva para considerarla un tratamiento estándar (103,104). Recientemente el estudio alemán fase III SENTINA(105), incluyó 1737 pacientes demostrando que la realización del ganglio centinela tras la QNA en pacientes con ganglios axilares positivos al diagnóstico se asociaba con una alta tasa de falsos negativos, 14·2% (95% IC 9·9–19·4), y una baja tasa de detección, 80·1% (95% CI 76·6–83·2).

Un motivo importante para realizar este procedimiento después de la quimioterapia sería conseguir un tratamiento conservador de la axila en ese 20-40% de pacientes que negativizan los ganglios axilares con el tratamiento; además, requiere un solo acto quirúrgico, mientras que el estudio pre-tratamiento requiere dos intervenciones separadas en el tiempo (100).

1.2.3. Radioterapia tras tratamiento neoadyuvante

Respecto a la utilidad de la RT tras la neoadyuvancia, la gran mayoría de indicaciones proceden del conocimiento adquirido cuando el tratamiento sistémico se administra tras la cirugía, es decir, adyuvante. Las incertidumbres sobre el papel de la RT en pacientes con estado II derivan especialmente de la determinación de los volúmenes a irradiar (106).

El escenario clínico incluiría dos situaciones, tras cirugía conservadora o bien, tras mastectomía. En pacientes tratadas con QNA y cirugía conservadora, estadio II sin ganglios palpables (cT2N0, cT3N0), en ausencia de mayor evidencia científica, hoy por hoy no hay ningún dato para decidir abstención de irradiación en pacientes que alcanzan la RCp (107,108). El volumen de irradiación incluye la glándula mamaria pero no hay criterio unificado respecto a si es necesario tratar o no los niveles axilares I-III.

En las enfermedades con estadio clínico II con ganglios palpables (cT1N1, cT2N1) la definición del volumen de irradiación es más controvertido. Si se confirma histopatológicamente la afectación axilar previa a iniciar el tratamiento quimioterápico se debería incluir el área axilar-supraclavicular en el volumen de tratamiento. Si no hay confirmación histológica inicial y tras la QNA se evidencia afectación axilar (ypN+), éste debería ser incluido en el volumen de tratamiento. Sin embargo, si no hay confirmación histológica y tras la quimioterapia neoadyuvante se obtiene respuesta patológica completa en la axila (ypNO), hay autores que defienden la irradiación del volumen mamario exclusivo sin incluir el área axilar-supraclavicular (109).

En pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado los volúmenes de irradiación incluyen siempre la glándula mamaria y las cadenas axilar-claviculares, independientemente de la respuesta obtenida (108).

El segundo escenario incluye a pacientes tratadas con mastectomía tras QNA. En tumores mayores de 5 cm y/o afectación ganglionar axilar son las dos indicaciones ampliamente reconocidas de irradiación post-mastectomía (110). Un estudio retrospectivo del MD Anderson (111) evaluó el riesgo de recidiva loco-regional tras mastectomía en 150 pacientes tratadas con QNA frente a 1.031 pacientes tratadas con quimioterapia adyuvante, sin que ninguna de ellas recibiera radioterapia postquirúrgica, la tasa de recaída local fue siempre más alta en las pacientes del grupo de QNA.

1.2.4. Tratamiento sistémico neoadyuvante

1.2.4.1. Introducción

En 1973, el Instituto del Cáncer de Milán inició el primer estudio prospectivo de QNA (tres ciclos de adriamicina y vincristina) en el cáncer de mama localmente avanzado e inoperable (112), con la intención de conseguir una disminución del tamaño tumoral y facilitar un posterior tratamiento radical con cirugía y radioterapia, consiguiendo un 62% de respuestas clínicas (aunque sólo un 7% de respuestas completas) y la conversión a enfermedad operable en la práctica totalidad de pacientes. Varios grupos europeos y americanos, especialmente el MD Anderson(90), adoptaron un abordaje similar, demostrando todos ellos que una QNA, generalmente basada en antraciclinas, era capaz de conseguir altas tasas de respuestas clínicas y operabilidad.

Estos resultados en enfermedad localmente avanzada y la constatación de la equivalencia pronóstica de la mastectomía y la CC llevaron a una progresiva introducción de la QNA como tratamiento del CM operable, en un intento de conseguir una mayor tasa de cirugías conservadoras. Además, durante la década de los 80 se estableció un racional biológico que justificaba el desarrollo de los ensayos clínicos de QNA en el CM operable (basándose principalmente en los trabajos de Fisher) (113,114).

Aunque no se ha podido demostrar la superioridad de la QNA frente a la quimioterapia adyuvante en relación a una mejor SLE o SG, el uso de este enfoque ofrece claros beneficios; el primero de ellos es que puede conseguir la disminución del tamaño tumoral en la mayoría de pacientes, permitiendo una CC cuando la mastectomía era la operación recomendada o un mejor resultado estético en caso de una relación tumor-mama no favorable. Además, esta estrategia representa un indicador in vivo del efecto del tratamiento, permitiendo identificar marcadores de valor predictivo y pronóstico. Los posibles inconvenientes, representados por la pérdida de la información pronóstica del tamaño patológico tumoral y de la afectación ganglionar, están claramente compensados por el valor pronóstico de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

La eficacia del tratamiento neoadyuvante o con intención primaria del carcinoma de mama es ya un hecho contrastado y muy común en la práctica clínica habitual. El tratamiento sistémico neoadyuvante de elección en la mayoría de los casos es la quimioterapia. En ocasiones seleccionadas, como es el caso de pacientes postmenopáusicas con tumores luminales, se plantea el uso de la hormonoterapia. Por otro lado, toda paciente con un tumor HER2 positivo deberá recibir terapia anti-HER2 en combinación con quimioterapia siempre y cuando no exista contraindicación.

1.2.4.2. Estudios no aleatorizados de quimioterapia neoadyuvante

En los años 80 y 90 varios estudios no aleatorizados (Tabla 6) mostraron que la quimioterapia primaria en el CM no candidata a cirugía conservadora alcanzaba una tasa de respuestas clínicas que oscilaba entre el 60-90%, con una tasa de RCp del 3-27% (115,116). Dado que estos estudios se realizaron en pacientes con tumores en diferentes estadios, distintas combinaciones de quimioterapia y diversas duraciones de tratamiento, las comparaciones entre ellos y respecto al tratamiento adyuvante son difíciles de realizar. Estos trabajos sirvieron para demostrar que esta estrategia

era razonable y que se podía aumentar la tasa de CC sin un aparente menoscabo en supervivencia; además, se empezaron a establecer varios de los problemas de manejo clínico en esta situación, como la dificultad en la valoración clínica y radiológica de la respuesta y los problemas en el manejo quirúrgico tras el tratamiento primario. Así mismo, se evidenció el valor pronóstico de la respuesta patológica, con un excelente pronóstico a largo plazo para las pacientes que conseguían una RCp (115).

Tabla 6. Estudios no aleatorizados de quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama operable

Autor	Número pacientes	Estadio	Régimen QT	Tasa de Respuesta Clínica (%)	Tasa Cirugía Conservadora (%)	RCp (%)
Bonadonna (1998)	536	T>2.5cm	CMFx3-4, FACx3-4	76%	85	3
Jacquillat (1990)	250	I-III B	Vinb-thi-met-5Fu±adr	71	-	-
Smith (1995)	50	T>3cm	Ecis Fx8	98	62	27
Smith (2000)	426	T>3cm	Ecis F, AC	34	-	-
Belembaogo (1992)	126	T1-3,N0-2	Adr-vinc-cic-FU	86	85	-
Chollet (1997)	50	Operable alto riesgo	Adr-vino-cic-FU	88	78	22
Schwartz (1987)	536	T>2.5cm	CMFx3-4, FACx3-4	76%	85	3
MD Anderson (2002)	250	I-III B	Vinb-thi-met-5Fu±adr	71	-	-
Bonadonna (1998)	50	T>3cm	Ecis Fx8	98	62	27

AC: adriamicina, y ciclofosfamida. CMF: ciclofosfamida, metrotexato, 5-Fluoracilo. FAC: 5-Fluoracilo, adriamicina, ciclofosfamida. QT: quimioterapia. RCp: respuesta completa patológica.

1.2.4.3. Estudios aleatorizados de quimioterapia neoadyuvante

El estudio NSABP B-18 es considerado uno de los mayores estudios aleatorizados de QNA en pacientes con CM operable (91). En este estudio se incluyeron 1.523 mujeres

con CM precoz, siendo aleatorizadas a recibir tratamiento de quimioterapia antes o después de la cirugía. El objetivo principal de este estudio fue la SLE y SG. Con respecto a estos objetivos, el estudio NSABP-B18 fue un estudio negativo, ya que después de 9 años de seguimiento los dos grupos resultaron idénticos en cuanto a SLE. Sin embargo, existía una evidencia estadística marginal que sugería que las pacientes jóvenes -menores de 50 años- se beneficiarían más con la QNA que las pacientes mayores de 50 años. Además, la QNA facilitaba un mayor número de CC.

Del mismo modo el estudio de la EORTC 10902 (117) concluye de manera similar, el grupo de pacientes tratadas con quimioterapia adyuvante no presentaron un mayor beneficio, en términos de supervivencia, respecto a las que recibieron el mismo esquema de forma neoadyuvante.

En los últimos años se han publicado dos meta-análisis que evaluaron sistemáticamente la evidencia respecto a los estudios aleatorizados que comparaban QNA frente a quimioterapia adyuvante en el CM operable (118,119). En el publicado por Mauri en 2005 se analizaron 9 ensayos, mientras que la revisión Cochrane de 2007 incluyó 6 ensayos.

Los ensayos incluidos mostraban grandes diferencias entre sí; en general, la quimioterapia utilizada se basaba en antraciclinas, aunque en varios de ellos se usaba el esquema CMF o similares; la duración media del tratamiento fue de 3 meses (con sólo 2-3 ciclos de varios estudios), y con diferencias importantes en el tratamiento loco-regional tras la quimioterapia. Así, en los estudios franceses se ofrecía la opción de radioterapia radical sin cirugía a las pacientes que alcanzaban una respuesta clínica completa (120).

La SG se analiza en ambos meta-análisis, con resultados similares, no hubieron diferencias para este suceso (RR= 0,98/0,99 respectivamente). La SLE sólo se estudió

en el meta-análisis de Mauri sin hallar tampoco diferencias significativas (RR=0,99 (IC 95%:0,91-1,07)).

En ambos se analizó cuidadosamente la SLR, coincidiendo que existía un impacto negativo de la QNA frente a la quimioterapia adyuvante (RR=1,21/1,22). Este incremento del 20% en la tasa de recidiva local debe atribuirse a los estudios franceses(120,121) en que una parte importante de las pacientes no fueron sometidas a una cirugía radical tras la quimioterapia, sino que sólo recibían radioterapia; cuando se excluyen estos estudios, las diferencias no alcanzan la significación estadística. La tasa de mastectomía es inferior para los grupos de pacientes que recibieron quimioterapia primaria en ambos meta-análisis y tampoco hay un aumento de las toxicidades de la quimioterapia ni de las complicaciones post-quirúrgicas.

Por tanto, la conclusión de ambos meta-análisis es que la QNA es tan eficaz como la misma quimioterapia adyuvante respecto a la SLE y SG, pero que se requiere un correcto tratamiento quirúrgico tras el tratamiento primario, lo que permitirá aumentar la tasa de cirugías conservadoras. Los resultados de estos estudios aleatorizados justifican la creciente popularidad de la quimioterapia primaria en las últimas décadas.

1.2.4.4. Esquema de elección en el tratamiento neoadyuvante

Múltiples estudios han intentado optimizar el esquema de QNA, en un intento de mejorar los resultados obtenidos con los esquemas basados en CMF o antraciclinas (AC, FAC); como en la quimioterapia para la enfermedad avanzada o en la adyuvante, la inclusión de los taxanos fue fundamental en este desarrollo. Más que la SLE o SG, el objetivo principal de estos estudios fue la tasa de RCp, asumiendo su valor como marcador subrogado de eficacia y pronóstico.

Varios estudios fase II de diferentes combinaciones de antraciclinas y taxanos (122) alcanzaron tasas de RCp del 7-26%, aunque las diferentes maneras de definir la RCp hacen difícil la comparación directa. Existen algunos estudios aleatorizados fases II-III que compararon combinaciones de antraciclinas y taxanos con regímenes basados en antraciclinas(122,123). En el estudio del Grupo Cooperativo Anglo-Céltico (123), 363 pacientes con estadios II-III se aleatorizaron a recibir 6 ciclos de AD (adriamicina y docetaxel) frente AC (adriamicina y ciclofosfamida); este estudio no fue capaz de demostrar diferencias significativas en la tasa de respuestas clínicas (70% vs. 61%) ni patológicas (21% vs. 24%).

Por otra parte, existe un acuerdo general en que se obtiene una mayor tasa de RCp con tratamientos más prolongados; sin embargo, son pocos los ensayos que han estudiado este aspecto. Dos pequeños estudios fase II aleatorizados han mostrado que 6 ciclos de antraciclinas combinados con taxanos obtienen una mayor tasa de RCp que 3 ciclos del mismo tratamiento; el estudio con más pacientes incluidas es el ABCSG-14 (124), en que se aleatorizaron 292 pacientes con cáncer de mama estadios I-III a recibir 6 vs. 3 ciclos de ED (epirubicina y docetaxel); la tasa de RCp fue del 18,6% frente al 7,7%; $p=0,00045$. Por tanto, parece razonable que la duración de la QNA sea cercana a 6 meses.

El protocolo NSABP B-27 (125) es el ensayo de quimioterapia primaria de mayor tamaño muestral; se aleatorizaron 2.411 mujeres a recibir 4 ciclos de AC seguidos de cirugía, 4 ciclos de AC seguidos de 4 ciclos de docetaxel (AC-D) y después cirugía, ó 4 ciclos de AC preoperatorio seguidos por cirugía, y tras ésta, 4 ciclos de docetaxel postoperatorio. Con el esquema que incluía docetaxel preoperatorio (AC-D) se dobló la tasa de RCp (12,9 y 14,4% en los dos brazos con AC como tratamiento primario frente a 26,1% en el brazo AC-D; $p<0,0001$); sin embargo, la adición de docetaxel al AC no impactó en la SLE ni en la SG. El hecho de alcanzar una RCp, independientemente del esquema de quimioterapia, fue un importante factor pronóstico de supervivencia ($RR=0,33$; $p<0,0001$).

El estudio Gepar Duo (German Preoperation Adriamycin Docetaxel Trial) (126) comparó la tasa de respuestas entre 4 ciclos de adriamicina y docetaxel cada 2 semanas; con 4 ciclos de AC seguidos por 4 ciclos de docetaxel administrados cada 3 semanas; como en el estudio B-27, el uso secuencial de docetaxel consiguió una mayor tasa de RCp que el régimen de combinación (14,3% vs 7%; $p < 0,0001$).

Otro interesante estudio evaluó la administración secuencial de paclitaxel semanal o paclitaxel cada 3 semanas, seguido de FAC (127); 258 pacientes con CM estadio I-IIIa se aleatorizaron a recibir paclitaxel semanal por 12 semanas (con mayor dosis en caso de pacientes con ganglios positivos) o 4 ciclos de paclitaxel cada 3 semanas, seguido de 4 ciclos de FAC cada 3 semanas. Las respuestas clínicas fueron similares en ambos esquemas, pero la administración semanal de paclitaxel consiguió tasas de RCp significativamente superiores (28,2% vs. 15,7%).

1.2.4.5. Estudios de quimioterapia neoadyuvante en CM HER2 positivo

La incorporación de fármacos dirigidos a dianas moleculares es una de las vías para conseguir una mayor tasa de RCp y, por tanto, una mayor eficacia de la QNA. Uno de los agentes más atractivos es, sin duda, el TTZ en pacientes con sobre-expresión de HER2, especialmente tras los excelentes resultados obtenidos con el uso de TTZ en adyuvancia (73,75,76). En los últimos años se han llevado a cabo más de 20 pequeños estudios con unas 600 pacientes en los que se incorporaba el uso de TTZ junto a variados esquemas de quimioterapia, parte de ellos obviando el uso de antraciclinas para disminuir el riesgo de toxicidad cardíaca y algunos basándose en platinos. En estos estudios, la tasa de respuestas clínicas osciló entre el 60-93%, con tasas de RCp del 18-78% y un adecuado perfil de toxicidad.

Inicialmente, los resultados más interesantes derivaron de dos estudios aleatorizados. El primero fue el publicado por Buzdar y cols. (128); en este ensayo inicialmente se debían aleatorizar 164 pacientes con CM HER2 positivo a recibir 4 ciclos de paclitaxel

cada 3 semanas seguidos por 4 ciclos de FEC, o el mismo esquema más TTZ semanal durante 24 semanas. Después de que 34 pacientes completaran el tratamiento, el estudio fue cerrado prematuramente por el comité de monitorización de datos debido a la tasa de RCp (incluyendo mama y axila) significativamente más alta que se demostró en el brazo del tratamiento con TTZ (65,2% vs. 26%; $p=0,0016$). Posteriormente se presentaron datos con 22 pacientes más, tratadas con TTZ, que confirmaron estos excelentes resultados. Otro dato destacable fue que a pesar del uso concomitante del TTZ con las antraciclinas no se observó toxicidad cardiaca con relevancia clínica. Con un esquema de tratamiento similar cambiando la pauta de paclitaxel trisemanal por 12 semanas de paclitaxel, Pernas y cols. (129) han confirmado estos resultados, obteniendo una tasa de RCp del 73% sin incrementar de nuevo la toxicidad cardiaca.

Otro ensayo aleatorizado importante en este escenario es el NOAH (130), estudio europeo en el que 228 pacientes con CM estadio II-IIIb HER2 positivo se aleatorizaron a recibir un tratamiento neoadyuvante basado en un complejo esquema secuencial con antraciclinas, paclitaxel y CMF, con o sin TTZ concomitante. Los resultados mostraron un incremento significativo de la tasa de RCp en mama y axila para el grupo que recibió TTZ (38% vs. 20%; $p=0,003$) sin incrementar de forma significativa la toxicidad.

En base a los resultados de estos dos estudios se recomendó asociar TTZ, siempre y cuando no existiera contraindicación, al esquema de quimioterapia neoadyuvante de cualquier paciente HER2 positiva.

1.2.4.5.1. Estudios de quimioterapia neoadyuvante con o sin antraciclinas CM HER2 positivo.

En el marco neoadyuvante existen muy pocos estudios que comparen directamente esquemas con antraciclinas y esquemas sin las mismas en combinación con TTZ.

Si realizamos una comparación indirecta entre esquemas con taxanos con TTZ y otros que incluyan la secuencia de antraciclinas y taxanos vemos una mayor tasa de respuestas a favor del brazo de la secuencia, de forma global los esquemas con taxanos nos ofrecen tasas de respuestas del 30% mientras que la secuencia estaría sobre 40-60% (130–132).

Únicamente existe una revisión retrospectiva de 300 pacientes del MD Anderson donde compararon dos series: la primera, según con el esquema clásico de Buzdar modificado (paclitaxel x 12 semanas y TTZ seguido de FEC x 4 con TTZ) y la segunda con el esquema de carboplatino, docetaxel y TTZ cada 3 semanas x 6 ciclos. Con todas las limitaciones del estudio se describió una mayor tasa de RCp en el brazo con antraciclinas (60.6 vs 43.3; $p=0.016$) que se tradujo en una mayor SLR ($p<0.001$) (133).

La segunda evidencia viene dada por un estudio fase II con TTZ y pertuzumab (PTZ) (134). Se trata del estudio fase IIB Tryphaena, 225 pacientes con cáncer de mama HER2 positivo fueron randomizadas a tres brazos de tratamiento: tres ciclos de antraciclinas sin TTZ seguido de tres ciclos docetaxel + TTZ + PTZ, un segundo brazo con antraciclinas concomitante con TTZ y PTZ seguido de tres ciclos docetaxel + TTZ + PTZ y por último carboplatino + docetaxel + TTZ + PTZ x 6 ciclos. El OP del estudio fue la tasa de toxicidad cardiaca, en este sentido, no se objetivaron diferencias significativas en el número de eventos cardiacos al comparar los tres brazos de tratamiento (4.0%, 6.9% y 6.6% respectivamente). Respecto a la eficacia como objetivo secundario del estudio y teniendo en cuenta la falta de poder estadístico para hallar diferencias, se describieron tasas de RCp en mama y axila del 45.3%, 50.7% y 51.9% respectivamente.

Así, respecto al uso de esquemas con y sin antraciclinas debemos concluir, con escasa evidencia, que no existen diferencias en la tasa de eventos cardiacos durante el tratamiento neoadyuvante ni diferencias en la tasa de RCp al comparar ambos esquemas.

1.2.4.5.2. Estudios de quimioterapia neoadyuvante con antraciclina secuencial o concomitante con agentes anti-HER2 en CM HER2 positivo.

En el estudio pivotal de Slamon que permitió la aprobación de TTZ en enfermedad avanzada el brazo con antraciclinas y TTZ presentó una toxicidad cardiaca inaceptable lo que llevó a recomendar la no administración concomitante de ambas. Sin embargo, la combinación ofrecía un mayor beneficio en términos de eficacia clínica respecto al brazo con taxanos (135). El beneficio observado junto con datos de actividad sinérgica en modelos preclínicos (136) hizo que no se cerraran definitivamente las puertas a la administración concomitante. Empleando dosis limitadas de antraciclinas y con criterios de selección más estrictos, dos estudios fase III en situación neoadyuvante demostraron que la combinación de antraciclinas y TTZ era segura y muy eficaz, con tasas de RCp del 60% (130,131).

Buscando una mayor seguridad cardiaca diferentes trabajos han empleado de forma concomitante antraciclinas liposómicas, taxanos y TTZ. Dos estudios fase II, asociando doxorubicina liposómica no pegilada o pegilada con taxanos y TTZ alcanzaron tasas de RCp entre el 30-59%, sin embargo, la tasa de toxicidad palmo-plantar asociada la forma pegilada obligó a abandonar futuras líneas de investigación (137,138).

En nuestro centro en base a la actividad sinérgica de antraciclinas y TTZ, así como los datos de eficacia del estudio fase II del Dr. Cortés combinando antraciclina liposómica no pegilada, paclitaxel y TTZ, hemos empleado desde el año 2008 dicha combinación en el tratamiento neoadyuvante del CM HER2 positivo con tasas de RCp del 63% (139,140).

El estudio que comparó directamente esquemas concomitantes y secuenciales con antraciclinas y TTZ fue el ACOSOG Z1041 (141). Se trataba de un estudio fase III con OP de RCp. 280 pacientes fueron randomizadas a tratamiento secuencial FEC x 4 ciclos seguido de paclitaxel 80 mg/m² y TTZ semanal durante 12 semanas, mientras

que el segundo brazo recibió paclitaxel y TTZ semanal durante 12 semanas seguido de 4 ciclos de FEC concomitante con TTZ semanal. Respecto a la toxicidad cardiaca se objetivaron 9 (7.1%) eventos cardiacos en el brazo secuencial y 6 (4.6%) en el brazo de combinación tras finalizar las 24 semanas de tratamiento. En cuanto a la tasa de RCp no se objetivaron diferencias significativas entre el tratamiento secuencial (RCp=56.5%; IC 95%: 47.8-64.9) y concomitante (RCp=54.2%, IC 95% 45.7-62.6).

En conclusión, no existen diferencias en tasa de respuestas ni toxicidad entre ambos esquemas, secuencial o concomitante con antraciclinas. En caso de emplear un esquema con antraciclinas y TTZ la opción recomendada será el tratamiento secuencial.

1.2.4.5.3. Estudios de quimioterapia neoadyuvante con agente único anti-HER2 o doble bloqueo con CM HER2 positivo

En búsqueda de un incremento en la tasa de RCp y en consecuencia un aumento en términos de supervivencia se investigó el papel del doble bloqueo en el tratamiento neoadyuvante asociando TTZ tanto con lapatinib (L) como PTZ.

Referente a estudios que investigan el papel de lapatinib, se llevaron a cabo varios estudios fase IIB-III comparando esquemas con/sin antraciclinas y taxanos asociados a TTZ y L en monoterapia o bien en combinación (142–144). Como resumen de todos ellos cabe destacar que TTZ fue superior a L en monoterapia, mientras que los mejores resultados se obtuvieron en los brazos de doble bloqueo con incrementos absolutos entre 10-21% en la tasa de RCp (tasa de RCp obtenida con TTZ + L + quimioterapia entre 51-62%) respecto a la monoterapia con TTZ. La incorporación de esquemas con antraciclinas y la mayor duración del tratamiento (como por ejemplo 16 semanas de paclitaxel) pueden diluir el beneficio del doble bloqueo respecto a la monoterapia con TTZ. El estudio más relevante fue el fase III NeoALTTO(142), donde se randomizaron 455 pacientes en tres ramas de tratamiento diferentes: L, TTZ o la

combinación de ambos durante 6 semanas, seguido de la asociación de paclitaxel semanal durante 12 semanas al régimen de terapia anti-HER2 previa, tras la cirugía se mantuvo el tratamiento anti-HER2 hasta completar 52 semanas así como quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. El OP fue la tasa de RCp. La tasa de RCp fue superior en el brazo de combinación (RCp=51.3%; IC 95%: 43.1-59.5) respecto al grupo de TTZ (RCp=29.5%; IC 95%: 22.4-37.5); diferencia 21.1%, IC 95%:9.1-34.2, p=0.0001). No se objetivó una mayor toxicidad cardíaca, sin embargo la tasa de diarrea y toxicidad hepática grado 3 fue superior en los brazos de L frente a TTZ.

Relacionado con PTZ hemos de destacar los estudios Neosphere (145) y Trypahena (134). En el ensayo neoadyuvante fase II Neosphere, se aleatorizaron a 417 mujeres a recibir 4 ciclos de TTZ + docetaxel (grupo A), PTZ + TTZ + docetaxel (grupo B), PTZ + TTZ (grupo C) o PTZ + docetaxel (grupo D). El ensayo alcanzó su OP (tasa de RCp), las pacientes que recibieron PTZ y TTZ en combinación con docetaxel presentaron una tasa de RCp significativamente superior respecto a TTZ y docetaxel (RCp=45.8% vs. 29.0%; p=0.0141).

En base a la eficacia descrita en el estudio de primera línea para enfermedad avanzada Cleopatra (146) así como a las tasas de RCp de los estudios Neosphere (145) y Trypahena (134), la FDA y la EMA dio la aprobación de la combinación de TTZ y PTZ en el tratamiento neoadyuvante del CM HER2. Los esquemas recomendados incluyeron: docetaxel trisemanal x 4 ciclos concomitante con TTZ y PTZ posteriormente y como esquema adyuvante FEC x 3 ciclos. Mientras que del ensayo TRYPHAENA los esquemas fueron: carboplatino, docetaxel, TTZ y PTZ así como el esquema secuencial con antraciclinas.

1.2.5. Valoración de respuesta al tratamiento neoadyuvante

Desde los primeros estudios con QNA en el CM se hizo evidente la existencia de varios problemas relativos a la valoración de la respuesta, tanto para la respuesta clínica y radiológica como para la respuesta patológica.

Referente a la primera valoración patológica debe establecerse en la biopsia diagnóstica(147), que actualmente se realiza mediante biopsia de aguja gruesa por estereotaxia o guiada por ecografía; es fundamental confirmar la presencia de tumor infiltrante, su tipo histológico y grado, así como los factores predictivos de respuesta (RH y HER2), ya que de éstos depende el tipo de tratamiento primario a administrar.

La valoración del tamaño del tumor de mama es fundamental para iniciar el tratamiento primario y determinar las posibilidades de una cirugía conservadora tras el tratamiento. Clásicamente, esta valoración se ha llevado a cabo mediante la exploración clínica y métodos radiológicos (mamografía y ecografía), pero varios estudios (148) han determinado que la capacidad de estas exploraciones, tanto por separado como en conjunto, para determinar de manera certera la enfermedad residual es limitada, con correlaciones pobres por el tamaño tumoral patológico en la pieza quirúrgica. La creciente disponibilidad de la RM de mama ofrece un método alternativo para determinar el tamaño tumoral residual tras la QNA. Numerosos estudios han demostrado su capacidad de predecir correctamente la enfermedad residual y su superioridad a la mamografía y ecografía (149), por lo que su uso permite una mejor selección de las pacientes candidatas a CC tras QNA.

Además, la RM muestra diferentes patrones de respuesta (básicamente concéntrica y fragmentada) (150) que también ayudan a la valoración quirúrgica y que probablemente se correlacionan con los diferentes tipos de tumores de mama (respuesta concéntrica en tumores TN y HER2 positivo y respuesta fragmentada en

tumores luminales) (151); por añadidura, la RM es capaz de detectar aproximadamente un 10% de enfermedad multicéntrica no detectada por otras técnicas, lo que puede ser decisivo en el momento de determinar pacientes candidatas a la QNA (152).

La ecografía axilar es muy útil en el estadiaje ganglionar previo a la quimioterapia, por lo que es muy recomendable realizarla y practicar una punción con aguja fina de las adenopatías sospechosas para confirmar el diagnóstico (153).

1.3. Factores pronósticos y predictivos al tratamiento neoadyuvante

1.3.1. Introducción: la importancia de la respuesta completa patológica

El tratamiento neoadyuvante ofrece un marco ideal para la evaluación de múltiples factores pronósticos y predictivos de respuesta ya que nos permite estudiar al tumor intacto, virgen de tratamiento, con todo lo que ello supone. Podremos así conocer los mecanismos de acción de nuevos agentes al analizar cambios biológicos entre la biopsia inicial y la pieza quirúrgica resultante tras la QNA. También nos permitirá conocer factores predictivos de respuesta ya sean respuestas clínicas, respuestas radiológicas y la respuestas patológicas. Todo ello mediante el análisis histológico del tumor pero también mediante técnicas de imagen. Pero además, podremos conocer factores más tardíos, como son los factores pronósticos, que requieren el seguimiento del paciente durante un tiempo más prolongado y son la SLE y la SG.

La principal cuestión es la definición de la RCp, ya que es ésta la que se considera el indicador de beneficio, al asociarse con el mejor pronóstico a largo plazo. Son múltiples las clasificaciones que se han desarrollado a lo largo de los últimos 20 años. Varias de ellas (Chevalier, Sataloff y Miller & Payne) (154,155) se caracterizan por la descripción de varios grados de respuesta en función del efecto terapéutico del tratamiento y de la mayor o menor presencia de tumor infiltrante viable tanto en la mama como en la axila. En otros la definición es más categórica y sólo acepta la

presencia o ausencia de enfermedad tumoral en la pieza quirúrgica. Además, cabe destacar que debe incluirse en la definición de RCp definitiva la ausencia de enfermedad infiltrante en mama y axila, y ésta es la definición que se considera operativa en estos momentos (156). En cuanto a la persistencia de carcinoma in situ residual en la pieza, ésta no parece impactar en el pronóstico a largo plazo, por lo que su presencia no cambia la definición de RCp (157).

En este sentido, el resultado de varios estudios clínicos ha identificado a la respuesta RCp como el marcador subrogado más fiable de supervivencia (91,94,119,125,156,158–162). El uso generalizado de la RCp como principal objetivo en los ensayos clínicos se popularizó en la década de los 90.

A la hora de definir la RCp no existe un consenso universal, existen dudas sobre si la respuesta debe incluir el carcinoma no infiltrante o bien si hemos de valorar la respuesta ganglionar. Además existen diferentes clasificaciones a la hora de valorar la respuesta patológica, lo que suma confusión en el momento de comparar los distintos ensayos clínicos. Las principales clasificaciones se hallan resumidas en la tabla.

Tabla 7. Diferentes Clasificaciones de la respuesta completa patológica.

Autor/año de publicación	Definición de la RCp y clasificación de grados
Feldman LD y cols. Cancer Res 1986(156)	Ausencia macroscópica del tumor a la simple inspección de la mastectomía y material con contenido axilar sin depender de los hallazgos posteriores al microscopio.
Schnitt SJ y cols. Am J Clin Pathol 1992(163)	No evidencia de carcinoma invasivo ni en la mama ni en los ganglios axilares
Chevalier B y cols. Am J Clin Oncol 1993(164)	Grado 1: desaparición macroscópica y microscópica tumoral. Grado 2: presencia de carcinoma in situ en la mama. No evidencia de carcinoma invasivo ni en la mama ni en los ganglios axilares. Grado 3: presencia de carcinoma invasivo con alteración del estroma (fibrosis o esclerosis). Grado 4: presencia de carcinoma invasivo intacto.
Sataloff DM B y cols. J Am Coll Surg 1995(159)	Localización primaria: T-A: efecto terapéutico total o casi total. T-B: >50% efecto terapéutico. T-C: <50% efecto terapéutico. T-D: ausencia de efecto terapéutico.

Ogston KN y cols. The Breast 2003

Sahin A y cols. Adv Therapy of Breast Cancer 2005(165)

Ganglios linfáticos axilares:

N-A: evidencia de efecto terapéutico y ausencia de metástasis
N-B: ausencia de ganglios metastásicos o efecto terapéutico.
N-C: evidencia de efecto terapéutico, pero con ganglios linfáticos metastásicos.
N-D: enfermedad metastásica viable.

Modificación de Miller and Payne

Grado 1: ausencia de cambios o alguna alteración en células malignas individuales, sin reducción de la celularidad global.

Grado 2: pequeña disminución en células tumorales pero aún con celularidad alta (hasta 30% de reducción).

Grado 3: reducción de células tumorales entre el 30-90%.

Grado 4: marcado efecto del tratamiento con reducción de células tumorales y persistencia de pequeños focos de células viables (reducción en un 90% de células malignas)

Grado 5: ausencia de células malignas en el tumor primario. Solamente presencia de fibrosis vascular del estroma conteniendo macrófagos. Sin embargo, puede existir carcinoma in situ.

Ausencia de carcinoma invasivo en la mama o en los ganglios axilares

En los últimos años, el papel pronóstico de la RCp ha sido confirmada en dos meta-análisis. Como luego veremos con detalle, el meta-análisis de Cortazar et al, demostró el papel pronóstico de la RCp en términos de SLE y SG, especialmente cuando la definición de RCp abarcaba la respuesta en mama y axila respecto a si únicamente se tenía en cuenta la respuesta en la mama (94). De forma similar, von Minckwitz et al. en el meta-análisis de 7 estudios neoadyuvantes del grupo alemán confirmó el papel de la RCp incluyendo mama y axila en tumores de alto riesgo (ductal, alto grado, RH negativo, HER2 positivo, TN), pero no en pacientes con tumores luminales A y RH+/HER2+ (166).

Recientemente, algunas organizaciones han volcado todo sus esfuerzos en la elaboración de consensos y guías de trabajo que definan de la mejor manera la RCp. Así desde la FDA, se llevó a cabo el siguiente proyecto. El mismo comenzó con la realización de un meta-análisis que incluyó un total de 11.955 pacientes que participaron en 12 ensayos clínicos randomizados de neoadyuvancia, destacando que

sólo uno de ellos combinó quimioterapia con agente biológico (estudio NOAH y TTZ (130)). Este meta-análisis intenta responder a cuatro preguntas (94).

La primera es conocer la mejor definición de RCp como factor pronóstico en términos de SG y SLE. La conclusión es que la RCp se debe definir como la ausencia de tumor infiltrante en el parénquima mamario (incluir o no carcinoma ductal no infiltrante o in situ en la definición no es importante) y la ausencia del mismo a nivel ganglionar debido a su mejor correlación tanto en SLE (ypT0 ypN0: HR 0,44, IC 95% 0,39-0,51; ypT0/is ypN0: 0,48, 0,43-0,54) como en SG (0,36, 0,30-0,44; 0,36, 0,31-0,42) (figura 11).

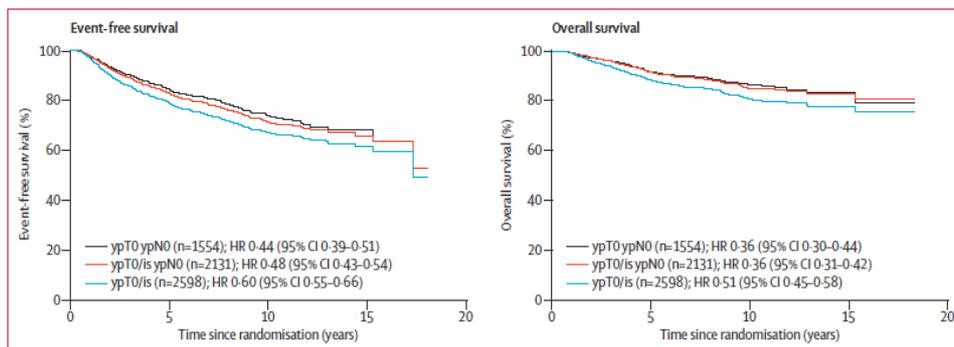


Figura 11. Asociación entre supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global (SG) con las tres definiciones de respuesta completa patológica (RCp). Se comparó la SLE y SG entre pacientes que alcanzaron o no la RCP en base a 3 definiciones. No se incluyen pacientes que no alcanzaron la RCP. Las definiciones de RCp incluyen: ypT0 ypN0= ausencia de cáncer invasivo y cáncer ductal in situ en la mama y axila. ypT0/is ypN0= ausencia de cáncer invasivo en la mama y axila, independientemente del carcinoma ductal in situ. ypT0/is ausencia de cáncer invasivo en la mama, independientemente del carcinoma ductal in situ y la afectación ganglionar. HR=hazard ratio.

En segundo lugar se estableció la asociación entre RCp (definida como ypT0/isN0) con SLE y SG. Las pacientes que alcanzaron RCp presentaban una mejor SLE y SG respecto a las que no (figura 12).

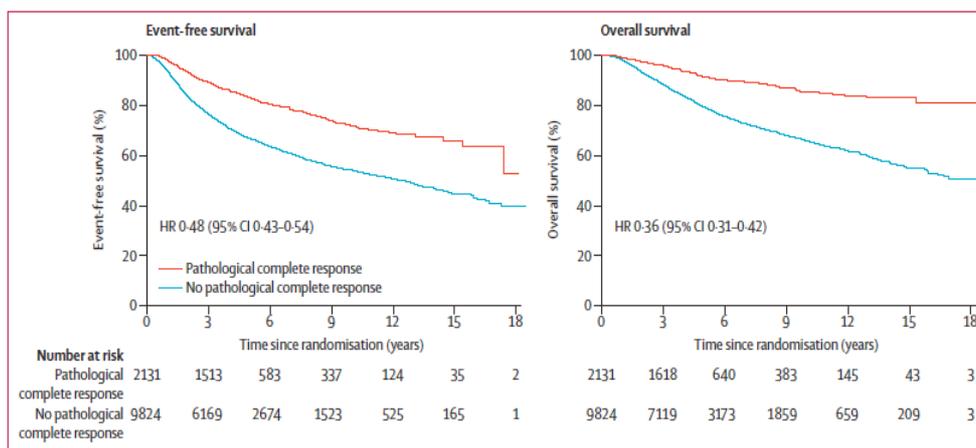


Figura 12. Asociación entre supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global (SG) con la respuesta completa patológica (RCp) definida como ypT0/is ypN0= ausencia de cáncer invasivo en la mama y axila, independientemente del carcinoma ductal in situ. HR=hazard ratio.

En tercer lugar, identificar en que subtipo histológico de CM existe la mayor correlación entre RCp y supervivencia. Esta asociación fue más potente en pacientes con CM TN (SLR: HR 0,24, IC 95% 0,18-0,33; SG: 0,16, 0,11-0,25) y en aquellos con tumores HER2 positivo, RH negativo que recibieron TTZ (SLE: 0,15, 0,09-0,27; SG: 0,08, 0,03-0,22). Por último, conocer que incremento mínimo en la tasa de RCp necesitamos para que se traduzca en un impacto en la supervivencia. En este sentido, se demostró en el análisis a nivel de ensayo una ligera asociación entre incremento en la frecuencia de RCp y SLE ($R^2=0,03$, IC 95% 0,00-0,25) y SG ($R^2=0,24$, 0,00-0,70).

Tras la obtención de los datos del meta-análisis, se confirmó el papel de la RCp como marcador subrogado de supervivencia. Con ello se busca la aprobación acelerada de fármacos en base a este parámetro. Los agentes que demuestren un incremento en la tasa de RCp respecto al tratamiento estándar podrán recibir una aprobación condicionada hasta hacerse definitiva o no con la obtención de los futuros datos sobre su impacto en términos de supervivencia. El objetivo es ofrecer de la forma más rápida posible el acceso a fármacos potencialmente muy eficaces, sin la necesidad de esperar años hasta conocer su efecto en la supervivencia.

El grupo CTNeoBC (Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer) elaboraron unas guías clínicas para el diseño de ensayos clínicos cuyo objetivo fuera el incremento en la tasa de RCp que permitiera la aprobación acelerada de fármacos y además que el estudio tenga suficiente poder estadístico para demostrar que dicho incremento repercuta en la supervivencia y así conseguir la aprobación definitiva del agente.

Por otro lado, la capacidad de predecir la posibilidad de respuesta al tratamiento antes de empezar la quimioterapia primaria es un campo de investigación importante. En un extremo existen pacientes con altas posibilidades de respuesta y por tanto con opciones a alcanzar un excelente pronóstico a largo plazo. Pero, en el sentido contrario encontramos a las pacientes con escasa probabilidad de conseguir una RCp y especialmente con pocas opciones de alcanzar una respuesta con utilidad clínica, por lo que pueden evitar recibir un tratamiento intenso y de toxicidad no despreciable.

En resumen, la RCp se está instaurando como un excelente marcador subrogado de supervivencia condicionando incluso la aprobación acelerada de fármacos. Su papel queda limitado a tumores TN y HER2 positivo, no siendo válido en tumores luminales. También hay que remarcar que desconocemos todavía muchos otros aspectos, desde qué incremento concreto en la tasa de RCp necesitamos para impactar en la supervivencia así como factores predictivos que permitan seleccionar mucho mejor a las pacientes que alcanzarán dicha respuesta.

1.3.2. Factores predictivos de RCp

El objetivo histórico de la QNA es convertir a un tumor mamario inoperable en operable. La experiencia generalizada usando QNA en CM arroja datos significativos en términos de respuesta clínica (60-80%) y con una tasa de RCp alrededor del 40%-60% según el tipo histológico (167).

Las pacientes que expresan marcadores predictivos de alta respuesta a la quimioterapia son las mejores candidatas para recibir QNA. Existen varios factores asociados con una mayor probabilidad de respuesta a la QNA (Tabla 8) (168). Su presencia se correlaciona con un mayor porcentaje de RCp tanto en el tumor primario como en los ganglios linfáticos axilares. Además, muchos de estos factores se asocian con mal pronóstico si no se inicia un tratamiento precoz.

Tabla 8. Factores biológicos y patológicos asociados con respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

Factores que están consistentemente asociados con una respuesta favorable:

- **Alto grado nuclear** (169)

Factores que pueden estar asociados con una respuesta favorable:

- **Tumores con receptores hormonales negativos** (170)

- **Tumores con elevada proliferación (KI67)** (169)

- **Alto grado de apoptosis** (169)

Factores que pueden estar asociados con una respuesta desfavorable:

- **Tumores con receptores hormonales positivos** (170)

- **Sobre-expresión de la proteína HER2** (171)

- **Mutación de p53** (172)

Factores que están consistentemente asociados con una respuesta desfavorable:

- **Bajo grado nuclear** (169)

Está extensamente documentado en varios estudios que la ausencia de expresión de RH y el alto grado nuclear histológico, se asocia a mayores tasas de RCp tras el tratamiento neoadyuvante basado en quimioterapia. Este hallazgo ha sido sólido en estudios realizados en un solo centro (173,174), como también en estudios multicéntricos (91,175).

La negatividad de los RH es uno de los marcadores predictivos de respuesta más potente, ya que la tasa de RCp en estos casos alcanza el 40%. En las pacientes con RH positivos y HER2 negativo, la probabilidad de alcanzar una RCp se sitúa entre el 3 y el 8%, por lo que, si se asocian a marcadores de baja proliferación, probablemente se beneficien más de un tratamiento neoadyuvante con hormonoterapia (176).

Guarneri y cols. (170) demostraron que las pacientes con RH negativos tienen una mayor probabilidad de obtener una RCp después de QNA; sin embargo, estas

pacientes tienen una SLE y SG a 5 años menor cuando se compara con pacientes con RH positivos. Von Minckwitz y cols. (94) confirmaron estos hallazgos en el ensayo GeparTrio. A pesar de la baja tasa de RCp, las pacientes que alcanzaron RCp presentaron mejor tasas de SLE y SG que aquellas sin RCp.

El grado tumoral y los marcadores de alta proliferación como el Ki67 también se asocian con una mayor probabilidad de respuesta. El grado de proliferación celular se puede medir a través de un ensayo inmuno-análisis, que es representado por el Ki-67. Una publicación realizada por Petit y cols. (169) demostró que tumores con una elevada expresión de Ki-67 (superior al 20%) es predictiva de respuesta clínica tras QNA.

La sobreexpresión de HER2 como factor predictivo de respuesta presenta resultados contradictorios, pero aparece que su positividad se asocia a mayor respuesta a esquemas de quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos (171), y sin duda es el factor predictivo de respuesta al tratamiento con TTZ (94,128).

Como se ha comentado previamente, los diferentes subtipos moleculares de CM basados en características genéticas, con su diferente comportamiento clínico, fueron descritos hace más de diez años (177). Debido a la dificultad práctica de esta clasificación genética las guías ESMO recomendaron usar una clasificación basada en parámetros inmuno-histoquímicos como la expresión de RE, RP, HER2 y Ki67. Así existen 5 subtipos inmuno-histoquímicos de CM (178):

- Luminal A: RE+, RP+, HER2-, Ki67 bajo y RP alto
- Luminal B: RE+, RP+, HER2-, Ki67 alto y RP bajo
- Luminal HER2+: RE+, RP+, HER2+, cualquier Ki67
- HER2-positivo: RE-, RP-, HER2+, cualquier Ki67,
- Basal (TN): RE-, RP-, HER2-, cualquier Ki67.

La tabla siguiente presenta diferentes ejemplos de la eficacia de los tratamientos

neoadyuvantes según el subtipo de CM ya sea basado en clasificación genética o inmuno-histoquímica (179–183). Así estos trabajos demuestran que en tumores luminal A la tasa de RCp es muy baja (3–7%), y sin embargo es significativamente muy elevada en tumores TN o HER2 positivo. De nuevo, mencionar que en los tumores HER2 positivo la tasa de RCp será superior siempre que se emplee un agente anti-HER2 en el tratamiento neoadyuvante.

Tabla 9. Estudios que exploran la eficacia de la QNA según subtipos de CM clasificados genética o inmuno-histoquímicamente.

Estudio	Método de Identificación del subtipo	Tratamiento Número de pacientes	Resultados: RCp%
Rouzier et al 2005 (179)	Genotipado Affymetrix U133A	N = 82 Paclitaxel → FAC	Luminal A/B 7% HER2+ 45% Basal 45%
Prat et al 2009 (180)	Genotipado PAM50	N = 347 antraciclina + taxano	Luminal A 7% Luminal B 17% HER2+ 36% Basal 43%
Chang et al 2010 (181)	IMH	N = 74 Carboplatino (AUC 6) + taxano ± trastuzumab	RH+/HER2– 19.4% HER2+trast+ 40% HER2+trast– 7.1% TN 54.6%
Fasching et al 2011 (184)	IMH	N = 547 Antraciclina/ antraciclina + taxano/otro ± trastuzumab	RH + HER2– Ki67 < 38% 3% RH + HER2– Ki67 > 38% 18.9% RH ± HER2+trast+ 52% RH ± HER2+trast– 28.8% TN 47.3%
Straver et al 2010 (182)	IMH	N = 254 AC/AT/paclitaxel ± trastuzumab ± carboplatino	RH + HER2– 2% HER2+trast+ 35% HER2+trast– 8% TN 28%

IMH: inmunohistoquímica; TN: CM triple-negativo; trast+ : pacientes tratados con trastuzumab preoperatorio; trast– : pacientes no tratados con trastuzumab preoperatorio.

Varios estudios han demostrado que existe una importante diferencia en la respuesta patológica que se obtiene en los CLI frente a los CDI. En efecto, Cristofanilli y cols.

(185) analizaron 1.034 pacientes con estadio clínico II y III que habían participado en 6 ensayos clínicos basados en QNA entre 1985 y 2002. El 12% de las pacientes tenían tumores con CLI. El análisis multifactorial determinó que las pacientes con CLI comparadas con aquellas con CDI presentaron una menor probabilidad de alcanzar RCp (3% vs. 15%; $p < 0,001$). Pero, quizás el hallazgo más llamativo fue que la diferencia en RCp entre CLI y CDI persistía después de haber ajustado las variables de expresión de RH y el uso de taxanos.

Otro aspecto a tener en cuenta es el estadio clínico. Tanto el tamaño tumoral como la afectación ganglionar al diagnóstico son factores predictivos de respuesta. Las pacientes con tumores de menor tamaño y sin afectación ganglionar tendrán mayor facilidad para obtener mayores tasas de RCp, especialmente en tumores de alta proliferación y RH negativos (186,187).

Respecto a otros factores clínicos, la edad de las pacientes al diagnóstico es uno de los de mayor importancia. Las pacientes jóvenes alcanzarán mayores tasas de RCp tras QNA (188). Diversas revisiones han demostrado que las pacientes con alto índice de masa corporal se asocia a peores tasas de RCp independientemente del subtipo histológico (189,190). Así, en una revisión que incluyó 8.872 pacientes de 8 estudios con QNA se objetivó que las pacientes con peso normal presentaron mayores tasas de RCp respecto aquellas con obesidad ($p=0.003$) (189).

Los estudios genéticos constituyen el futuro próximo de la evaluación de la respuesta a la QNA. Los estudios de biología molecular también sirven para el conocimiento de los mecanismos de sensibilidad a distintas drogas, como por ejemplo al paclitaxel (191). Con el advenimiento y uso del estudio de perfiles o firmas de expresión genética, esta tecnología ha incrementado la esperanza en descubrir predictores más robustos de respuesta a la terapia, examinando miles de genes en los especímenes de patología. Es sabido que muchas de las características fenotípicas CM son la causa de la coordinación de la expresión de genes. Por ejemplo, los tumores con RH

positivos difieren de los RH negativos en la expresión de miles de genes (192,193); el patrón de expresión genética de los tumores de alto grado es muy diferente a los de bajo grado (194).

Actualmente existe más de un modelo para predecir la RCp. Un claro ejemplo lo tenemos con la plataforma que analiza 21 genes, de este modo, las pacientes con un alto valor de recurrencia determinados por el Oncotype Dx tienden a tener una mayor probabilidad de obtener RCp tras recibir QNA basada en antraciclina y taxanos (paclitaxel seguido de FAC) (195).

1.3.3. Factores pronósticos tras quimioterapia neoadyuvante

Dada la gran heterogeneidad en la presentación del CM, su evolución es extremadamente variable, dependiendo de múltiples factores incluyendo aquellos intrínsecos del cáncer y terapéuticos. Además, los factores pronóstico para pacientes que reciben quimioterapia adyuvante son distintos para aquellas que reciben QNA. Es por ello, que existen numerosos sistemas que intentan predecir el curso de la enfermedad, a corto y largo plazo, combinando elementos clínicos, patológicos y biológicos.

Como un grupo importante de pacientes que reciben QNA debutan con tumores localmente avanzados, una preocupación teórica acerca del uso de la QNA es la presencia de recurrencia local después de la cirugía. Dos estudios multicéntricos revisaron la tasa de recurrencias locales tras la QNA. Rouzier y cols. (196) analizaron retrospectivamente 257 pacientes tratadas en varios hospitales franceses. El hallazgo de recurrencia ipsilateral mamaria a 5 y 10 años fue del 16 y 21%, respectivamente. Las pacientes con tasas más altas de recurrencia ipsilateral tenían menos de 40 años de edad y el tumor residual después de QNA era mayor a 2 cm. En otro estudio multicéntrico francés (121) también se publicó una mayor tasa de recurrencia ipsilateral mamaria, especialmente cuando el tumor primario era mayor de 3 cm.

En un estudio retrospectivo de Chen y cols. (197) se revisó la base de datos del MD Anderson Cancer Center desde 1987 hasta el año 2000, identificándose 340 pacientes que recibieron QNA, seguida de CC y radioterapia. Tras un seguimiento de 5 años, la tasa de RLR fue de 4,7% y la supervivencia libre de RLR a 5 años del 95%. Los factores asociados con una alta tasa de RLR fueron: estadio clínico N2 ó N3, tumor residual mayor a 2 cm, patrón multifocal del tumor residual, e invasión linfocelular. El tamaño tumoral no se correlacionó con el patrón de RLR, confirmando que el tamaño tumoral no es una contraindicación para realizar cirugía conservadora.

El número de ganglios axilares con afectación metastásica tras el uso de la QNA es uno de los mejores factores pronósticos (198,199). Existe suficiente evidencia clínica que sugiere que las pacientes con confirmación histológica de afectación ganglionar axilar previo al inicio de la QNA y que obtienen una respuesta patológica tras la misma presentarán un mejor pronóstico que aquellas que no la alcancen (173,174). Existe evidencia clínica que demuestra la capacidad de la QNA de convertir ganglios axilares positivos en negativos. En el estudio NSABP-B18 (91,175) se objetivó que la tasa de ganglios axilares negativos tras la cirugía el grupo de pacientes tratados con QNA y quimioterapia adyuvante fue del 59 y 42% respectivamente.

En los últimos años, se han buscado nomogramas basados en factores clínicos y patológicos que sean capaces de predecir el riesgo de recidiva y la SG, sin embargo, a pesar de existir gran cantidad de ellos, su aplicación en la práctica clínica es nula debido a su falta de validación. Un claro ejemplo es el estudio de Jeruss y cols. (186) donde utilizaron la combinación de variables clínicas, biológicas y patológicas. El objetivo de este estudio fue confirmar su papel como herramienta pronóstica de las pacientes que reciben QNA. En este innovador modelo se combinaba el sistema clásico de grados clínico-patológico con dos variables biológicas de pronóstico adverso, como son la ausencia de expresión de RH y el alto grado nuclear. En este estudio se analizaron 932 pacientes y con una mediana de seguimiento de 5 años. Es interesante comprobar como con la incorporación de estas dos variables al sistema

clásico, la SLE en pacientes que obtuvieron RCp variaba considerablemente, siendo la tasa de supervivencia mucho menor al no incluir en el análisis las dos variables biológicas adversas.

No cabe duda que el principal factor pronóstico del tratamiento neoadyuvante es la RCp. Sin embargo, no podemos olvidar otros factores clínicos, especialmente la afectación ganglionar y factores patológicos, como la expresión de receptores hormonales y HER2, que influirán de forma importante en el pronóstico de nuestras pacientes.

1.4. Mecanismos de resistencia al tratamiento neoadyuvante en población HER2 positiva

1.4.1. Introducción

La sobre-expresión de HER2 se asocia a peor pronóstico debido a su impacto en la supervivencia, proliferación celular, apoptosis, migración y metabolismo(200) a raíz de la activación de las dos principales vías de señalización: PI3K/Akt/mTOR y Ras/Raf/MAPK (201).

La clasificación en subtipos tumorales del CM (luminal A y B, basal y HER2) ha supuesto un gran avance ya que ha generado la aparición de terapias específicas para cada uno de ellos. Como se ha mencionado anteriormente, la aparición de TTZ como terapia específica para este subgrupo ha cambiado la historia natural de la enfermedad, sin embargo, existe un grupo importante de pacientes que no responden al tratamiento debido a la presencia de resistencias, primarias o secundarias, en la vía HER2 (202).

En el subgrupo HER2 la combinación de terapias anti-HER2 y quimioterapia proporcionan tasas de RCp superiores al 40-60% cifras que no se alcanzan en tumores luminal A y B donde son menores al 10% (130,179,203). Aunque no existe ningún

esquema óptimo, la administración secuencial de antraciclinas y taxanos combinados con TTZ ofrece los mejores resultados (128,130). Recientemente la administración concomitante de TTZ y PTZ con quimioterapia basada o no en antraciclinas ha demostrado ser la mejor opción terapéutica (134,145).

Sin embargo, a pesar de elevadas tasas de RCp, existe un grupo importante de pacientes que no obtendrán la respuesta deseada y en consecuencia tendrán un mayor riesgo de recidiva (157). En la actualidad, no existe ningún factor predictivo que nos permita seleccionar el tratamiento específico a cada paciente, desconocemos qué paciente se podría beneficiar de esquemas con antraciclinas, del doble bloqueo e incluso de esquemas sin quimioterapia. Únicamente conocemos que el grupo de tumores HER2 con RH negativos se asocian a mayores tasas de RCp (134,141,145,187).

Recientemente, ha aumentado el interés por las alteraciones del microambiente tumoral en el CM. Concretamente, el estudio del infiltrado linfocitario tumoral (TIL) por inmuno-histoquímica que es una técnica factible desde el punto de vista asistencial. Puede tener una implicación clínica para la selección de las pacientes con CM mediante la combinación de los dos factores predictivo de respuesta a la quimioterapia (los dependientes del tumor y los dependientes del microambiente tumoral) y como determinante de la progresión neoplásica (204). En este sentido, en las pacientes con CM HER2-positivo, se ha descrito que los incrementos de TIL se asocian a mayores tasas de RCp y a una disminución del riesgo de recaída y de muerte (205).

Es evidente que deben existir mecanismos de resistencia al tratamiento que impiden conseguir respuesta. Se han descrito múltiples mecanismos de resistencia, destacando entre ellos la activación constitutiva de la vía de fosfatidinositol 3-quinasa (PI3K)-AKT así como cross-talk con otras vías de señalización como insulín growth factor receptor IGFR-1 (206). En cuanto a la activación constitutiva de la vía de

PI3K-AKT cabe destacar el papel que desarrollan las proteínas fosfatasa y homólogo de la tensina (PTEN) y la subunidad catalítica de PI3K (PI3KCa), capaces de definir la sensibilidad a TTZ (207–209). Así, niveles bajos de PTEN se asocian a bajas respuestas a TTZ, mientras que mutaciones en PI3KCa, principalmente en los exones 4, 7, 9 y 20, indicarán resistencias al tratamiento.

Del mismo modo, la fosforilación del factor de iniciación 4-E Binding Protein 1 (4EBP1) indica de manera indirecta el grado de activación de la vía HER-2. Niveles elevados de p-4EBP1 se asocian a peor pronóstico (210).

Sin embargo, todos los trabajos descritos han analizado el papel pronóstico de estas proteínas y genes, pero, son muy pocos los que han revisado su poder predictivo para la RCp (211,212).

Revisaremos de forma individualizada el papel pronóstico y predictivo de cada uno de ellos así mismo como los mecanismos de resistencia o en estudio en los siguientes apartados.

1.4.2. Mecanismo de acción y resistencia a Trastuzumab

HER2 se caracteriza por carecer de ligando extra-membrana, para su activación precisa de la unión con uno de los miembros de la familia HER formando homo/hetero-dímeros y la consecuente activación mediante fosforilación de la cascada de señalización intracelular que incluye la vía de las proteína-quinasa (MAPK) y la vía PI3K.

Los conocimientos actuales sobre los mecanismos a través de los cuales actúa TTZ se resumen básicamente en tres (figura 13):

- En primer lugar, impide la formación de heterodímero HER2-HER3 que ocurre bajo condiciones de sobre-expresión de HER2 (213).

- En segundo lugar, aceleración de la internalización y la degradación de los receptores de la proteína HER2 (214).

- Reclutamiento de células inmunes para atacar y erradicar las células tumorales diana, mediante citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (215).

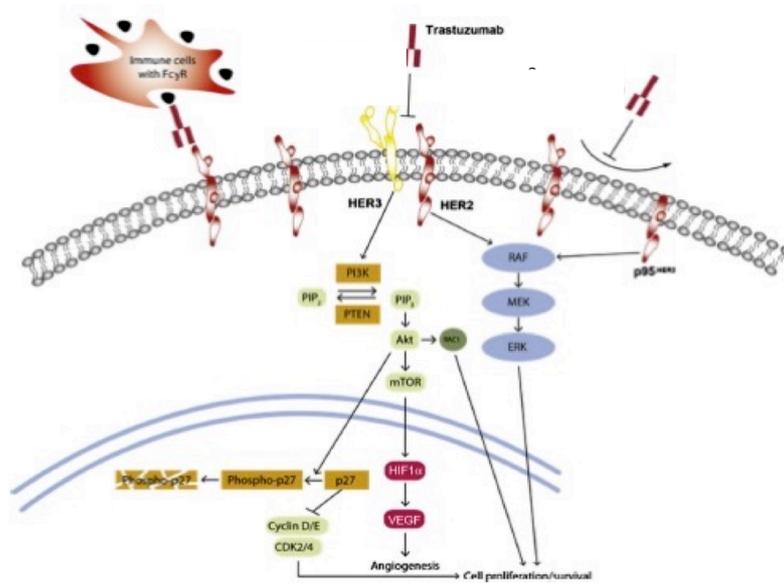


Figura 13. Resumen mecanismos de acción de trastuzumab. AC: anticuerpo; CDK: ciclina-dependiente de quinasa; ERK, quinasa regulada por señal extracelular; HER: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HIF: factor inducible por hipoxia; MEK: proteína quinasa mitogena-activada /ERK quinasa; mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa; PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato; PTEN: fosfatasa y homólogo de la tensina; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular. Adaptada de De Padrip (216).

Como se ha comentado previamente, los mecanismos de resistencia a TTZ son múltiples:

- Alteraciones a nivel de la proteína HER2 con la presencia de formas truncadas generadas por splicing alternativo como p95 (217,218). P95HER2 es una forma

truncada de HER2 formada tras la pérdida del dominio extracelular de unión a TTZ, descrito en el 26% de los CM HER2 positivo(218). Puede ser originada por pérdida proteolítica del dominio, o bien por inicio alternativo de la translación desde los residuos metionina 611 y 687 (219,220) (figura 14). La elevada expresión de p95HER2 ha sido asociada a una disminución en la tasa de respuestas en el CM precoz HER2 positivo y peor pronóstico en el CMM tratado con TTZ (217,221). Sin embargo, existen muchas dificultades a la hora de la cuantificación y determinación de p95HER2, por lo que todavía existen muchas dudas respecto a su papel predictivo y pronóstico(222).

- Mutaciones somáticas que condicionan la activación constitutiva de HER2. Debido a alteraciones en el dominio extracelular, como sería el acúmulo de formas truncadas, o bien mutaciones puntuales o inserciones que activarían de forma constitutiva el receptor en ausencia de sobre-expresión o amplificación del mismo (223,224) (Figura 14).

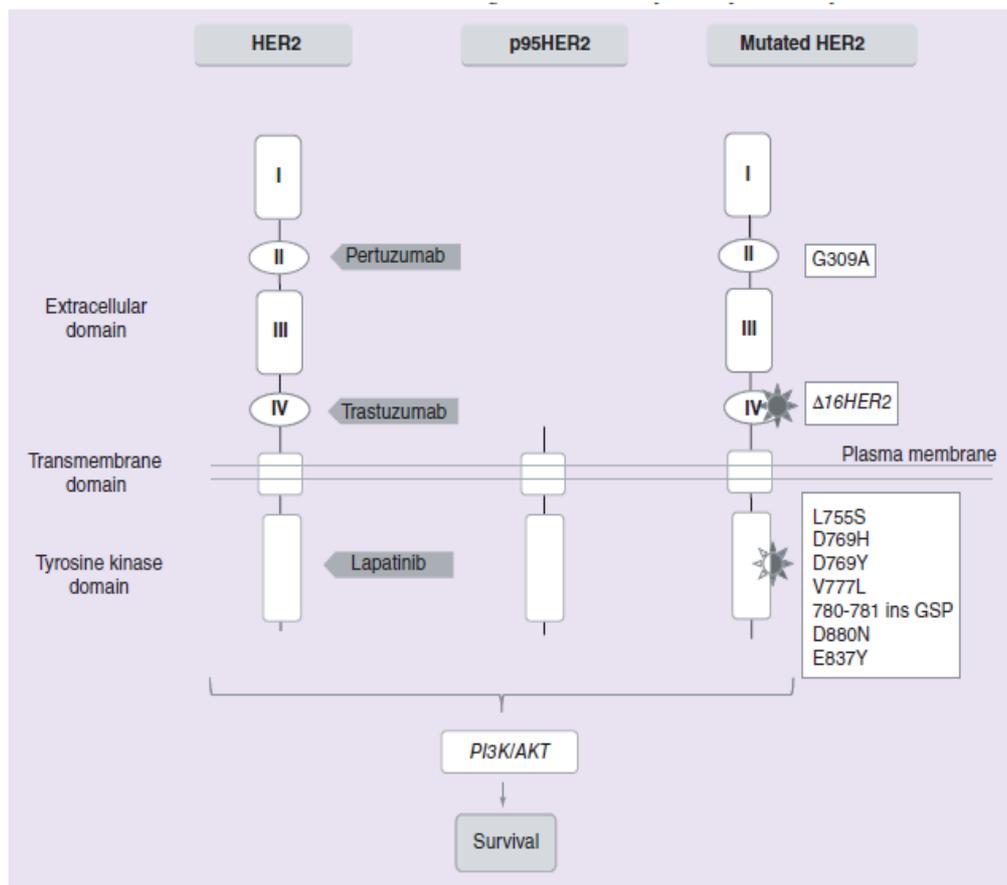


Figura 14. Mecanismos de resistencia a trastuzumab: formas truncadas (p95) y mutaciones en HER2. Adaptado de Scaltriti M(217).

- Incremento de la señalización a través de otros miembros de la familia HER como la activación de la tirosina quinasa de EGFR y la sobre-expresión de HER3 se asocian a resistencias a TTZ (225,226).
- Por otro lado, activaciones por vías alternativas a HER2 como la vía de IGFR y del RE (211,227–230). La sobre-expresión de los RH se asocia a peores tasas de RCp (141,145,231) y mayores tasas de SG (157).
- Y por último, la que mayor peso podría tener y en la que profundizaremos a continuación serían las alteraciones en los componentes de la cascada de señalización

intracelular PI3K/PTEN/AKT (208,232–234). El principal mecanismo abarca las alteraciones en la señalización intracelular donde se incluyen las mutaciones activadoras de PI3KCA y AKT así como la menor expresión de PTEN lo que conduce a una activación constitutiva de la vía (235,236).

1.4.3. Activación de la vía de señalización PI3K-AKT como mecanismo de resistencia a terapias anti-HER2

1.4.3.1. PI3KCA

PI3K está formado por dos subunidades: la subunidad reguladora de 85 KD y la subunidad catalítica de 110 KD (237), que está codificada por el gen PIK3CA. Esta unidad catalítica usa ATP para fosforilar PIP3. Por otro lado, PIP3 es necesario para el traslado de AKT1 a la superficie celular, donde será fosforilado y activado por el resto de quinasas (238).

PI3K fosforila PIP2 en la posición 3-OH para producir PI(3,4,5)P3 (PIP3). PTEN defosforila PIP3 a PIP2, bloqueando la señalización dependiente de PI3K. PIP3 propaga la señal intracelular mediante su unión directa a los dominios homólogos de la plecstrina de la quinasa dependiente de fosfoinositol (PDK1) y AKT (238). De forma paralela PDK1 activa mediante la fosforilación de la treonina 308 de AKT (239,240).

La señalización a través de PI3K-AKT promueve el crecimiento y supervivencia celular mediante múltiples mecanismos:

- Inhibiendo a miembros de la familia pro-apoptótica Bcl-2 como BAD y BAX (238,241).
- AKT impide la regulación negativa del factor de transcripción NFK-B, permitiendo el incremento de factores de transcripción anti-apoptóticos (242).
- Además la fosforilación de Mdm2 antagoniza la apoptosis

mediada por p53, y AKT negativamente regula la quinasa glicógeno sintetasa 3 (GSK3) aumentando la supervivencia y diferenciación celular (242).

- Otro de los aspectos importantes es que AKT fosforila TSC2, inhibiendo la actividad GTPasa de Rheb del dímero TSC1/TSC2. La activación de Rheb activa a su vez mTOR (diana de la rapamicina en células de mamíferos) y a su vez del complejo mTORC1, que finalmente incrementa la actividad de la quinasa S6 (241). La activación de mTORC1 tiene como resultado un incremento en la síntesis de proteínas mediante la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 4E y de la proteína ribosomal S6. Mientras tanto, un segundo complejo mTOR, mTORC2, permite la activación completa de AKT a través de la fosforilación de la serina 473 de AKT (243,244). Hay que destacar que la activación de la quinasa S6 actúa como feed-back negativo disminuyendo la activación de PI3K.

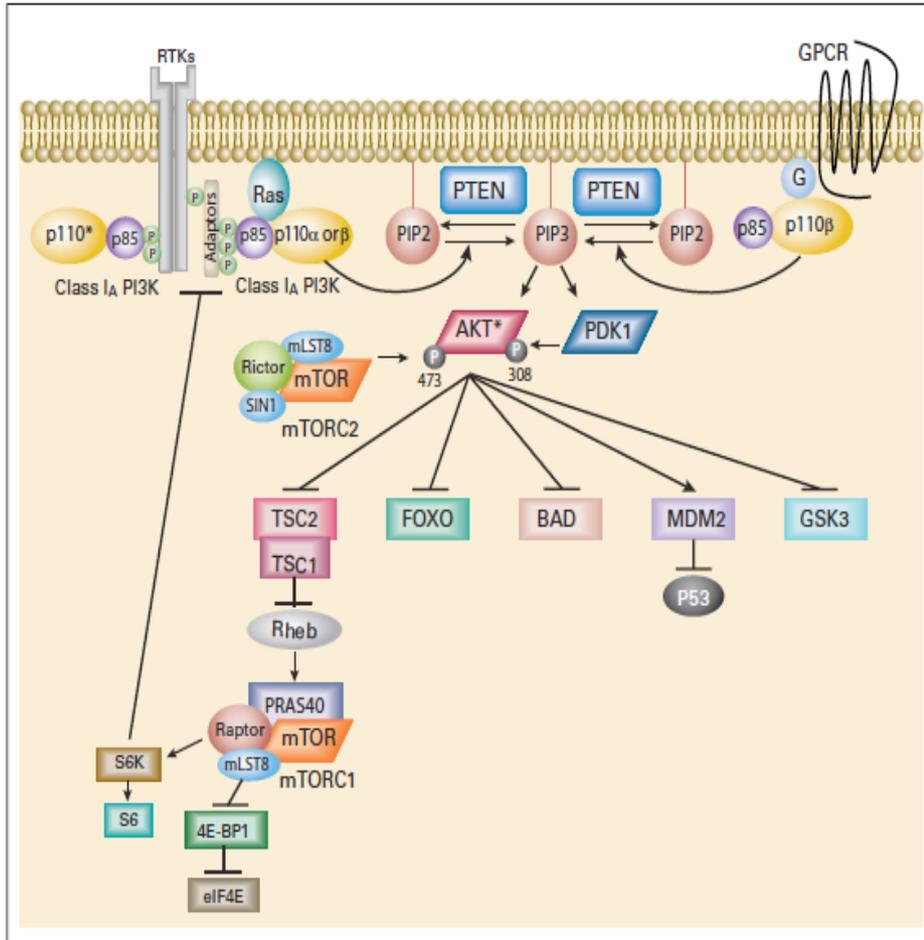


Figura 15. Vía de señalización de fosfatidinositol 3-quinasa (PI3K). Flechas representan activación y las barras reflejan inhibición. Un feed-back negativo ha sido descrito desde quinasa con diana S6 (S6K) al los adaptadores de la proteína IRS-1. RTK: receptor tirosina quinasa; GPCR: proteína G acoplada al receptor; P: fosfato; G: proteína G; PTEN: fosfatasa y homólogo de la tensina; IRS-1: sustrato 1 del receptor insulínico; eIF4E: factor de iniciación eucariótico 4E; S6: proteína ribosomal S6; PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; mTORC2: rapamicina (mTOR) –conteniendo el complejo proteico 2. (*) p110 alpha, beta, o delta.

Las mutaciones activadoras de PIK3CA han sido encontradas en aproximadamente el 21–28% de los CM estadios I-IV (245–248). Las mutaciones de PIK3CA se localizan principalmente en dos puntos de los dominios helicoidales (E542K y E545K, en el exón

9) y en la subunidad catalítica p110 (H1047R, exón 20)(248,249). Estas mutaciones han demostrado ser tumorigénicas en células epiteliales mamarias mediante la activación de PI3K independiente de factores de crecimiento (250). La mutación en el dominio p110 (E633K), ha sido descrita en pacientes con CM HER2 positivo (251), la cual condiciona un incremento en la actividad basal de este dominio, la activación de AKT, así como la transformación y supervivencia celular (252).

El impacto de estas mutaciones en la agresividad del CM y pronóstico del paciente no está del todo claro. Las mutaciones en PIK3CA sugieren en estudios preclínicos resistencia a terapias anti-HER2 y fármacos contra los receptores tirosina quinasa (208,235,253,254). Sin embargo, una reciente revisión no ha encontrado asociación entre la mutación de PIK3CA o la activación de la vía de PI3K y la tasa de respuestas a esquemas de tratamiento neoadyuvante basados en TTZ en 70 pacientes con CM HER2 positivo incluidos en 3 estudios (255). Por otro lado, a diferencia de estudios como Neosphere donde las mutaciones en PI3KCA se asociaron a una menor tasa de RCp independiente del agente anti-HER2 empleado (230), el estudio fase II Tryphaena no ha demostrado diferencias significativas en la tasa de RCp entre diferentes brazos de tratamiento combinando TTZ + PTZ + quimioterapia en base a la existencia o no de mutaciones en PI3KCA (detalles en tabla 10) (231).

En enfermedad avanzada HER2 positiva, el estudio fase III Cleopatra incluyó 557 pacientes randomizadas a PTZ + TTZ y docetaxel frente a placebo + TTZ y docetaxel demostró un gran efecto pronóstico de las mutaciones de PI3KCA en la SLP, con mayores tiempos libres de progresión en pacientes no mutados (wild-type) para PI3KCA independientemente del tratamiento con PTZ (256). Estos resultados confirman los hallazgos previamente descritos en una cohorte de 80 pacientes con CM operable HER2 positivo tratados con TTZ durante 1 año, que mostraron de forma significativa una menor SLE en los casos con PI3KCA mutados ($p = 0.0063$). Pacientes con mutación en PI3KCA también presentaron una peor SG ($p = 0.035$) (245).

Además de las mutaciones activadoras de PI3KCA, la expresión del RH es un factor de resistencia al tratamiento con TTZ mediante el 'crosstalk' existente entre ambas vías de señalización (257). En el estudio de Loibl S (258). et al, con 504 muestras de tres estudios del grupo alemán, se observó que el 21.4% de las pacientes con CM HER2 positivo presentaban mutación en PIK3CA. La presencia de mutación en PIK3CA se asoció de manera significativa a menores tasas de RCp (19.4% con mutación de PIK3CA vs 32.8% en PIK3CA wild-type; OR=0.49; IC 95%, 0.29-0.83; P=0.008). En 291 tumores RH+, la tasa de RCp fue del 11.3% con mutación de PIK3CA comparado con 27.5% en PIK3CA wild-type (OR=0.34; IC 95%, 0.15-0.78; P= 0.011). Sin embargo, en 213 pacientes con tumores RH-, la tasa de RCp fue del 30.4% en mutados PIK3CA y del 40.1% sin ella (OR= 0.65; IC 95%, 0.32-1.32; P=0.233).

Del mismo modo, pacientes con CM HER2 positivo, RH positivo y mutación de PI3KCA presentan tasas de recidivas más frecuentes a 3 años (89 vs 25%; detalles en tabla 10) según el análisis realizado en una cohorte de 46 pacientes tratados con TTZ (259).

Estos datos generan la hipótesis del análisis combinado del estado del receptor hormonal con otros marcadores genéticos, como mutaciones de PI3KCA, es un factor a considerar en la recidiva de pacientes con CM HER2 positivo.

Como se ha comentado anteriormente, el papel de la mutación de PI3KCA como factor de mal pronóstico no está a día de hoy del todo establecido, ya que hay estudios que no han confirmado dicha asociación como se muestra en la tabla 10 (233,258,260–262). A pesar de la peor tasa de respuestas a terapias anti-HER2 descrita en pacientes con mutación de PI3KCA, no existen diferencias en términos de SLP y SG. Estos resultados han sido descritos en dos series recientes de 687 y 504 pacientes con CM HER2 positivo (258,262).

Tabla 10. Resultados clínicos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratado con trastuzumab, pertuzumab y lapatinib de acuerdo al estado de PI3KCA.

Estudio (Año)	Paciente Patología	N Pacientes	Fármaco	Resultados
Berns et al (2007) (235)	CM HER+	55	Trastuzumab	SLP PIK3CA mutación (mutado/WT): p = 0.052 TTP (mutado/WT): HR: 1.6; p = 0.210 SLP activación de vía PI3K (si/no): p = 0.007 TTP (activado/no activado): HR: 1.9; p = 0.048
Razis et al (2011) (260)	CMM HER2+	139	Trastuzumab	PIK3CA mutaciones: – TTP (HR: 2.50; p = 0.003) – Supervivencia T (p = 0.27) – Supervivencia M (p = 0.29) PI3K activación: – TTP (HR: 2.16; p = 0.004) – Supervivencia T (HR: 2.12; p = 0.041) – Supervivencia M (HR: 2.51; p = 0.006)
Nisihimura et al (2012) (261)	CMM HER2+	15 7 11	Trastuzumab	SLP 22 meses: – PIK3CA mut = 5/15 (exones 9/20) SLP 6 meses: – PIK3CA mut = 0/7 SLP 2 meses: – PIK3CA mut: 3/11

Takada et al (2013) (259)	CM	46	Trastuzumab Neoadyuvante (37/46)	(exones 9/20) SLR (PIK3CA+/±): 56 vs 85%; p = 0.041
	HER2+		Trastuzumab Adyuvante (5/46)	SLP (hR+)PIK3CA+/±: 40 vs 100%; p = 0.001 SLP (hR-)PIK3CA+/±: 100 vs 57%; p = 0.2 SLP (hR+)PIK3CA (mutated/WT): 25 vs 89%; p = 0.006
Loi et al (2013) (262)	CM	687	Trastuzumab	PIK3CA genotipo/trastuzumab pronóstico: – SLP (HR: 0.88; p = 0.56) – SG (HR: 0.603; p = 0.11)
	HER2+			PIK3CA genotipo/trastuzumab beneficio p interacción: – SLP (p = 0.14), SLR (p = 0.17), SG (p = 0.24) PIK3CA SLP/trastuzumab beneficio (mutado): HR: 0.19; p = 0.06 (WT): HR: 0.98; p = 0.97
Wang et al	CM	70	Trastuzumab Neoadyuvante	RCp PIK3CA

(2013) (255)	HER2+			(mutación/normal) RR = 1.114; p = 0.814 RCp activada/no activada vía PI3K RR = 0.787; p = 0.459 RR = 0.772; p = 0.462
Cizkova et al (2013) (245)	CM	43	Trastuzumab Neoadyuvante	SLP (población global)
	HER2+	37	Trastuzumab adyuvante	PIK3CA (mutado/WT; HR:4.26; p = 0.0063) SLP trastuzumab neoadyuvante / PIK3CA WT (HR: 1) SLP trastuzumab adyuvante/PIK3CA WT (HR: 2.46 [0.45– 13]) SLP trastuzumab neoadyuvante/ PIK3CA mut (HR: 4.54 [0.64–32]) SLP trastuzumab adyuvante/PIK3CA mut (HR: 9.78 [1.8– 53])
Schneeweiss et al (2014) (231)	CM	73	FEC+T+P;D+T+P	RCp (PIK3CA
	HER2+	75	FEC; D+T+P	mutación/WT;
		77	Carbo+D+T+P	48.7 vs 64.3%; p = 0.17)
Loibl et al (2014) (258)	CM	173	Trastuzumab Neoadyuvante	RCp (PIK3CA
	HER2+	91	Lapatinib Neoadyuvante	mutación/WT; 19.4 vs 32.8%; OR: 0.49; p = 0.008) hR+ (291/504) RCp

		240	Trastuzumab+lapatinib Neoadyuvante	(PIK3CA mutación/WT; 11.3 vs 27.5%; OR: 0.34; p = 0.011) hR- (213/504) RCp (PIK3CA mutación/ WT; 30.4 vs 40.1%; OR: 0.65; p = 0.233) SLP PIK3CA (mutación/WT) HR: 1.065; p = 0.854 SG PIK3CA (mutación/WT) HR: 0.586; p = 0.219
Baselga et al (2014) (256)	CMM HER2+	557	Pertu+trastuzumab+docetaxel Trastuzumab+docetaxel	Mediana SLP PIK3CA (mutados/WT): 12.5 vs 21.8 meses Mediana SLP PIK3CA (mutados/WT): 8.6 vs 13.8 meses
Majewski et al (2015) (263)	CM HER2+	335	Neoadyuvante: Paclitaxel+trastuzumab Paclitaxel+trastuzumab+lapatinib Paclitaxel+lapatinib	RCp (PIK3CA mutación/WT; 21.3 vs 34.5% IC 95%, 2.2- 24%; p = 0.03)

†Mutado+ganancia ‡Wild-type + normal + pérdida + disomía parcial uniparental. CM: cáncer de mama; CMM: cáncer de mama metastásico; HER2+: HER2 positivo; hR+/-: receptor Hormonal positivo/negativo; OR: Odds ratio; RCp: respuesta completa patológica; RR: tasa de respuestas; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; Supervivencia M: supervivencia desde el diagnóstico de la primera metástasis; Supervivencia T: Supervivencia desde el inicio de trastuzumab; TTP: Tiempo a la progresión; WT: Wild-type. Tabla modificada de Madrid-Paredes et al (264).

Hay que destacar, que en existen pequeñas series en los que se analiza el estado de activación de la vía de PI3K (análisis combinado de la expresión de PTEN y mutaciones de PI3KCA. Así, las pacientes con la vía de PI3K activada (falta de expresión de PTEN y/o mutación de PI3KCA) presentaron una menor tasa de RCp (265), intervalos más cortos de progresión (235) y en la enfermedad avanzada peor SLP y SG.

1.4.3.2. AKT

AKT es una serina/treonina quinasa también conocida como PKB y es una de las dianas mejor conocidas de los productos lipídicos generados por PI3K. En este sentido, PIP3, el producto más abundante de PI3K, es requerido para el traslado de AKT a la membrana celular (266). La activación de AKT vía PI3K está implicada en la regulación de múltiples procesos relacionados con el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (267).

Un 8% de las pacientes con CMM HER2-positivo presentan la expresión de AKT (268). Como se describe en la tabla 11, la expresión y activación de AKT mediante fosforilación ha sido investigada en el CM como marcador predictivo de respuesta, sin embargo, los resultados no son concluyentes, ya que muchos estudios no han encontrado su asociación con la respuesta a TTZ y otros parámetros de supervivencia. En una serie de 104 pacientes con CMM HER2 positivo tratados con TTZ, AKT fosforilado (pAKT) ha demostrado su papel de mal pronóstico asociándose a tasas de SG inferiores (269). En combinación con la pérdida de PTEN, pAKT también ha sido capaz de predecir menores tasas de SG en una serie de 137 pacientes con CM HER2 positivo (265). Por otro lado, no se ha descrito asociación entre la expresión de AKT y la resistencia a TTZ en términos de tasa de respuestas en una serie de 25 pacientes con tanto CMLA o CMM tratado con TTZ (268).

Tabla 11. Resultados clínicos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratado con trastuzumab y lapatinib de acuerdo al estado de AKT.

Estudio (Año)	Paciente Patología	N Pacientes	Fármaco	Resultados
Smith et al (2004) (270)	CM HER2+	77	Trastuzumab	EGFR+(p-AKT+/p-AKT-) progresores 82 vs 62%; p = NS EGFR-(p-AKT+/p-AKT-) progresores 80 vs 94%; p = NS
Robinson et al (2006) (269)	CMM HER2+	104	Trastuzumab	Mediana SLP (p-AKT+/p-AKT-) 8 vs 9 meses; p = 0.7 Mediana SG (p-AKT+/p-AKT-) 21 vs 17 meses; p = 0.18 SG (p-AKT+/p-AKT-) HR: 0.42; p = 0.02
Esteva et al (2010) (271)	CMM HER2+	137	Trastuzumab	(p-AKT+/ p-AKT-) RC + RP + EE (46 vs 35), PE (26 vs 29); p = 0.298 SG: p = 0.526 (PTEN-pérdida+p-AKT+/ PTEN-normal+p-AKT-) RC + RP + EE (16/30 vs 15/24; p = 0.585) SG: (PTEN-pérdida+p- AKT+/ PTEN-normal+p- AKT-); p = 0.016
Duman et al (2013) (268)	CMLA y CMM	25	Trastuzumab	Trastuzumab resistencia: – AKT (+/-): (12 vs 8%)

Baselga et al (2014) (272)	HER2+			No trastuzumab resistencia: – AKT (+/-): (44 vs 36%); p = 0.79 – CR/AKT expresión (p = 0.154)
	CMM HER2+	465	Pertuzumab +trastuzumab+docetaxel Trastuzumab+docetaxel	SLP p-Akt citoplasmático (alto/bajo): HR: 1.09; p = 0.4854 SLP p-Akt nuclear (alto/bajo): HR: 0.8; p = 0.0741

CM: cáncer de mama; CMLA: cáncer de mama localmente avanzado; CMM: cáncer de mama metastásico; EE: enfermedad estable; HER2+: HER2 positivo; HR: hazard ratio; NS: no significativo; RC: respuesta completa; RCp: respuesta completa patológica; RP: respuesta parcial; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión. Tabla modificada de Madrid-Paredes et al (264).

1.4.3.3. PTEN

PTEN es una fosfatasa dual que defosforila fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PI3,4,5P3) (273). Del mismo modo que PI3K cataliza la producción de PI3,4,5P3, PTEN antagoniza con PI3K, regulando la actividad de AKT (238).

La pérdida de la función de PTEN ha sido descrita en cerca del 50% de los CM y en muchos otros tumores y es debida a (273–275):

- Mutaciones en PTEN
- Haploinsuficiencia de PTEN por pérdida de heterocigosidad en el locus PTEN
- Por cambios epigenéticos en PTEN

La pérdida de función de PTEN se cree que es debida a una mayor activación de la vía PI3K, ya que se considera a PTEN como un inhibidor natural de esta vía. Los estudios in vitro han demostrado que mutaciones inactivadoras de PTEN confieren sensibilidad a inhibidores de la vía PI3K/AKT, demostrando con ello que estas mutaciones promueven la resistencia a tratamientos (209).

La pérdida de PTEN y su impacto pronóstico en el CM así como resistencias a terapias anti-HER2 ha sido investigada con resultados contradictorios como indica la tabla 12.

Múltiples estudios han demostrado que tumores PTEN-deficientes se asocian a mayores tasas de resistencia en pacientes con CM HER2 positivo tratados con TTZ (208,231,259). Sin embargo, al igual que ocurre con las mutaciones de PI3KCA una revisión reciente no ha confirmado el papel pronóstico y predictivo de la pérdida de PTEN en términos de SLP y RCp respectivamente (255).

Recientemente, en 429 muestras del estudio NeoAlto se identificó que el 27/29% de las pacientes presentaron pérdida de PTEN (H-SCORE <50%) determinada mediante 2 anticuerpos diferentes CST y DAKO respectivamente(276). En las pacientes con tumores RH- la pérdida de PTEN fue más marcada 33/36% (CST y DAKO respectivamente) comparado con tumores RH+ 20/22%. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de RCp según el estatus de PTEN (32vs33%,P=0.89; 32vs36%; p=0.47, respectivamente).

Sólo un estudio que incluyó 122 pacientes con CM tratados con TTZ demostró el impacto pronóstico negativo de la pérdida de PTEN en términos de SG (277), y de nuevo, otros estudios, fracasaron en demostrar su impacto pronóstico en términos de TTP y SLP (Tabla 12) (235,256,259–261).

Tabla 12. Resultados clínicos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratado con trastuzumab, pertuzumab y lapatinib de acuerdo al estado de PTEN.

Estudio (Año)	Paciente	N	Fármaco	Resultados
---------------	----------	---	---------	------------

	Patología	Pacientes		
Nagata et al (2004)	CMM	47	T	IRS (0-6; RC+RP) PTEN-/PTEN+
	HER2+			(35.7 vs 66.7%; p < 0.05) IRS < 4 (RC+RP) PTEN- /PTEN+ (11.1 vs 65.8%; p < 0.01)
Berns et al (2007)	CMM	55	T	SLP PTEN (alto/bajo): p = 0.127
	HER2+			TTP PTEN (alto/bajo): HR: 1.5; p = 0.3
Faratian et al (2009)	CMM	122	T	Reducción media SG PTEN
	HER2+			(high/low): 21.6 meses (p = 0.0099)
Razis et al (2011)	CMM	139	T	PTEN pérdida
	HER2+			TTP (HR: 0.67; p = 0.062) Superv T (HR: 1.92; p = 0.017) Superv M (HR: 1.69; p = 0.047)
Nisihimura et al (2012)	CMM	33	T	PTEN descenso expresión
	HER2+			17/33(51.5%) Group A (15/33); PTEN descenso expresión: 5/15 Group B (7/33); PTEN descenso expresión: 4/7 Group C (11/33); PTEN descenso expresión: 8/11 (p = 0.13)
Takada et al (2013)	CM HER2+	46	T	RCp (37/46) = 54%
			Neoadyuvante (37/46)	RCp PTEN: ([normal + ganancia + UPD]/pérdida):
			T adyuvante (5/46)	20 vs 0 (p = 0.009) SLP ([normal + ganancia + UPD]/pérdida): NS SLP ([normal + ganancia +

				UPD]/pérdida) RH+: NS SLR ([normal + ganancia + UPD]/pérdida) RH-: NA
Wang et al (2013)	CMLA	154	T	RCp PTEN pérdida (RR = 0.687; p =
	HER2+	1437	Neoadyuvante	0.099)
	CM precoz CMM	266	T Basado en T	SLP PTEN pérdida (HR = 1.096; p = 0.684)
				PTEN pérdida (respuesta/no respuesta; RR = 0.682; p < 0.001)
Schneeweiss et al (2014)	CM HER2+	73	FEC+T+P;D+T+P	RCp PTEN citoplasma/(C+D+P+T)
		75	FEC; D+T+P	(p = 0.0157)
		77	C+D+T+P	
Baselga et al (2014)	CMM	465	P+T+D	SLP: PTEN nuclear (alto/bajo):
	HER2+		T+D	HR: 1.12; p = 0.3622; P interacción: 0.25 SLP: PTEN citoplasma (alto/bajo): HR: 1.17; p = 0.2091; P interacción: 0.15 SG P interacción (PTEN nuclear): 0.61, (PTEN citoplasma): 0.016

C: carboplatino; CM: cáncer de mama; CMLA: cáncer de mama localmente avanzado; CMM: cáncer de mama metastásico; D: docetaxel; EE: enfermedad estable; FEC: Fluorouracilo + epirubicina + ciclofosfamida; Grupo A: respondedores; SLP ≥8 meses; Grupo B: SLP: 3–8 meses; Grupo C: no respondedores; SLP <3 meses o recidiva durante el tratamiento con trastuzumab;HER2+: HER2 positivo; HR: hazard ratio; NA: no aplicable; NS: no significativo; OR: Odds ratio; P: pertuzumab; R: respuesta: RC+RP; RC: respuesta completa; RCp: respuesta completa patológica; RH+/-: receptor hormonal positivo/negativo; RP: respuesta parcial; RR: tasa de respuestas; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; Supervivencia M: supervivencia desde el diagnóstico de la primera metástasis; Supervivencia T: Supervivencia desde el inicio de trastuzumab; T: trastuzumab; TTP tiempo a la progresión; UPD: disomía uniparental. Tabla modificada de Madrid-Paredes et al (264).

1.4.3.4. 4EBP1

Tras la formación de homo/heterodímeros de HER2, la cascada de señalización alcanza a AKT, su activación hace que active otros factores, de ellos uno de los más importantes es mTOR, quien a su vez activará a la proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E (4EBP1) y a la proteína ribosomal quinasa 1 S6 fosforilada (p70S6K1) (278). 4EBP1 juega un papel crítico en el control de la síntesis de proteínas del ribosoma, y por tanto, en la proliferación y supervivencia celular a través de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) (279,280). Definitivamente, la fosforilación de 4EBP1 (p-4EBP1) resulta en la liberación de eIF4E y activación de la síntesis de proteínas celulares.

En tumores de mama, se ha demostrado que 4EBP1 se encuentra sobre-expresado en cerca del 60% de los casos, especialmente en tumores HER2 positivos y Ki67 alto, mayor tamaño tumoral (210,279) y se asocia a una mayor tasa de recidivas locales(210), siendo propuesto como un punto clave en la señalización celular. Del mismo modo se asocia frecuentemente sobre-expresado al mismo tiempo que AKT (279), lo que en conjunto confirmaría su papel esencial en varias vías de señalización actuando como cuello de botella de todas ellas regulando así la convergencia de múltiples señales oncogénicas, regulando la síntesis de proteínas, así como la progresión y proliferación celular.

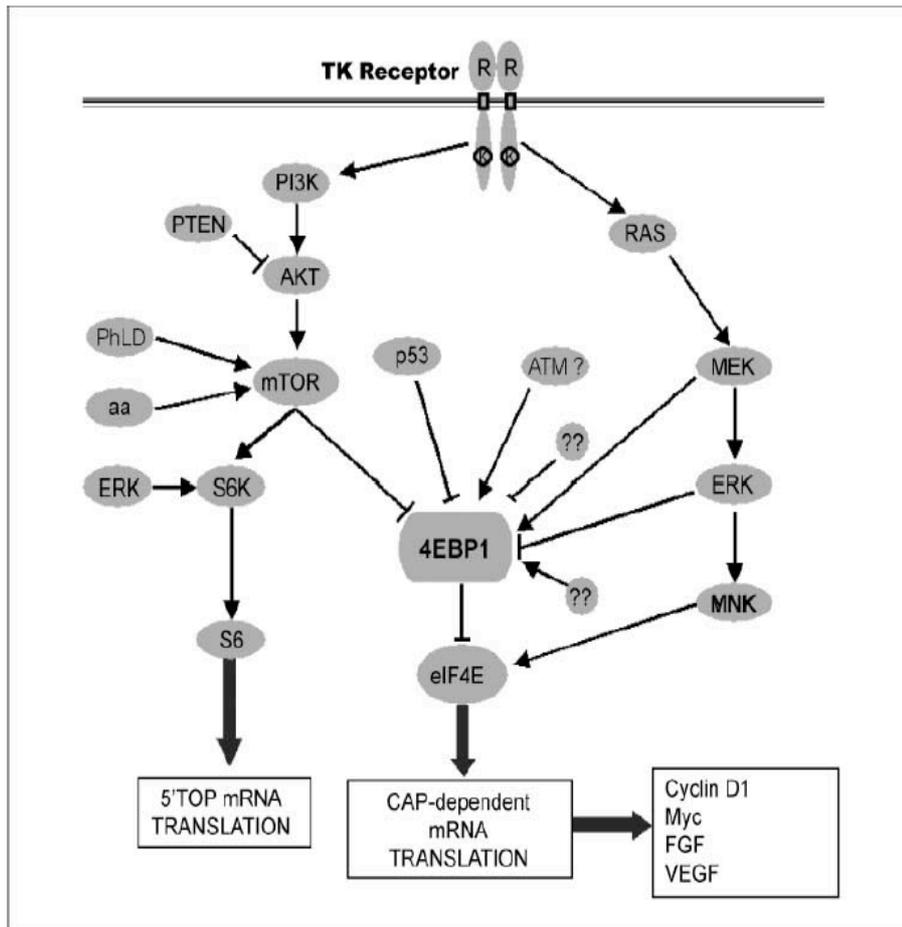


Figura 16. Mecanismo de acción 4EBP1. Adaptado de Rojo F (210).

RTK: receptor tirosina quinasa; MEK: proteína quinasa mitogena-activada /ERK quinasa; mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa; PTEN: fosfatasa y homólogo de la tensina; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; eIF4E: factor de iniciación eucariótico 4E; S6: proteína ribosomal S6; 4EBP1: proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E.

Recientemente la sobre-expresión de p-4EBP1 ha confirmado su papel pronóstico en varones con CM (281). Se determinó la expresión de p-4EBP1 mediante análisis inmuno-histoquímico en 337 muestras. Las pacientes con sobre-expresión

presentaron una menor SLP y SG (log Rank univariante $P=0.001$; HR multivariante 8.8, $P=0.0001$).

La activación de la vía PI3K/AKT y 4EBP1 podrían estar asociada a la respuesta a quimioterapia y radioterapia debido a la activación de señales de supervivencia celular (282), siendo un factor predictivo de respuesta clínica a inhibidores de factores oncogénicos específicos. De hecho, fosfo-4EBP1 se detectó en los tumores de pacientes tratados con inhibidores de EGFR los cuales presentaron inhibición de la proteína EGFR pero no sin obtener respuesta clínica, indicando que 4-EBP1 era activada a través de otras vías de señalización (283).

1.4.4. Infiltrado linfocitario como factor predictivo y pronóstico en CM Her2-positivo

1.4.4.1. Introducción

Es más que conocido el papel que el sistema inmune juega en los pacientes con neoplasias, donde la evasión del mismo constituye un aspecto crítico en el crecimiento y progresión tumoral (284). Sin embargo, la valoración de la respuesta inmune frente al tumor en el paciente individual es más que difícil (285). En algunos tipos de tumores, se han descrito cambios en el fenotipo y función de linfocitos en sangre periférica (286,287), pero, estos cambios no tienen por qué reflejar la misma situación en el microambiente tumoral. Por otro lado, la mayor evidencia actual sugiere que los principales eventos que determinan los resultados de la relación huésped-tumor ocurren en el mismo tumor (285). Históricamente, una serie de parámetros han sido descritos como biomarcadores de la respuesta inmune frente al microambiente tumoral (288–291). La presencia de infiltrado linfocitario tumoral (TIL) ha sido definido como biomarcador de la respuesta inmune antitumoral en gran número de tumores desde carcinoma de ovario (292,293), endometrio (294,295) e incluso CM (296–299).

Tradicionalmente el CM no ha sido considerado como un tumor de tipo inmunogénico, sin embargo, el TIL ha sido correlacionado como un factor predictivo y pronóstico positivo en diferentes cohortes (205,300–302). Además recientemente, se ha demostrado la actividad prometedora de diferentes terapias inmunológicas (como inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada o su ligando (PD1)/(PDL1)) en estudios fase II en diferentes subtipos de CM, especialmente en tumores TN (303).

Es interesante observar que en el CM HER2 positivo, niveles elevados de TIL se asociaron con un incremento en la supervivencia en pacientes que recibieron dosis altas de antraciclinas (298). Esta hipótesis proviene de estudios preclínicos, donde se demostró que la eficacia de algunas terapias anti-neoplásicas están relacionadas con la creación de un microambiente inmune favorable (304,305). Por otro lado, como se ha comentado previamente, la evidencia científica actual sugiere que uno de los mecanismos de acción de TIZ se basa en su capacidad para activar el sistema inmune innato y adaptado (306–309).

Es conocido desde hace décadas que el CM presenta infiltración leucocitaria. Este infiltrado está formado por diferentes poblaciones celulares, incluyendo linfocitos, polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas y mastocitos, todos ellos son responsables de la respuesta inmune innata y adaptada. La composición del TIL en el CM ha sido descrita con gran detalle por Gu-Trantien et al. (310). Los linfocitos T representan el 75% de las células, la proporción de linfocitos B (CD20+) está por debajo del 20%, los monocitos constituyen menos del 10%, mientras que las células natural killer son menos del 5% de todos los leucocitos. De todos ellos el 95% expresa el antígeno de diferenciación CD4+. Hay que destacar también la presencia de linfocitos T reguladores con expresión de FOXP3+, descritos por primera vez por Gobert et al. (311).

El TIL puede ser diferenciado entre linfocitos infiltrantes del estroma tumoral (TIL estromal) y los linfocitos que infiltran las islas celulares tumorales llamados TIL intra-

tumorales (312,313). Ambas determinaciones son válidas, pero, el TIL estromal ha demostrado ser un marcador más estable y reproducible así como más frecuente siendo la opción preferida en la mayoría de los estudios.

En el CM, un incremento en el infiltrado linfocitario, tanto estromal como linfocitario, se ha asociado a la histología ductal, alto grado, ausencia de expresión de receptores hormonales y alta expresión del antígeno de proliferación Ki67 (297–299,314).

La mayoría de métodos empleados en la actualidad para la detección del TIL en las muestras tumorales están basados en técnicas inmuno-histoquímicas. Este proceso emplea muestras fijadas en parafina que incluye tejido tumoral, y en muchos casos se emplean muestras archivadas en estudios retrospectivos. Para la detección de diferentes poblaciones linfocitarias se emplean anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles.

Desde el punto de vista tecnológico y metodológico no representa una técnica compleja, siendo vital la experiencia del patólogo como ocurre en el análisis de expresión de los RH y HER2. A diferencia de éstos, la determinación del TIL no se realiza de forma rutinaria en la práctica clínica habitual, a pesar de la alta evidencia de su papel pronóstico y predictivo.

En el año 2015, el Grupo de trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral desarrolló unas guías para la determinación del TIL con el objetivo de estandarizar la técnica de la mejor forma posible. En el apartado 3.9. se describe con mayor profundidad (315).

Otras técnicas para la determinación de las diferentes poblaciones celulares incluyen las firmas de expresión génicas que han demostrado su capacidad pronóstica en el CM (310,316).

1.4.4.2. Papel del TIL como factor pronóstico y predictivo de RCp

Como se ha remarcado previamente, la administración de tratamientos neoadyuvantes permite no solo la evaluación de la capacidad predictiva de biomarcadores sino que también de cambios dinámicos del biomarcador antes y después del tratamiento. La administración de terapias sistémicas a pacientes con CM, se asocia a cambios en parámetros de laboratorio indicativos de la activación del sistema inmune, incluyendo aumento de la concentración de neopterina (317), o incremento del número de linfocitos T (318).

Uno de los primeros trabajos que mostraron su capacidad predictiva, fue un estudio de cohortes con tamaño muestral limitado. 10 de los 73 pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos alcanzaron RCp. Las pacientes que alcanzaron RCp se caracterizaban por presentar un mayor TIL CD3+ así como de células dendríticas (CD83+) intra-tumorales determinados en la biopsia diagnóstica (312).

Esta potencial capacidad predictiva fue confirmada en una serie con número mayor de pacientes, incluyendo más de 1000 muestras de CM RH positivo/negativo y HER2 negativo/positivo que participaron en los estudios GeparDuo y GeparTrio donde emplearon esquemas de quimioterapia basados en antraciclinas y taxanos. El TIL intra-tumoral demostró en el análisis multivariante ser un factor predictivo independiente de RCp (cohorte inicial: $p = .012$; cohorte de validación: $p = .001$) (205). La tasa de RCp en pacientes con alta infiltración linfocitaria (definida como infiltración linfocitaria intratumoral o estromal $>60\%$) fue del 40% mientras que en aquellos con escaso/nulo infiltrado fue del 7.2%.

Otros trabajos han confirmado su poder predictivo, así en un estudio con 68 pacientes tratadas con esquemas neoadyuvantes basados en antraciclinas y taxanos, Yamaguchi et al. describieron que la densidad alta de TIL estromal (se considera TIL

alto si la densidad del TIL es >1) es un factor predictivo de RCp tanto en el análisis univariante and multivariante (Odds ratio, 4.7; IC 95% 2.2-10.06; $p < .0001$) (319).

Más recientemente se ha confirmado de forma prospectiva la capacidad predictiva del TIL estromal e intra-tumoral en muestras diagnósticas de más de 300 pacientes con CM HER2 negativo tratadas dentro del estudio neoadyuvante GeparQuinto trial (320). Siendo ambos factores predictivos independientes de RCp en el análisis multivariante.

Si revisamos la presencia de TIL según el subtipo histológico, observamos un incremento de los mismos en los CM TN y en algunos trabajos con neoplasias HER2 positivas (316,321). En este sentido, debido a la alta tasa de RCp en tumores TN, muchos estudios han analizado la asociación de TILS y RCp en este subtipo (322,323). Ono et al. observó una asociación estadística significativa entre la RCp y el TIL score en el subgrupo de tumores TN (323).

Uno de lo estudios con mayor número de pacientes fue el análisis realizado en más de 2000 pacientes incluidas en el ensayo clínico BIG 02-08. Este estudio demostró que aquellos tumores con mayor TIL intra-tumoral y estromal se asociaba a un incremento en la SLE y SG en pacientes con tumores RE negativo, HER2 negativo (298).

En cuanto a la población HER2 positiva, existe menor evidencia del papel pronóstico y predictivo del TIL respecto a los tumores TN. Tres estudios neoadyuvantes son los que hemos de destacar al hablar del papel predictivo de RCp del TIL. En primer lugar, en el estudio NeoALTTO, de las 455 pacientes que participaron en el estudio, se disponía de muestras de tejido en 387 (85.1%). El nivel medio de TIL fue de 12.5% (5.0%-30.0%), con niveles menores en los tumores RH positivos (10.0% (5.0%-22.5%)) vs RH negativos (12.5% (3.0%-35.0%)) ($p=0.02$). En cuanto a la RCp, TIL mayores de 5% se asociaron a mayores tasas de RCp independientemente del grupo de tratamiento (OR ajustada= 2.60, IC 95% CI, 1.26-5.39; $p=0.01$) siendo estas diferencias menos

marcadas en el grupo que recibió doble bloqueo con TTZ+L como indica la figura 17. En cuanto a los datos de supervivencia, tras una mediana de seguimiento de 3.77 años, cada incremento del 1% en el TIL se asoció con una disminución del 3% en la tasa de eventos (HR ajustado=0.97, IC 95%, 0.95-0.99; p=0.002) en todos los subgrupos.

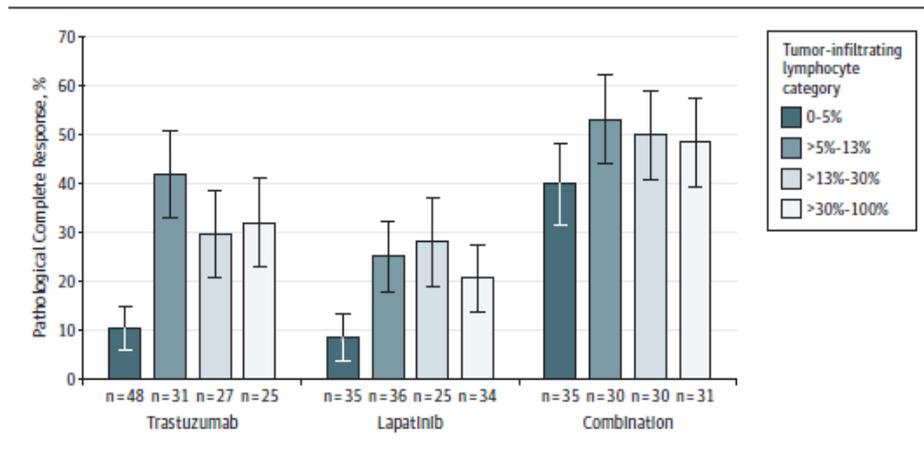


Figura 17. Tasa de respuestas completas patológicas según la categoría de TIL. Adaptado de Salgado R (315).

El segundo trabajo hace referencia al estudio Neosphere con TTZ y PTZ. En 243 pacientes se realizó la determinación del TIL intratumoral y estromal. 14% de las pacientes presentaron TIL bajo (<5% TIL intratumoral y estromal) y 17% TIL alto (≥50% TIL intratumoral y estromal). Pacientes con TIL bajo presentaron tasas de RCp menores respecto a las pacientes con TIL intermedio y TIL alto (tasa de RCp: 4.3%, 26.9%, 26.7%, p=0.018, respectivamente). De nuevo, las pacientes que recibieron doble bloqueo las diferencias fueron menos marcadas, generando la hipótesis de la capacidad del doble bloqueo para revertir este posible mecanismo de resistencia.

Por último, en el año 2016 ha sido publicado una revisión del papel del TIL en 498 pacientes con CM HER2 positivo que fueron tratadas en los estudios GeparQuattro y GeparQuinto (324). Los niveles del TIL fueron determinados de dos formas: como una variable continua (incremento de 10%) y como TIL alto ($TIL \geq 60\%$ TIL), y correlacionando ambas con la tasa de RCp y la SLE. Ambas determinaciones se asociaron a incrementos en la tasa de RCp tanto en el análisis univariante (10% TIL: OR 1.12, P = 0.002; TIL alto: OR 2.02, p=0.002) como en el multivariante (10% TIL: OR 1.1, P = 0.014; TIL alto: OR 1.87, p=0.009). Las pacientes con RCp/TIL alto presentaron mejor pronóstico que aquellas con No RCp/TIL bajo.

Si revisamos su papel pronóstico en estudios de TTZ adyuvante, hemos de destacar el análisis realizado por la Dra. Pérez en el estudio N9831 (325). Se consideró TIL alto en aquellos tumores con $TIL \geq 60\%$. Tras una mediana de seguimiento de 4.4 años, en el grupo de pacientes tratadas con quimioterapia y TTZ adyuvante (n=456), la SLR estimada a 10 años fue del 80% vs 80.1% en pacientes con TIL alto y bajo respectivamente.

Por otro lado, un estudio retrospectivo fue llevado a cabo por el grupo de la Dra. Loi utilizando las muestras del ensayo clínico fase III adyuvante FinHER, que incluyó 1010 pacientes con CM operable, de los cuales 778 eran HER2 negativo. Aquellas con CM HER2 positivo (n=232) fueron randomizadas a quimioterapia +/- TTZ. Dos patólogos independientes cuantificaron el TIL estromal en 935 muestras disponibles. Para los objetivos principales del estudio: supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED) e interacciones con TTZ se confirmó, que por cada incremento de un 10% en el TIL se asoció de forma significativa a una reducción en el riesgo de recidiva a distancia en el grupo de tumores TN (n=134) (0.77; IC 95%, p=0.02); del mismo modo, en el grupo HER2 positivo (n=209) cada incremento del 10% en el TIL se asoció con una reducción del riesgo de recidiva a distancia en los pacientes tratados con TTZ (SLED P interacción=0.025) (321).

Junto con la determinación inmuno-histoquímica del TIL, las firmas de expresión génica basadas en genes inmuno-relacionados pueden predecir la tasa de RCp en pacientes con CM HER2 positivo tratadas con TTZ y TTZ+L (143,326). En 121 pacientes incluidas en el estudio CHER-LOB, se describió que el TIL y distintos genes inmuno-relacionados se asociaban a mayores tasas de RCp en el análisis univariante, sin embargo, la asociación se mantenía para los genes inmuno-relacionados en el multivariante (326).

Referente a las poblaciones linfocitarias analizadas, no solo se revisan la población de linfocitos CD3+, existen estudios que ha demostrado el papel predictivo de otras subpoblaciones como son los linfocitos con expresión de CD8 y aquellos T reguladores FOXP3+ (314,327).

El marco neoadyuvante, nos ofrece una oportunidad única de disponer de muestras tumorales pre y post el tratamiento sistémico con el objetivo de estudiar cambios en el infiltrado linfocitario relacionado con la terapia recibida. Desafortunadamente, el principal inconveniente es que no puede ser realizado en la población donde probablemente el análisis de estos cambios pudiera tener mayor relevancia, como son las pacientes que alcanzan la RCp. Llama la atención que en la muestra de tejido residual tras el tratamiento sistémico neoadyuvante, al ser comparada con aquellas de pacientes que no recibieron tratamiento previo presentan un mayor infiltrado leucocitario de la serie mieloide, destacando neutrófilos y mastocitos (328). La población de TIL en pacientes tras la QNA se caracteriza por la presencia de un fenotipo inmune activo, con una ratio CD8+/CD4+ elevada o bien la expresión de grancima B. Otros cambios también descritos tras la neoadyuvancia han sido: incrementos en el número de linfocitos CD3+ intra-tumorales y estromales, CD56+ y células dendríticas acompañado de un descenso del factor de crecimiento vascular endotelial y menor número de monocitos CD68+ (312).

Se ha descrito recientemente una asociación entre un incremento de TIL y respuestas objetivas tras el tratamiento con paclitaxel neoadyuvante (329). En el mismo sentido, el grupo del Dr. Ladoire examinaron diferentes poblaciones de TIL: CD3+, CD8+ y FOXP3+ TIL antes y después del tratamiento neoadyuvante en 56 pacientes (330). La RCp se asoció con la desaparición de linfocitos T reguladores FOXP3+ TIL, mientras que la infiltración de la pieza quirúrgica por subpoblaciones CD3+ y CD8+ se mantuvo estable. En posteriores investigaciones se amplió esta observación para analizar su capacidad pronóstica (331). Niveles elevados de CD8+ y descensos de FOXP3+ tras la quimioterapia adyuvante se asociaron de forma significativa a incrementos en supervivencia. En el análisis multivariante se mantuvo la ratio CD8+/FOXP3+ y el estadio patológico como factores pronósticos independientes. De este modo se propuso un score incorporando el estadio patológico y la ratio CD8+/FOXP3+ donde pacientes con enfermedad residual limitada y ratio CD8+/FOXP3+ alta presentaban SLR y SG cercanas al 100%.

Respecto a los cambios en linfocitos FOXP3+ estromales y su asociación con la RCp, se han publicado varios trabajos. La desaparición de linfocitos FOXP3+ se asoció a una mayor tasa de RCp en el estudio publicado por Liu et al. (332) mientras que la persistencia de FOXP3+ intra-tumoral se asoció a peor pronóstico. El grupo de Aruga et al analizó los cambios en linfocitos FOXP3+ (333). Tras comparar el número de linfocitos FOXP3+ previo y tras la quimioterapia neoadyuvante, se observó que las pacientes con menores cifras, previa y tras la QNA, presentaban de forma significativa un mejor pronóstico a largo plazo.

Con todo ello, referente al TIL como factor predictivo y pronóstico, hemos de destacar la importancia de la estandarización de la técnica inmuno-histoquímica con el desarrollo de guías de consenso; en segundo lugar el TIL ha demostrado su capacidad predictiva de RCp y pronóstica, en especial el TIL estromal y sobretodo en tumores TN; por último existe escasa evidencia del papel predictivo y pronóstico del TIL en CM HER2 positivo, donde se ha observado su capacidad predictiva al tratamiento con TTZ.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

- El tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama, definido como la administración de tratamiento sistémico previo a la cirugía, ofrece diferentes ventajas, entre ellas estudiar marcadores subrogados que puedan predecir respuesta clínica y supervivencia a largo plazo (95,167,175,179).
- La respuesta completa patológica (RCp) definida como la ausencia de tumor infiltrante en la mama y axila en la pieza quirúrgica tras el tratamiento neoadyuvante se asocia a mayor supervivencia libre de enfermedad y global cuando se compara con aquellas pacientes que no alcanzan la misma(157,167).
- El subgrupo de tumores HER2 positivo presenta altas tasas de RCp que oscilan entre el 30-60%(119,128,130).
- En el subgrupo de tumores HER2 positivo el tratamiento de elección es la combinación de quimioterapia con terapias anti-HER2 (TTZ) ya que duplica la tasa de RCp frente a quimioterapia sola(128,130).
- No existe un esquema de quimioterapia estándar, aunque los esquemas con antraciclinas y taxanos son los que ofrecen las mayores tasas de RCp (128,133,136,140,334).
- A pesar de ello, no disponemos de factores predictivos de RCp que permitan identificar qué subgrupo se beneficiará del tratamiento y por otro lado qué tumores serán resistentes. En la actualidad, únicamente se ha descrito que aquellas neoplasias con receptores hormonales (RH) negativos se asociarán a una mayor tasa de RCp (202).
- Han sido descritos diferentes mecanismos de resistencia a las terapias HER2. Destaca entre todas ellas la vía de señalización PI3K/AKT. El análisis de algunos de los elementos implicados en esta vía podría identificar marcadores de sensibilidad/resistencia al tratamiento neoadyuvante así como pronósticos (201,206–210,212,229,233,265).

- Más recientemente, se ha descrito el papel predictivo y pronóstico del infiltrado linfocitario estromal. En este sentido, su papel ha sido estudiado principalmente en tumores triple negativos, existiendo pocos datos en la enfermedad HER2 positiva (313).
- Por tanto, la hipótesis de trabajo será que el estudio de diferentes de factores moleculares determinados en la biopsia diagnóstica pueden predecir respuesta o resistencia al tratamiento quimioterápico neoadyuvante basado en antraciclinas, taxanos y TTZ, en términos de RCp.
- Por otro lado, estos factores moleculares analizados en la biopsia diagnóstica y en la enfermedad residual de aquellas pacientes que no alcancen la RCp pueden predecir el pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

2.2. Objetivo Principal

- Evaluar la capacidad predictiva de los niveles de expresión inmunohistoquímicos de PTEN, p-AKT, p-4EBP1 e infiltrado linfocitario estromal, así como el análisis de mutaciones de PI3KCA en términos de RCp determinados en la biopsia diagnóstica de tumores HER2 positivo tratados con quimioterapia neoadyuvante basada antraciclinas, taxanos y agentes antiHER2.

2.3. Objetivos Secundarios

- Determinar la capacidad predictiva de la expresión IHQ de RH determinados en la biopsia diagnóstica en términos de RCp.
- Determinar la capacidad predictiva de otras variables clínicas y patológicas recogidas en el análisis en términos de RCp y su comparación con los factores moleculares a estudio.

- Describir los niveles de expresión inmuno-histoquímicos de RH, PTEN, p-AKT, p-4EBP1 e infiltrado linfocitario estromal en la enfermedad residual de la pieza quirúrgica.
- Comparar la expresión de estos marcadores entre la enfermedad residual de la pieza quirúrgica y su grado de concordancia con la biopsia diagnóstica.
- Comparar la expresión de estos marcadores en dos poblaciones diferentes: RH negativos / RH positivos en la biopsia diagnóstica.
- Cuantificar la amplificación del gen HER2 mediante la técnica de FISH en el tumor primario y la enfermedad residual y analizar las diferencias.
- Determinar el valor pronóstico de los niveles de expresión inmuno-histoquímicos de PTEN, p-AKT, p-4EBP1 e infiltrado linfocitario estromal, así como el análisis de mutaciones de PI3KCA determinados en la biopsia diagnóstica en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.
- Determinar el valor pronóstico de los niveles de expresión inmuno-histoquímicos de PTEN, p-AKT, p-4EBP1 e infiltrado linfocitario estromal determinados en la enfermedad residual en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.
- Determinar el valor pronóstico de la expresión de RH en la biopsia diagnóstica en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.
- Determinar el valor pronóstico de la amplificación del gen HER2 mediante la técnica de FISH en la enfermedad residual en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.
- Determinar el valor pronóstico de otras variables clínicas y patológicas recogidas en el análisis en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global y su comparación con los factores moleculares a estudio.

3. Diseño y Metodología

3.1. Diseño

- Análisis descriptivo de factores moleculares predictivos de respuesta completa patológica en muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratados con antraciclinas, taxanos y agentes anti-HER2 como esquema de quimioterapia neoadyuvante.
- El análisis inmuno-histoquímico y de mutaciones se practicará tanto en la biopsia diagnóstica como en la enfermedad residual en aquellos tumores que no alcancen la RCp.
- El siguiente estudio ha sido desarrollado siguiendo las guías de marcadores pronósticos REMARK (Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) (335).

3.2. Pacientes

- Pacientes con diagnóstico entre los años 2007-2013 de CM HER2 positivo estadio clínico II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, taxanos y terapia anti-HER2, operadas y de las que dispongamos material parafinado del diagnóstico primario, hemos identificado 86 pacientes candidatas (figura 18).

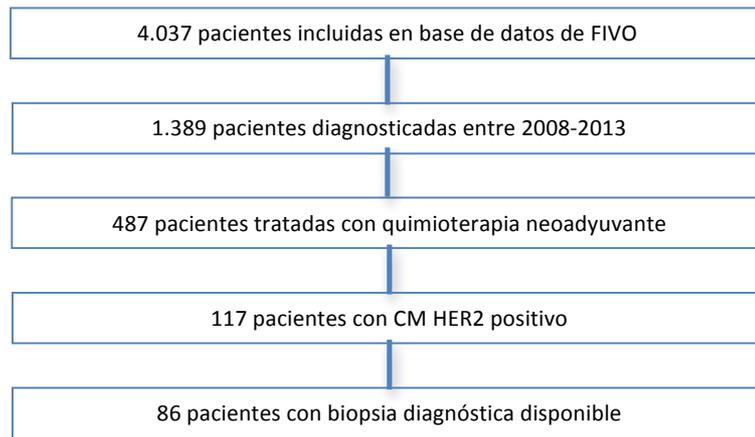


Figura 18. Diagrama de selección de pacientes.

- El estudio diagnóstico de las pacientes ha sido homogéneo e incluye la exploración física y radiológica de la mama, axila y el estudio de extensión (radiografía de tórax, ecografía hepática y gammagrafía ósea) con el objetivo de descartar enfermedad metastásica a distancia.

3.3. Criterios de Inclusión

Las pacientes serán elegibles solo si cumplen todos los criterios de inclusión siguientes:

1. Consentimiento informado por escrito para la realización de todos los procedimientos del estudio en base a la normativa local, antes de iniciar los procedimientos específicos del protocolo.
2. Disponer de material parafinado procedente de la biopsia diagnóstica.
3. Carcinoma de mama invasivo estadio clínico II-III sometido a tratamiento quimioterápico neoadyuvante basado en antraciclinas, taxanos y agentes anti HER2. y posterior cirugía primaria definitiva.
4. Cáncer de mama invasivo HER2 positivo definido como: inmuno-histoquímica 3+ en > 10% de las células inmuno-reactivas o bien amplificación del gen

HER2 por hibridación in situ (FISH, CISH), definida como proporción de señales de gen HER2 del centrómero 17 \geq 2.2.

5. Cáncer de mama invasivo con determinación mediante técnicas inmunohistoquímicas de la expresión de receptores hormonales.

3.4. Criterios de exclusión

Las pacientes no serán elegibles si cumplen cualquiera de los criterios de exclusión siguientes:

1. Carecer de material parafinado para análisis.
2. Evidencia clínica o radiológica de metástasis en el momento del diagnóstico.
3. Pacientes con otras neoplasias concurrentes que no sean cáncer de piel no melanoma, melanoma in situ o cáncer cérvico-uterino in situ adecuadamente tratados. Las pacientes con otros cánceres no mamarios deben haber estado libres de enfermedad durante al menos 5 años.

3.5. Período de estudio

Pacientes con cáncer de mama y sobre-expresión de HER2 diagnosticadas en la Fundación IVO entre 2007 y 2013.

3.6. Pautas clínicas/quirúrgicas

El tratamiento quimioterápico neoadyuvante se administrará como práctica clínica habitual durante un total de seis a ocho ciclos o hasta cirugía definitiva, primer signo de progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable. Un ciclo de tratamiento se establece en un periodo de 21 días.

Dos esquemas quimioterápicos neoadyuvantes han sido empleados:

-MTH: Doxorubicina liposómica no pegilada 50 mg/m² día 1 cada 3 semanas + Paclitaxel semanal 80 mg/m² + Trastuzumab semanal 2 mg/kg (con dosis de carga 4 mg/kg el día 1) día 1, 8, 15 x 6 ciclos completando un total de 18 semanas.

-AC x 4 seguido de Paclitaxel + Trastuzumab semanal x 12 semanas: Doxorubicina convencional 60 mg/m², Ciclofosfamida 600 mg/m² día 1 cada 3 semanas x 4 ciclos seguido de Paclitaxel semanal 80 mg/m² + Trastuzumab semanal 2 mg/kg (con dosis de carga 4 mg/kg el día 1) durante 12 semanas.

Se evalúa la respuesta clínica siguiendo los criterios RECIST 1.1. Dicha evaluación de respuesta se realiza durante y tras finalizar la QNA mediante exploración física y radiológica (mamografía, ecografía, resonancia magnética de mama)(336).

La cirugía se realizará en base a la práctica local habitual durante las 4-6 semanas siguientes a la finalización de la QNA mediante exéresis del tumor primario (tumorectomía + límites o mastectomía) y muestreo ganglionar axilar de I-III nivel / exéresis del ganglio centinela en los casos indicados según guías clínicas.

Tras la cirugía los pacientes reciben tratamiento sistémico y radioterápico adyuvante según guías clínicas locales.

3.7. Recogida de Datos

Para la recogida de datos se ha diseñado una tabla Excel que ha incluido información de cada una de las pacientes candidatas.

De la historia clínica se obtendrán diferentes variables clínicas como son:

- Año del diagnóstico.
- Edad de la paciente al diagnóstico.
- Estadio clínico de la enfermedad: cTNM

- Grado histológico: grado 1-3.
- Estatus de RH en la biopsia diagnóstica: positivo / negativo. Se considera RH positivo a aquellas pacientes con expresión de RE y/o RP mayor o igual del 1% (337).
- Estatus de HER2 en la biopsia diagnóstica: mediante inmuno-histoquímica y FISH.
- Estatus de Ki67 en la biopsia diagnóstica: ≤ 13 y > 13
- Tipo de quimioterapia neoadyuvante: MTH o AC seguido de Paclitaxel y TTZ.
- Administración completa del tratamiento QNA: sí o no.
- Máxima respuesta clínica obtenida durante y al finalizar el tratamiento neoadyuvante.
- Tipo de cirugía practicada: cirugía conservadora o mastectomía.
- Estadío patológico de la enfermedad tras la cirugía.
- Tratamiento adyuvante recibido: radioterapia, TTZ y hormonoterapia.
- Fecha del último control y estado en el último control.
- Recidiva de la enfermedad: sí / no.
- Fecha de la recidiva.

Tras la determinación de los marcadores inmuno-histoquímicos, TIL y mutaciones de PI3KCA por los servicios de Anatomía Patológica y Biología Molecular de nuestro centro se han recogido los datos generados.

En cuanto a la recaída, se incluyen recidivas por carcinoma infiltrante o no infiltrante, locales, loco-regionales y metastásicas.

Se define la supervivencia libre de progresión como el intervalo de tiempo transcurrido desde el diagnóstico y el momento de la recaída.

Se define la supervivencia global el intervalo de tiempo transcurrido desde el diagnóstico y el momento del último control.

3.8. Determinaciones inmuno-histoquímicas a realizar

Estudio sobre material parafinado de los marcadores propuestos mediante las técnicas habituales de diagnóstico disponibles en el Servicio de Anatomía Patológica.

Para todos ellos se procederá a la determinación semi-cuantitativa del porcentaje de células teñidas (0-100%), localización de la tinción (nuclear, citoplásmica o ambas) así como de la intensidad de la misma (0=negativo, 1=débil, 2=moderado, 3= fuerte). Posteriormente se calculará el H-score multiplicando el porcentaje de células teñidas (0-100%) por la correspondiente intensidad de tinción (0-3) siendo la máxima puntuación 300 (0-300). Se considerará como positivo un H-score>50.

El estudio para los marcadores seleccionados del tumor pre-tratamiento se realizará en el tejido obtenido mediante biopsia con aguja gruesa practicada al diagnóstico.

Por otro lado, en aquellos casos en los que reste enfermedad tumoral residual infiltrante tras la cirugía se completará el mismo proceso de análisis inmuno-histoquímico y el análisis del infiltrado linfocitario.

Se detallan los anticuerpos empleados para la determinación inmuno-histoquímica:

PTEN:

Niveles de expresión de PTEN mediante IHQ en tejido parafinado empleando el anticuerpo Anti Human PTEN (Clon 6h2.1).

p-AKT:

Niveles de expresión de p-AKT mediante IHQ en tejido parafinado empleando el anticuerpo Phospho – Akt (Ser473) (587F11).

p-4EBP1:

Niveles de expresión de p-4EBP1 mediante IHQ en tejido parafinado empleando el anticuerpo Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4).

Para todos ellos se procederá a la determinación semi-cuantitativa del porcentaje de células teñidas (0-100%), localización de la tinción (nuclear, citoplásmica o ambas) así como de la intensidad de la misma (0=negativo, 1=débil, 2=moderado, 3=fuerte)(208).

Para el cálculo de PTEN emplearemos el score inmuno-reactivo (IRS): porcentaje de células (0=0; 1=1-11%, 2=12-50%; 3=51-80%; 4>80%) x intensidad (0=negativo, 1=débil, 2=moderado, 3= fuerte). Se considerará pérdida de PTEN negativo si IRS-score es ≤ 3 (271).

Para PTEN posteriormente se calculará el H-score multiplicando el porcentaje de células teñidas (0-100%) por la correspondiente intensidad de tinción (0-3) siendo la máxima puntuación 300 (0-300). Se considerará como pérdida de PTEN si H-score ≤ 40 (338).

En el caso de p-AKT y p-4EBP1, posteriormente se calculará el H-score multiplicando el porcentaje de células teñidas (0-100%) por la correspondiente intensidad de tinción (0-3) siendo la máxima puntuación 300 (0-300). Se considerará como positivo un H-score > 50 (210,271).

3.9. Estudio del infiltrado linfocitario tumoral

Seleccionamos las pacientes con muestra histológica suficiente tumoral pre y post-tratamiento.

La evaluación y cuantificación de la infiltración linfocitaria se realizará según las recomendaciones del Grupo de trabajo Internacional en Infiltrado linfocitario tumoral (315).

Para ello se selecciona de la muestra parafinada teñida con hematoxilina eosina el área tumoral. Se define el área estromal identificándose en el borde invasivo tumoral la población global de linfocitos infiltrantes (no se procede al análisis de subpoblaciones linfocitarias) siempre sin incluir en la evaluación los granulocitos presentes en las áreas necróticas. Para la cuantificación del TIL estromal se empleará como denominador el área de tejido estromal, no el número total de células estromales.

El TIL debe ser expresado como parámetro continuo. El porcentaje estromal de TIL es un parámetro semi-cuantitativo de esta valoración, es decir, un TIL del 80% significa que el 80% del área estromal muestra un denso infiltrado mononuclear.

En caso de que el resultado sea cuestionable debe ser evaluado por un segundo patólogo. En aquellos casos con tumores heterogéneos deben ser evaluadas distintas regiones y realizar un promedio (Figura 19).

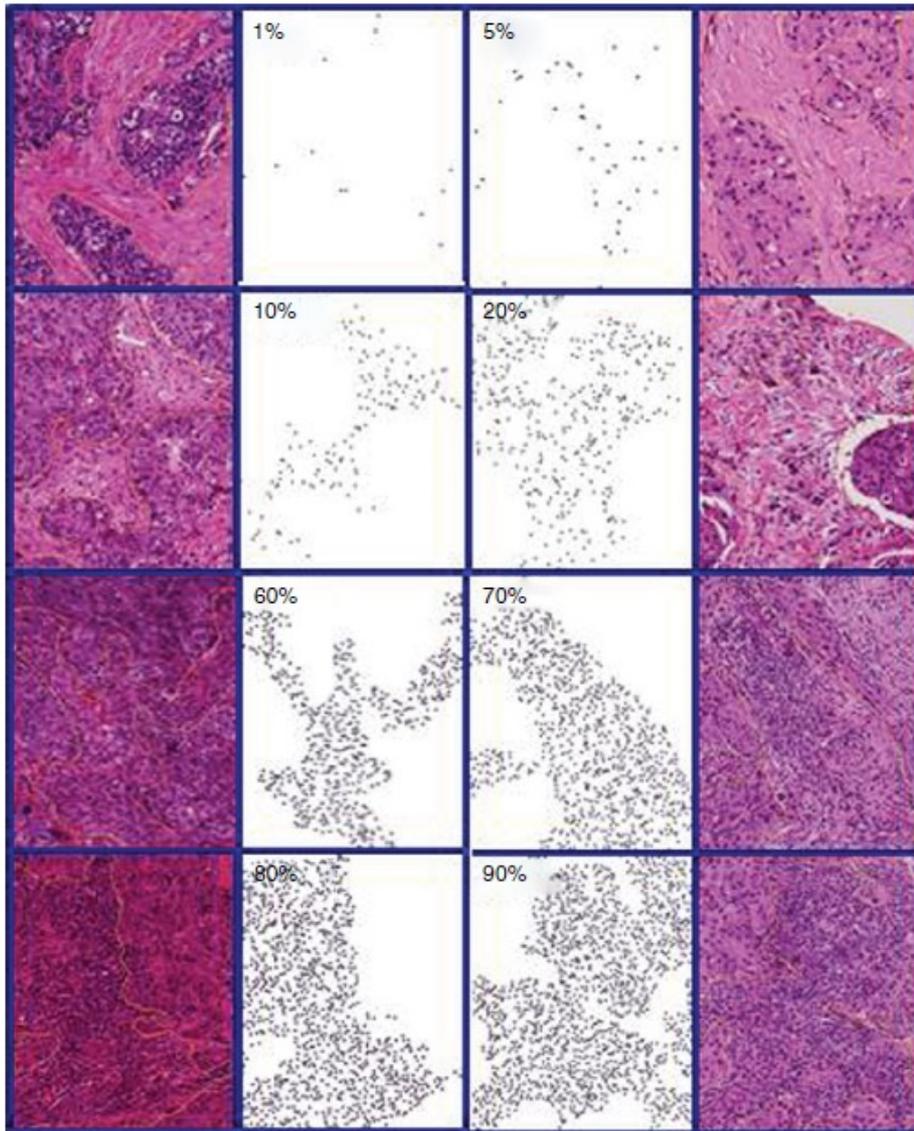


Figura 19. Estandarización y guías para la evaluación de TIL. Adaptada de Salgado R.(315)

Como se muestra en la figura 19, el TIL estromal debe ser comunicado como porcentaje (las imágenes son utilizadas como guía práctica). Se muestran imágenes representativas de diferentes % de TIL estromal . El área estromal está marcada en cada imagen.

Se considerará TIL enriquecido si el infiltrado linfocitario es >10% (315).

3.10. Estudio de mutaciones de PI3KCA

Estudio sobre material parafinado de las mutaciones de PI3KCA mediante las técnicas habituales de diagnóstico disponibles en el Servicio de Biología Molecular de nuestro centro mediante el sistema Cobas® PIK3CA Mutation Test.

La prueba de mutación Cobas® PIK3CA es una prueba de PCR en tiempo real para la detección cualitativa e identificación de mutaciones en los exones 1, 4, 7, 9 y 20 del gen de la subunidad alfa de la isoforma fosfatidilinositol-3-cinasa alfa (PI3KCA) a partir de ADN obtenido de material fijado y embebido en parafina. Esta técnica se caracteriza por:

- Ser más sensible y específica en la detección de mutaciones PIK3CA que la secuenciación convencional Sanger.
- Se pueden obtener resultados de la prueba PIK3CA a partir de una sola sección material incluido en parafina con un grosor de 5 µm y con hasta un 10% de contenido en células tumorales.
- Poderse realizar en <8 horas.
- Poderse detectar con fiabilidad las mutaciones PIK3CA en los exones 9 y 20 con un nivel de mutación ≥ 5%.

3.11. Variables

- Variables cuantitativas: edad al diagnóstico del CM, Ki67, TIL.
- Variables cualitativas: estadio clínico de la enfermedad, grado histológico, status de receptores hormonales y HER2 en la biopsia inicial, Ki67, tipo de quimioterapia y número de ciclos administrados, respuesta clínica obtenida, tipo de cirugía practicada, estadio patológico de la enfermedad tras la cirugía,

H-score de PTEN, p-AKT, p-4EBP1, TIL enriquecido, mutación de PI3KCA en biopsia diagnóstica y enfermedad residual, FISH en enfermedad residual, quimioterapia adyuvante, hormonoterapia o radioterapia adyuvante.

3.12. Método estadístico

El análisis estadístico de esta tesis doctoral se ha realizado mediante el programa estadístico SPSS 22.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). En todos los contrastes se han considerado pruebas bilaterales y un nivel de significación del 5%.

En todos los análisis se ha llevado a cabo en primer lugar un análisis descriptivo de las variables de interés en el estudio, utilizando para ello tanto herramientas gráficas como analíticas.

Se han empleado tablas resumen para referenciar frecuencias absolutas y relativas para el análisis descriptivo de las variables categóricas. La media, mediana, rango e intervalos de confianza han sido aplicados para la descripción de las variables continuas. La asociación estadística entre variables categóricas ha sido realizada mediante el método de Chi-cuadrado. Así, se ha utilizado este método para evaluar la asociación entre la RCp y las diferentes variables categóricas estudiadas, tanto clínicas como moleculares. El estudio estadístico de asociación entre variables continuas con variables dicotómicas ha sido mediante la determinación de la de t de Student. También se ha valorado la posible existencia de correlación entre variable continuas. Una vez realizado el análisis univariante y determinado las posibles variables que pueden tener relación con la RCp, variable principal del estudio, se ha realizado un análisis multivariante de regresión múltiple para valorar aquellas variables que presenten una mayor peso independiente en relación con la RCp, que es el objetivo principal del estudio.

En la estrategia de construcción de modelos multivariantes se han considerado todas las pacientes en el análisis, estudiando que factores influían significativamente con la

presencia de cada uno de los eventos de interés. A continuación se ha construido un modelo multivariante forzando la entrada en el modelo de la presencia o no de RCp, y utilizando un esquema secuencial para la entrada del resto de factores. Finalmente se ha obtenido un modelo multivariante donde se tiene una estimación del efecto de la mutación controlado por el conjunto de variables que influyen sobre la supervivencia al evento de interés.

Para el análisis de la supervivencia global, se ha estimado la supervivencia (junto con un intervalo de confianza al 95%) para diferentes horizontes temporales de interés dentro del periodo de seguimiento a partir de las curvas de supervivencia actuariales estimadas mediante el método de Kaplan-Meier. Para toda la población se han ajustado en primer lugar modelos de regresión de Cox univariantes para cada una de las características asociadas al cáncer de mama diagnosticado con el fin de determinar que variables estaban relacionadas significativamente con la supervivencia global. Para cada modelo se ofrece la estimación de la tasa de riesgos instantáneos (HR), un intervalo de confianza al 95% para dicha estimación y el p-valor asociado a su significatividad. A partir de aquellas variables significativas desde el punto de vista univariante para un nivel de significación del 10%, se ha construido un modelo multivariante de Cox utilizando una estrategia condicional hacía atrás con probabilidad de entrada y salida del 5%. En todos los contrastes se ha analizado la idoneidad de la hipótesis de riesgos proporcionales utilizando tanto pruebas gráficas como analíticas.

Del mismo modo se ha llevado a cabo un análisis de la supervivencia libre de progresión. Se ha considerado como censura el fallecimiento del paciente sin experimentar estos eventos. Se ha llevado a cabo el mismo procedimiento empleado en el análisis de la supervivencia global.

3.13. Aspectos éticos

El presente estudio no genera ningún riesgo para el paciente, ya que su diseño es observacional, retrospectivo y no existe ninguna intervención terapéutica. Se realiza un estudio diagnóstico de las muestras tumorales empleando biomarcadores que se aplican habitualmente y de ningún modo supone intervención sobre el paciente ni modificación de la actitud terapéutica. El estudio se llevará a cabo siguiendo los requerimientos expresados en la legislación vigente (LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica).

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité ético de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

4. Resultados y Desarrollo Argumental

4.1. Análisis de la población del estudio

4.1.1. Descripción de las principales características de la muestra analizada

En primer lugar, vamos a describir las principales características y evolución de las pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico neoadyuvante basado en antraciclinas, taxanos y TTZ y posteriormente fueron sometidas a cirugía. En concreto se seleccionaron 86 pacientes, todas ellas diagnosticadas y tratadas en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

La tabla 13 ofrece un resumen de las características clínicas recogidas del global de la muestra.

Tabla 13. Características basales de las pacientes incluidas en el estudio.

Característica principal	Total
	86 (100%)
Edad	
Edad Media	49.68
Edad Mediana	47.34
cT	
cT1-cT2	35 (40.7%)
cT3-cT4	51 (59.3%)
cN	
cN0	12 (14.0%)
cN1-2	74 (86.0%)
Estadio Clínico	
Estadio II	36 (41.9%)
Estadio III	50 (58.1%)
Histología	
Ductal	80 (93%)
Lobulillar	4 (4.7%)

Otros	2 (2.3%)
Grado Histológico	
Grado 1	2 (2.3%)
Grado 2	37 (43.0%)
Grado 3	40 (46.5%)
Desconocido	7 (8.1%)
Ki67	
Ki67≤13	2 (2.3%)
Ki67>13	54 (62.8%)
Desconocido	30 (34.9%)
Receptor Estrogénico	
Positivo	43 (50%)
Negativo	43 (50%)
Receptor Progesterona	
Positivo	32 (37.2%)
Negativo	54 (62.8%)
HER2	
Positivo por IMH (+++)	77 (89.5%)
Positivo por FISH (amplificado)	33 (38.4%)
Subtipo histológico	
RH+/HER2+	43 (50%)
RH-/HER2+	43 (50%)
Esquema de quimioterapia	
MTH	74 (86%)
AC seguido de TH	12 (14%)
Intensidad de dosis neoadyuvancia	
Completa el tratamiento previsto	71 (82.6%)
No completa el tratamiento	15 (17.4%)
Tipo de cirugía	
Conservadora	41 (47.7%)
Mastectomía	45 (52.3%)
Radioterapia adyuvante	
Sí	84 (97.7%)
No	2 (2.3%)

Hormonoterapia adyuvante

Sí	45 (53.6%)
No	41 (46.4%)

Trastuzumab adyuvante

Sí	82 (95.3%)
No	4 (4.7%)

A: doxorubicina convencional; C: ciclofosfamida; H: trastuzumab; IMH: inmuno-histoquimia; RH: receptores hormonales. T: paclitaxel.

4.1.1.1. Descripción del año del diagnóstico del CM

La figura 20 muestra la distribución de pacientes según el año en que tuvo lugar el diagnóstico histológico del CM. Las pacientes incluidas con diagnóstico más antiguo datan de 2007 (10 pacientes (11.6%)) y el más reciente de 2013 (10 pacientes). Únicamente 6 pacientes (7%) fueron diagnosticadas en 2012 mientras que 22 pacientes (25.6%) se diagnosticaron en 2009. El grupo más numeroso con 53 pacientes (61.6%) fueron las diagnosticadas entre 2009 y 2011.

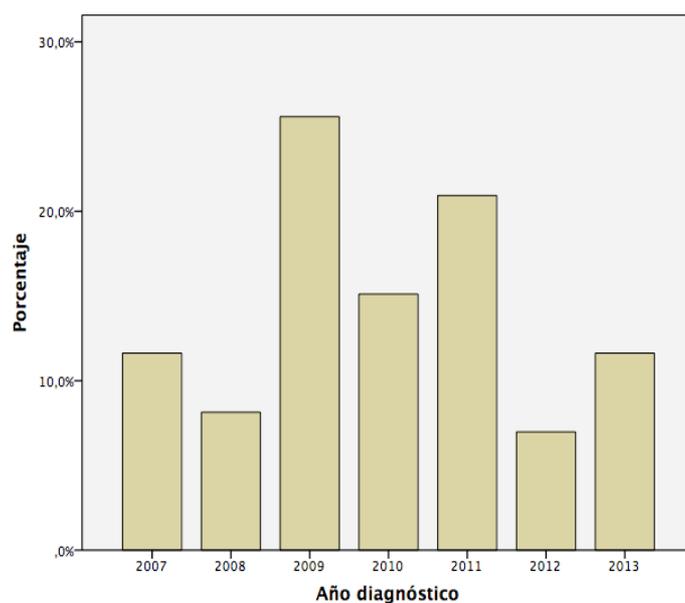


Figura 20. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el año de diagnóstico del CM.

4.1.1.2. Edad de la paciente en el momento del diagnóstico del CM

En la tabla 13 podemos ver que la edad media al diagnóstico fue de 49,68 años y la edad mediana de 47.34 años con valores entre los 27 y los 80 años. Se observa en la figura 21 que 49 pacientes (57.0%) fueron diagnosticadas antes de los 50 años frente a 37 pacientes (43.0%) con 50 o más años de edad. Cabe destacar que tan sólo 8 pacientes (8.1%) tenían 65 años o más al diagnóstico.

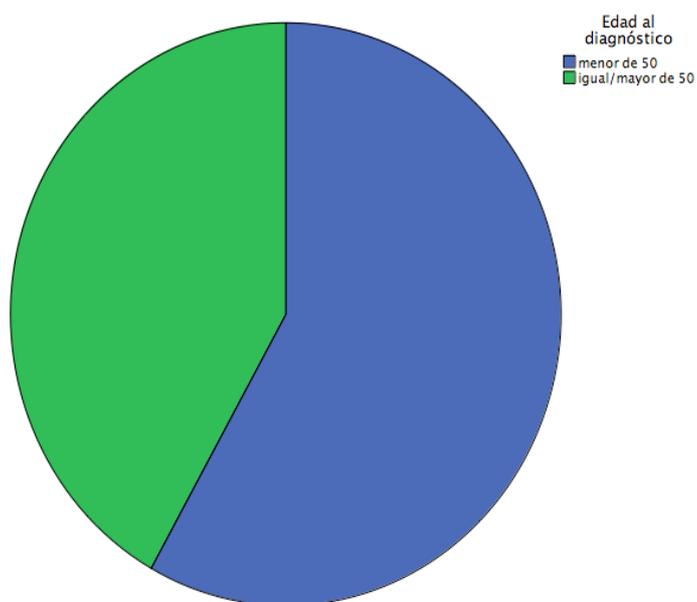


Figura 21. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la edad al diagnóstico del CM.

4.1.1.3. Tamaño clínico tumoral al diagnóstico del CM

De las 86 pacientes analizadas, 35 pacientes (40.7%) presentaban al diagnóstico tumores menores o iguales de 5 centímetros (cT1-2) determinado mediante mamografía /ecografía /RM de mama. Tan sólo 1 paciente presentó un tumor menor o igual a 2 cm (cT1). Tumores mayores de 5 cm (cT3) fueron descritos en 31 pacientes (36.0%), mientras que 20 pacientes (23.3%) presentaron tumores T4, de los cuales 7

(8.1%) fueron carcinomas inflamatorios de mama (cT4d). La figura 22 muestra la distribución de pacientes según el tamaño tumoral clínico.

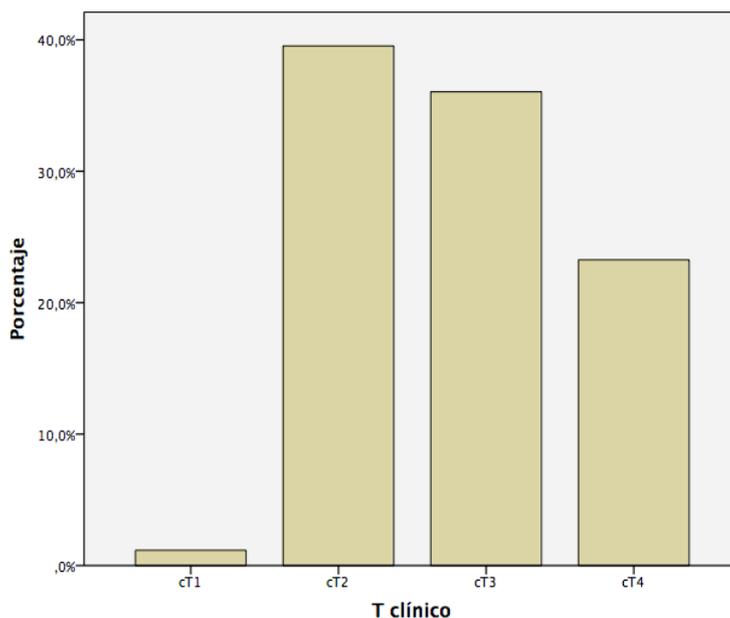


Figura 22. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según tamaño clínico tumoral al diagnóstico del CM.

4.1.1.4. Afectación clínica ganglionar al diagnóstico del CM

Respecto al estadio ganglionar al diagnóstico, se evaluó en todas las pacientes la afectación ganglionar axilar metastásica mediante ecografía axilar, realizándose biopsia ganglionar en aquellos casos que existiera sospecha radiológica de la misma. La muestra de pacientes sin afectación ganglionar fue poco representativa, 12 pacientes (14.0%). De las 74 pacientes (86.0%) con ganglios afectados, 51 (59.3%) fueron clasificadas como cN1 y 23 (26.8%) como cN2. La figura 23 muestra la distribución de pacientes según la afectación clínica ganglionar al diagnóstico.

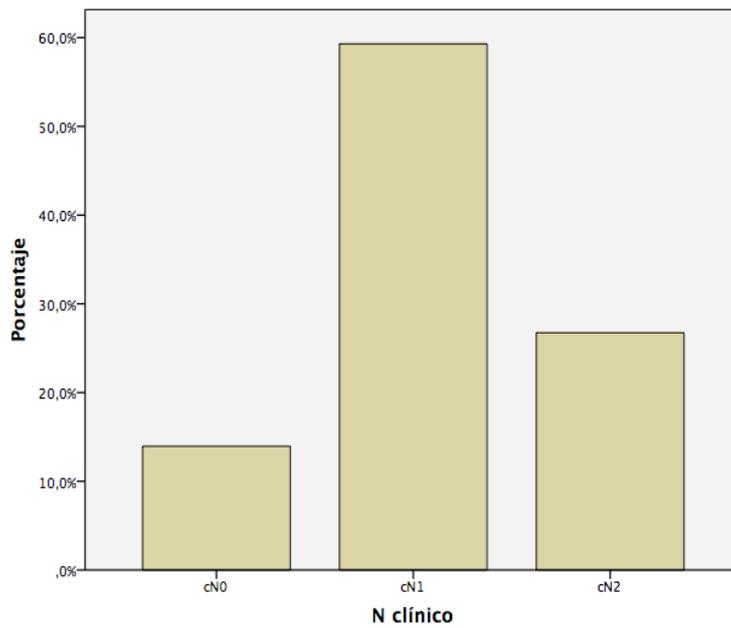


Figura 23. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según afectación clínica ganglionar al diagnóstico del CM.

4.1.1.5. Estadio clínico tumoral al diagnóstico del CM

En cuanto al estadio clínico (cTNM; ver apéndice VI), existe cierto equilibrio en la distribución entre estadios II y III. 36 pacientes (41.9%) tenían estadio II al diagnóstico, de las cuales 12 pacientes (14.0%) fueron definidas como estadio IIA y 24 (27.9%) como IIB. Referente a las 50 pacientes (58.1%) con estadio III: 40 (46.5%) con IIIA y 10 (11.6%) IIIB. La figura 24 muestra la distribución de pacientes según el estadio clínico al diagnóstico.

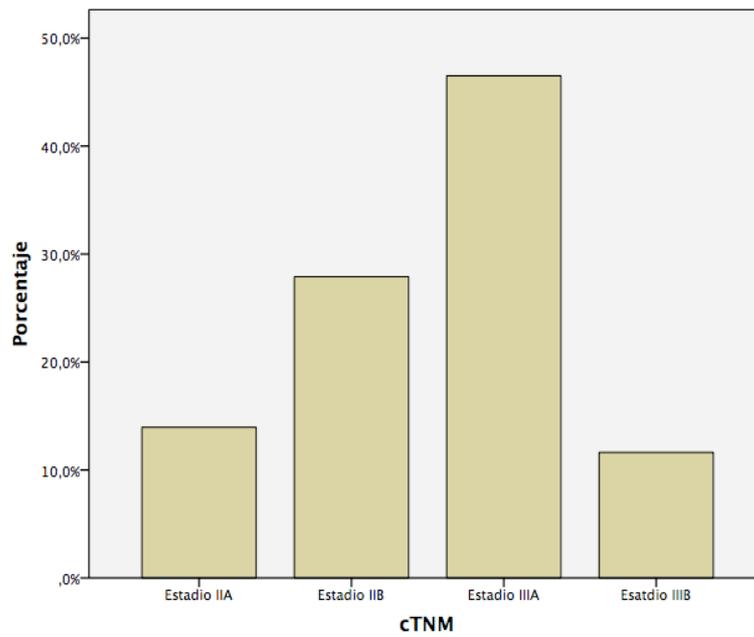


Figura 24. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el estadio clínico al diagnóstico del CM.

4.1.1.6. Características histológicas del tumor primario al diagnóstico del CM

La histología predominante es de CDI en 80 de las pacientes (93.0%). La figura siguiente muestra los porcentajes asociados a cada tipo de carcinoma, donde podemos ver gráficamente la mayor presencia de carcinomas ductales, únicamente 4 de ellas (4.7%) presentaron tumores lobulillares.

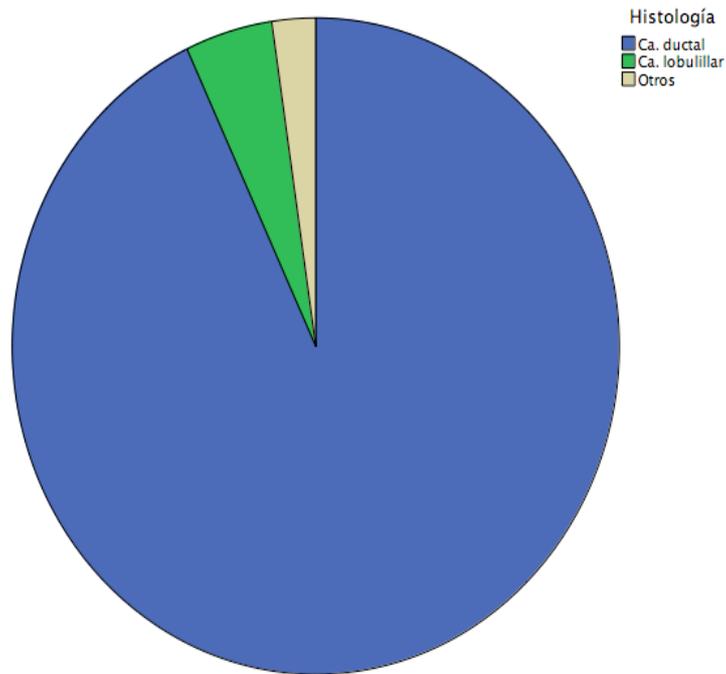


Figura 25. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el tipo histológico al diagnóstico del CM.

Sobre el grado histológico y el marcador de proliferación Ki67, cabe destacar que en dos (2.3%) biopsias diagnósticas el grado histológico era 1, 37 (43.0) con grado 2, 40 pacientes (46.5%) con grado 3 y fue desconocido en 7 pacientes (8.1%). Mientras que pacientes con $Ki67 < 14$ fueron 2 (2.3%), 54 (62.8%) con $Ki67 \geq 14$, y debido a que la determinación se implantó en nuestro centro a finales de 2009 en 30 pacientes (34.9%) era desconocido.

Se adjuntan las figuras con distribución de pacientes según el grado histológico y Ki67.

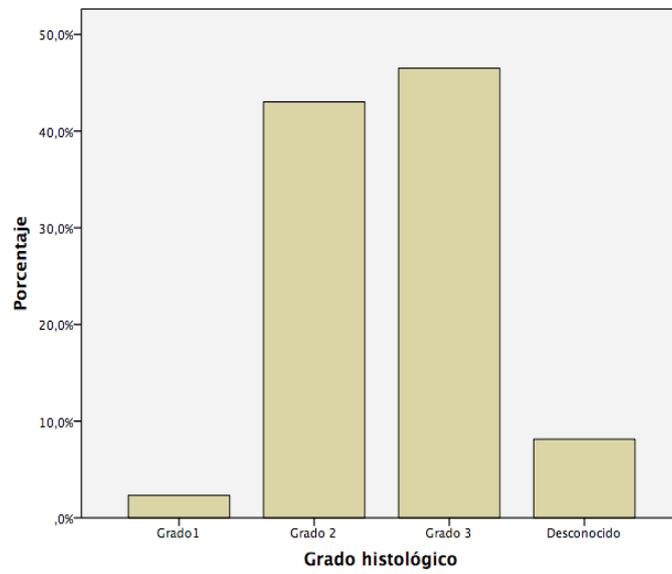


Figura 26. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según el grado histológico al diagnóstico del CM.

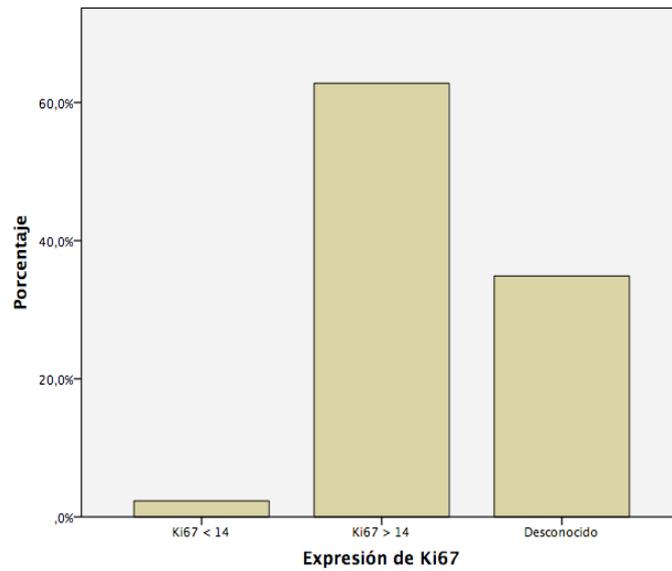


Figura 27. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión de Ki67 al diagnóstico del CM.

4.1.1.7. Expresión de RH del tumor primario al diagnóstico del CM

En el análisis de expresión de RH, se considera RH positivo aquellas pacientes con expresión de RE y/o RP mayor o igual del 1%. 43 pacientes (50.0%) presentaron tumores RH positivos mientras que las 43 restantes RH negativos. 43 pacientes (50.0%) y 32 pacientes (37.2%) presentaron tumores RE y RP positivos respectivamente. Las siguientes figuras muestran la distribución de pacientes según la expresión de RH, RE y RP respectivamente en la biopsia diagnóstica.

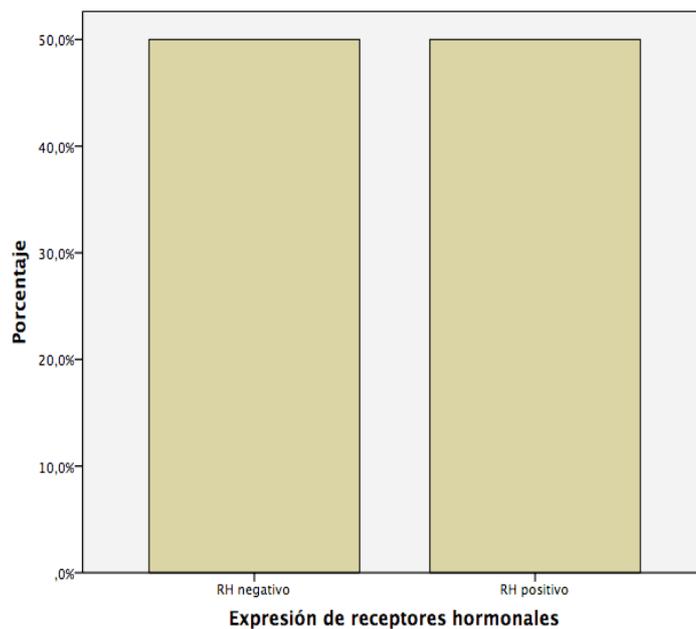


Figura 28. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión de receptores hormonales al diagnóstico del CM.

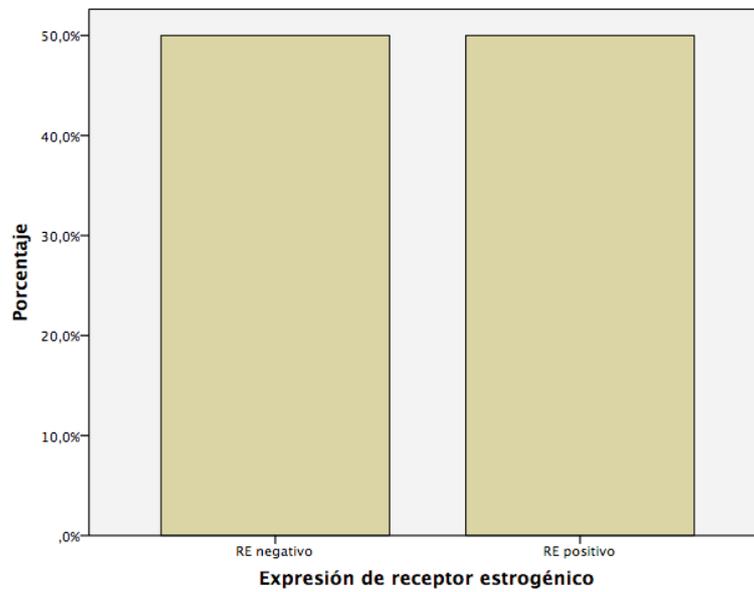


Figura 29. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión del receptor estrogénico al diagnóstico del CM.

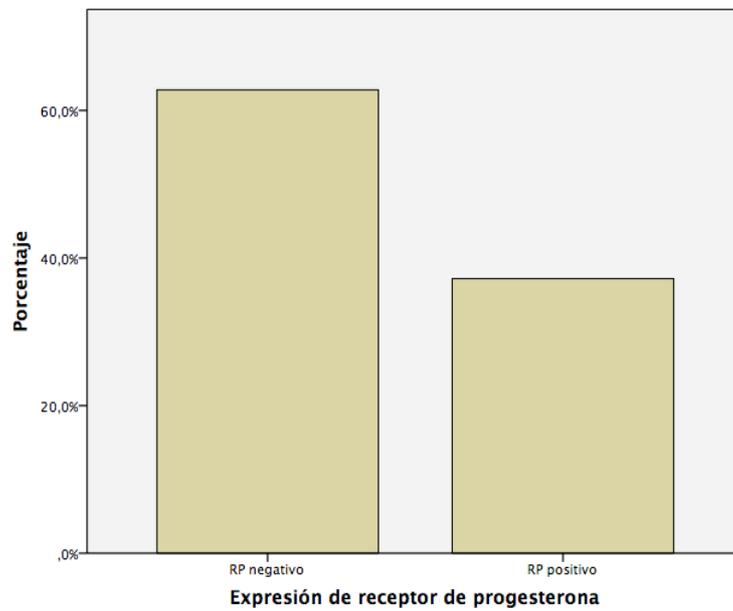


Figura 30. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión del receptor de progesterona al diagnóstico del CM.

4.1.1.8. Determinación de HER2 en el tumor primario al diagnóstico del CM

Todas las pacientes incluidas presentaron tumores HER2 positivo en el diagnóstico inicial. Del global de la muestra, la positividad fue alcanzada por la determinación inmuno-histoquímica (+++/+++)

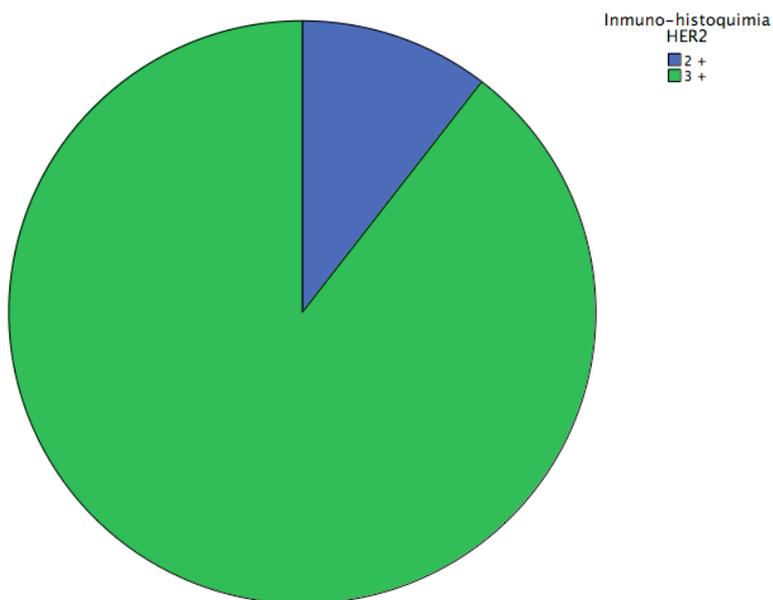
 en 77 pacientes (89.5%) mientras que la amplificación del gen HER2 mediante FISH se describió en 33 pacientes (38.4%). Se confirmó la positividad de HER2 mediante FISH en aquellos casos con grado y/o KI67 bajo.

Figura 31. Distribución de las pacientes incluidas en el estudio según la expresión de HER2 al diagnóstico del CM.

4.1.1.9. Esquema de QNA e intensidad de dosis administrada

Todas las pacientes incluidas recibieron tratamiento quimioterápico basado en antraciclinas y taxanos. Como se puede ver en la figura 32, la mayoría de pacientes, 74 en total (86.0%), recibieron esquemas de quimioterapia donde la antraciclina liposómica no pegilada, paclitaxel y TTZ (MTH) se administraron de forma

concomitante. Las doce pacientes restantes (14.0%), recibieron tratamiento secuencial (AC seguido de paclitaxel y TTZ).

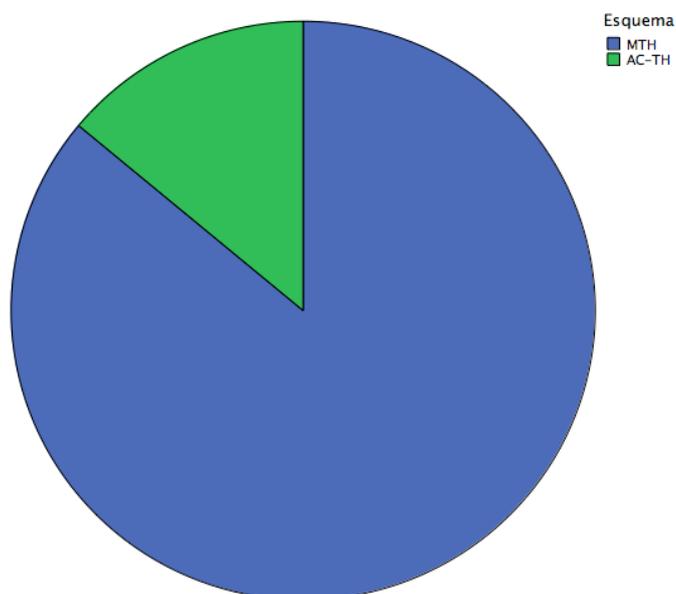


Figura 32. Distribución de las pacientes según el esquema de quimioterapia neoadyuvante utilizado.

En cuanto a la intensidad de dosis, 71 pacientes (82.6%) completaron el tratamiento previsto y únicamente en 15 pacientes (17.4%) se interrumpió el tratamiento antes de lo estimado. 13 de las 15 pacientes suspendieron el tratamiento de forma precoz por toxicidad grado 3/4 secundaria mientras que en las dos restantes el motivo fue la progresión clínica de la enfermedad en curso del tratamiento.

4.1.1.10. Tipo de cirugía realizada tras completar la QNA

Todas las pacientes incluidas fueron sometidas a cirugía tras completar el tratamiento quimioterápico neoadyuvante. Como se observa en la figura 33, del total de las pacientes, se practicó cirugía conservadora en 41 (47.7%) mientras que se realizó mastectomía en las 45 restantes (52.3%).

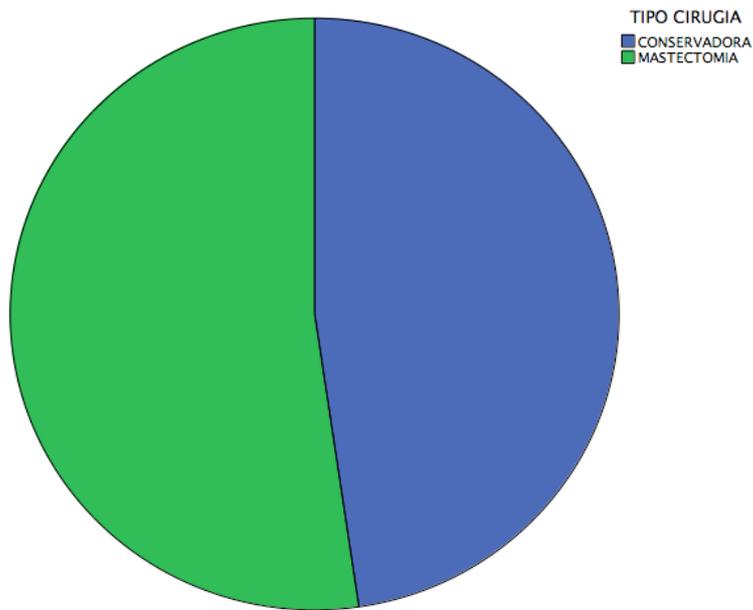


Figura 33. Distribución de las pacientes según el tipo de cirugía practicada tras la quimioterapia neoadyuvante.

4.1.1.11. Tratamiento adyuvante recibido

Tras la cirugía, las pacientes recibieron tratamiento adyuvante siguiendo las recomendaciones de las guías clínicas internacionales. Se administró radioterapia adyuvante según recomendaciones de las guías clínicas locales a 84 pacientes (97.7%) mientras que se obvió en dos pacientes (2.3%) sometidas a mastectomía sin afectación ganglionar clínica ni patológica.

Al tratarse de pacientes con tumores HER2 positivo, las pacientes recibieron un año de TTZ adyuvante. Del total de las pacientes, en 4 de ellas (4.7%) no se completó el periodo de tratamiento previsto debido a toxicidad cardiaca secundaria.

Como se ha comentado previamente el 50% de las pacientes tenían tumores RH positivo al diagnóstico, sin embargo, 52 pacientes (53.6%) recibieron tratamiento hormonoterápico adyuvante. El motivo fue que en 2 pacientes con tumores RH

negativos en la biopsia inicial, se practicó de nuevo la determinación de la expresión de RH en la enfermedad residual modificándose la expresión a RH+ motivo por el que el clínico decidió administrar tratamiento hormonoterápico adyuvante.

4.1.2. Evaluación de la respuesta tras la QNA

4.1.2.1. Evaluación de la respuesta clínica tras completar la QNA

Se evaluó la respuesta clínica durante y tras finalizar el tratamiento quimioterápico neoadyuvante mediante exploración física y radiológica (mamografía, ecografía y RM de mama).

De las 86 pacientes analizadas, 42 pacientes (48.8%) alcanzaron RC clínica. Obtuvieron RP 39 pacientes (45.5%) y de forma anecdótica se describió EE en 3 (3.5%). Como se ha comentado previamente, dos pacientes (2.3%) suspendieron el tratamiento de forma precoz tras objetivarse progresión clínica durante la neoadyuvancia.

Como muestra la tabla 14, la tasa de respuestas clínicas fue del 94.1%.

Tabla 14. Evaluación de la Respuesta Clínica tras el tratamiento neoadyuvante.

Respuesta Clínica	Total
	86 (100%)
Respuesta Completa	42 (48.8%)
Respuesta Parcial	39 (45.3%)
Tasa de Respuesta Clínica	81 (94.1%)
Enfermedad estable	3 (3.5%)
Tasa de Beneficio Clínico	84 (97.7%)
Progresión de enfermedad	2 (2.3%)

4.1.2.2. Evaluación de la respuesta patológica tras la intervención quirúrgica

Todas las pacientes fueron intervenidas entre 4-6 semanas después de completar el tratamiento neoadyuvante. En el análisis de la respuesta a nivel mamario, 55 pacientes (55.8%) obtuvieron respuesta completa (ypT0/is). En trece pacientes (15.1%) restó enfermedad microscópica en la pieza quirúrgica y veinte pacientes (23.3%) presentaron tumores menores o iguales a 2 cm. Únicamente, en seis pacientes (7.0%) la enfermedad residual fue mayor de 2 cm.

Si revisamos la respuesta patológica a nivel ganglionar, 65 pacientes (75.6%) no presentaron afectación ganglionar axilar metastásica. En 15 pacientes (17.4%) restó enfermedad microscópica ganglionar o afectación en hasta tres ganglios axilares.

Al analizar de forma conjunta la respuesta patológica, 46 pacientes (53.5%) alcanzaron la respuesta completa patológica (ypT0/isN0). En el extremo contrario, en 22 pacientes (25.6%) restó enfermedad residual clasificada como estadio II-IIIa.

Todo ello se describe con mayor precisión en la siguiente tabla.

Tabla 15. Evaluación de la Respuesta Patológica tras el tratamiento neoadyuvante.

Respuesta Patológica	Total
	86 (100%)
ypT	
ypT0	37 (43.0%)
ypTis	11 (12.8%)
ypT1mic	13 (15.1%)
ypT1a	5 (5.8%)
ypT1b	7 (8.1%)
ypT1c	8 (9.3%)
ypT2	4 (4.7%)
ypT3	1 (1.2%)
ypN	

ypN0	65 (75.6%)
ypN1mic	5 (5.8%)
ypN1	10 (11.6%)
ypN2	6 (7.0%)
ypTNM	
ypT0/TisN0	46 (53.5%)
ypT1N0-N1mic (Estadio I)	18 (20.9%)
ypT2N0 /ypT0-1N1 (Estadio IIa)	13 (15.1%)
ypT2N1/ypT3N0 (Estadio IIb)	3 (3.5%)
ypT0-3N2/ ypT3N1 (Estadio IIIa)	6 (7.0%)

4.1.3. Análisis de la expresión de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica

Se realizó el análisis de expresión de las diferentes variables inmuno-histoquímicas en las 86 muestras de tejido parafinado obtenido mediante biopsia diagnóstica. Como se puede observar en la tabla siguiente no se dispone del resultado en todas ellas. Principalmente por no disponer de la cantidad suficiente de tejido para un análisis adecuado, ya fuera por escasa muestra inicial como por el desgaste que supuso la realización de cada determinación inmuno-histoquímica. En el caso del análisis de p-4EBP1 solo fue posible realizarla en 35 muestras por existir problemas de reactividad con el anticuerpo correspondiente.

Tabla 16. Análisis de la determinación de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica.

Análisis Realizado de la Variable a estudio	Total
	86 (100%)
PTEN-IRS	
Realizada	84 (97.7%)
No realizada	2 (2.3%)
PTEN Hscore	
Realizada	84 (97.7%)
No realizada	2 (2.3%)

PAKT Hscore	
Realizada	73 (84.9%)
No realizada	13 (15.1%)
P4EBP1 Hscore	
Realizada	35 (40.7%)
No realizada	51 (59.3%)
Mutaciones de PI3KCA	
Realizada	67 (77.9%)
No realizada	19 (23.3%)
Infiltrado Linfocitario	
Realizada	86 (100%)
No realizada	0

Los resultados más destacables son los siguientes:

Referente a la determinación de PTEN en la biopsia diagnóstica, se procedió a la cuantificación del mismo mediante las dos técnicas descritas en el apartado de metodología (IRS-score y H-score). En este sentido, PTEN-IRS fue negativo (≤ 3) en 27 casos (32.1%) y positivo en 57 (67.9%) de los 84 casos analizados.

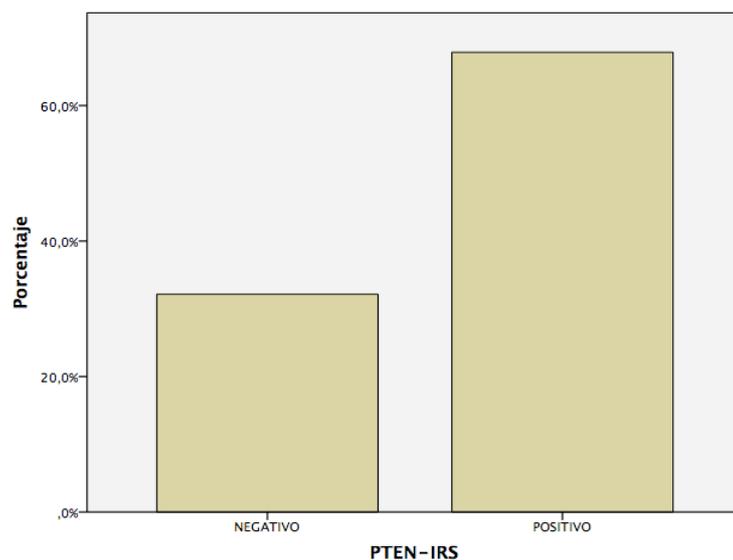


Figura 34. Análisis de la expresión de PTEN mediante la técnica de IRS-score en la biopsia diagnóstica.

Cuando se realizó la cuantificación empleando la técnica del H-score PTEN fue negativo (≤ 40) en 25 casos (29.8%) y positivo en 59 (70.2%) de los 84 casos en los que se pudo analizar. En dos pacientes no se pudo realizar la determinación por falta de muestra.

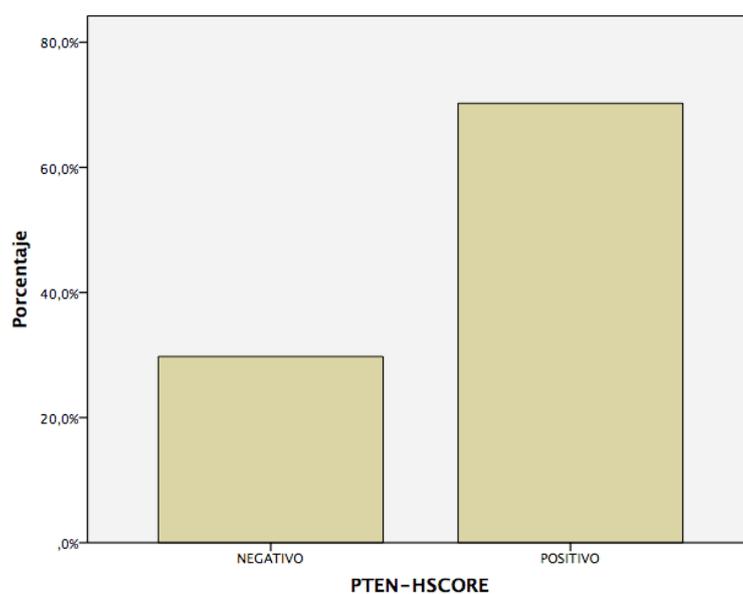


Figura 35. Análisis de la expresión de PTEN mediante la técnica de H-score en la biopsia diagnóstica.

Para la determinación de p-AKT se empleó la técnica de cuantificación de H-score siendo su valor negativo (≤ 50) en 40 pacientes (54.8%) y positivo en 33 (45.2%) de las 73 muestras disponibles. La figura 36 lo describe gráficamente.

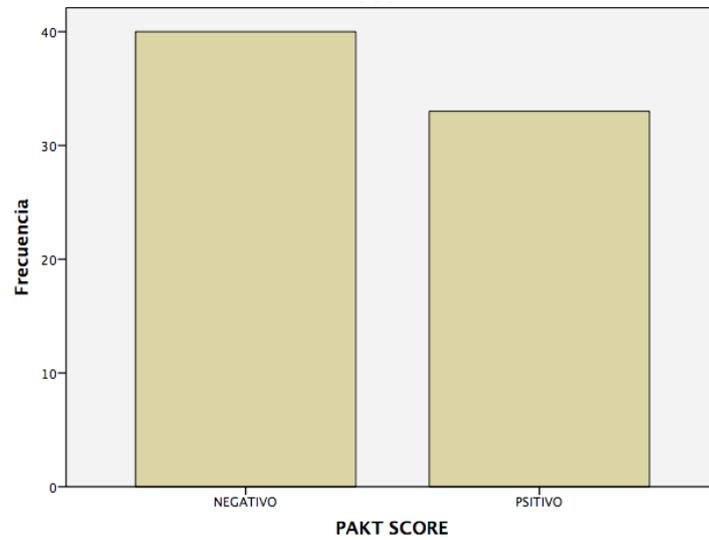


Figura 36. Análisis de la expresión de p-AKT mediante la técnica de H-score en la biopsia diagnóstica.

Por problemas técnicos con el reactivo, la determinación de p-4EBP1 y su cuantificación con la técnica del H-score sólo fue posible en 35 pacientes. Se obtuvo un valor negativo (≤ 50) en 19 casos (54.3%) y fue positivo en 16 (45.7%).

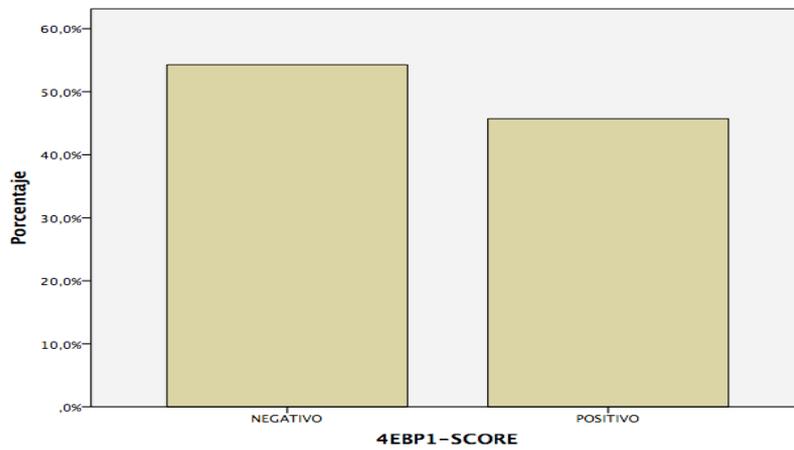


Figura 37. Análisis de la expresión de p-4EBP1 mediante la técnica de H-score en la biopsia diagnóstica.

Por último, cabe destacar del análisis del estado mutacional de PI3KCA que se objetivó mutación en dieciséis pacientes (23.9%) de las 67 muestras analizadas. De forma más precisa se describieron mutaciones en el exón 9 en seis pacientes (4 en E545X, 2 en E542K y un paciente con doble mutación) mientras que nueve pacientes tenían la mutación H1047X del exón 20.

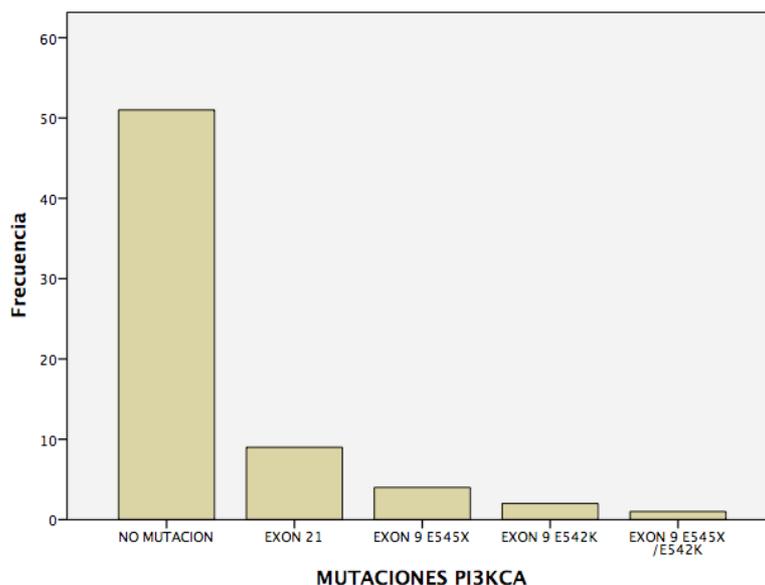


Figura 38. Análisis del estado mutacional de PIKCA en la biopsia diagnóstica.

Por otro lado, se determinó el porcentaje de pacientes con alteración de la vía PI3K/AKT. El primer análisis incluyó alteración en PTEN ($Hscore \leq 40$), y/o bien alteración en p-AKT, y/o mutación en PI3KCA. Se describió alteración de la vía en cincuenta y cinco muestras (64.7%) de las 85 en las que fue posible su determinación.

Del mismo modo, se realizó un segundo análisis de la vía PI3K incluyendo alteración en PTEN ($Hscore \leq 40$) y/o mutación en PI3K. En este caso, treinta y dos de las 85 pacientes (37.5%) tenían alteración de la vía.

Otra de las determinaciones practicadas fue la cuantificación del infiltrado linfocitario tumoral estromal. La realización de esta técnica fue posible en las 86 pacientes. El TIL fue bajo ($\leq 10\%$) en 71 muestras (82.6%) y predominante ($>10\%$) en quince de ellas (17.4%). La mediana del nivel de TIL fue del 5%. De forma más precisa: TIL $<5\%$ en treinta y cinco pacientes (40.7%), entre 5-10% treinta y seis pacientes (41.9%) y $>10\%$ quince pacientes (17.4%).

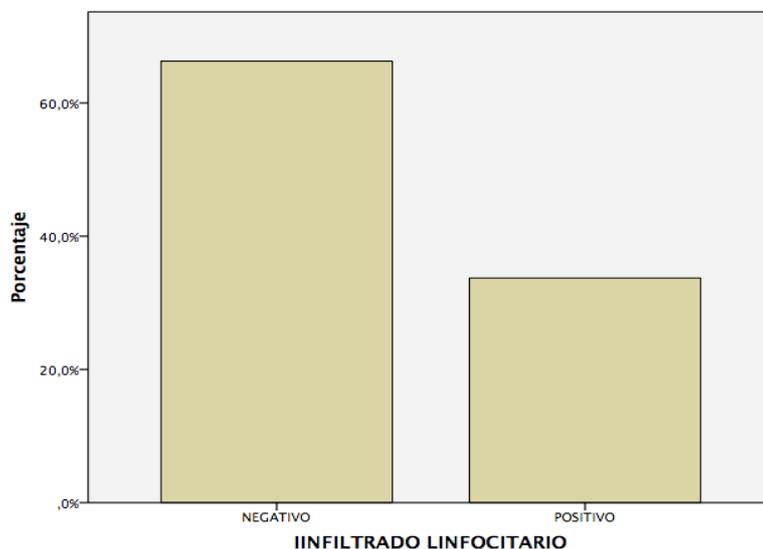


Figura 39. Análisis del infiltrado linfocitario tumoral estromal en la biopsia diagnóstica.

4.1.4. Análisis de la expresión de las variables según variables clínico-patológicas

4.1.4.1. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la edad de la paciente al diagnóstico

En primer lugar, al analizar la expresión de las diferentes variables a estudio en función de la edad al diagnóstico destacó la mayor expresión de p-AKT (54.2% vs 35.4%; $p=0.135$) en mujeres jóvenes. Como se puede observar en la tabla 17 no se observaron diferencias en la expresión de PTEN, mutaciones de PI3KCA y en el infiltrado linfocitario según la edad de la paciente al diagnóstico.

Tabla 17. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la edad.

Expresión de la Variable a estudio	≤50 años	>50 años	Valor P (Chi cuadrado)
PTEN-IRS			
Positivo	33 (66%)	24 (70.6%)	0.659
Negativo	17 (34%)	10 (29.4%)	
PTEN Hscore			
Positivo	34 (68%)	25 (73.5%)	0.586
Negativo	16 (32%)	9 (26.5%)	
PAKT Hscore			
Positivo	23 (52.3%)	10 (34.5%)	0.135
Negativo	21 (47.7%)	19 (65.5%)	
P4EBP1 Hscore			
Positivo	9 (36%)	7 (70%)	0.068
Negativo	16 (64%)	3 (30%)	
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	7 (18.4%)	9 (31%)	0.230
Ausente	31 (81.6%)	20 (69%)	
Infiltrado linfocitario			
Positivo	11 (22%)	4 (11.1%)	0.189
Negativo	39 (78%)	32 (88.9%)	

4.1.4.2. Análisis de la expresión de las variables a estudio según el tamaño clínico tumoral al diagnóstico

El tamaño tumoral no se asoció a cambios significativos en la expresión de los factores moleculares a estudio, tanto en PTEN como p-AKT así como en el infiltrado linfocitario y mutaciones en PI3KCA.

Tabla 18. Análisis de la expresión de variables a estudio en función del tamaño clínico tumoral.

Expresión de la Variable a estudio	cT1-T2	cT3-T4	Valor P (Chi cuadrado)
PTEN-IRS			
Positivo	25 (71.4%)	32 (65.3%)	0.554

Negativo	10 (28.6%)	17 (34.7%)	
PTEN Hscore			
Positivo	25 (71.4%)	34 (69.4%)	
Negativo	10 (28.6%)	15 (30.6%)	0.840
PAKT Hscore			
Positivo	15 (51.7%)	18 (40.9%)	
Negativo	14 (48.3%)	26 (59.1%)	0.364
P4EBP1 Hscore			
Positivo	12 (54.5%)	4 (30.8%)	
Negativo	10 (45.5%)	9 (69.2%)	0.172
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	6 (24%)	10 (23.8%)	
Ausente	19 (76%)	32 (76.2%)	0.986
Infiltrado linfocitario			
Positivo	6 (17.1%)	9 (17.6%)	
Negativo	29 (82.9%)	42 (82.4%)	0.952

4.1.4.3. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la afectación clínica ganglionar al diagnóstico

Al igual que ocurría con el tamaño tumoral, no se objetivaron diferencias destacables en la expresión de los factores a estudio según la afectación axilar metastásica al diagnóstico como se describe en la tabla 19.

Tabla 19. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la afectación clínica ganglionar.

Expresión de la Variable a estudio	cN0	cN1	Valor P (Chi cuadrado)
PTEN-IRS			
Positivo	8 (66.7%)	49 (68.1%)	
Negativo	4 (33.3%)	23 (31.9%)	0.924
PTEN Hscore			
Positivo	9 (75%)	50 (69.4%)	
Negativo	3 (25%)	22 (30.6%)	0.697

PAKT Hscore			
Positivo	4 (36.4%)	29 (46.8%)	0.523
Negativo	7 (63.6%)	33 (53.2%)	
P4EBP1 Hscore			
Positivo	4 (66.7%)	12 (41.4%)	0.258
Negativo	2 (33.3%)	17 (58.6%)	
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	1 (11.1%)	15 (25.9%)	0.334
Ausente	8 (88.9%)	43 (74.1%)	
Infiltrado linfocitario			
Positivo	2 (16.7%)	13 (17.6%)	0.939
Negativo	10 (83.3%)	61 (82.4%)	

4.1.4.4. Análisis de la expresión de las variables a estudio según el grado histológico

Al revisar la correlación entre el grado histológico y las variables a estudio se observó que existe una menor expresión de PTEN en tumores de bajo grado (grado 1-2) respecto aquellos con grado 3 (18.4% vs 38.5%; $p=0.052$). Otra diferencia destacable fue que los tumores de alto grado (grado 3) se asociaron a un mayor infiltrado linfocitario respecto tumores con grado 1-2 (5.1% vs 27.5%; $p=0.007$).

Tabla 20. Análisis de la expresión de variables a estudio en función del grado histológico.

Expresión de la Variable a estudio	Grado 1-2	Grado 3	Valor P (Chi cuadrado)
PTEN-IRS			
Positivo	24 (57.1%)	33 (78.6%)	0.052
Negativo	18 (42.9%)	9 (21.4%)	
PTEN Hscore			
Positivo	31 (81.6%)	23 (59%)	0.059
Negativo	7 (18.4%)	16 (41%)	
PAKT Hscore			
Positivo	13 (37.1%)	18 (56.3%)	0.117

Negativo	22 (62.9%)	14 (43.7%)	
P4EBP1 Hscore			
Positivo	10 (58.8%)	9 (50%)	
Negativo	7 (41.2%)	9 (50%)	0.829
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	9 (30%)	5 (16.7%)	
Ausente	21 (70%)	25 (83.3%)	0.222
Infiltrado linfocitario			
Positivo	2 (5.1%)	11 (27.5%)	
Negativo	37 (94.9%)	29 (72.5%)	0.007

4.1.4.5. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la expresión de KI67

Referente a la expresión de las variables a estudio y el índice de proliferación determinado mediante la expresión de Ki67 cabe destacar la escasa o nula población con índices de proliferación menores al 14% lo que no permite realizar un análisis comparativo adecuado.

Tabla 21. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la expresión de KI67.

Expresión de la Variable a estudio	Ki67<14%	Ki67≥14%	Valor P (Chi cuadrado)
PTEN-IRS			
Positivo	2 (100%)	37 (69.8%)	
Negativo	0	16 (30.2%)	0.476
PTEN Hscore			
Positivo	2 (100%)	38 (71.7%)	
Negativo	0	15 (28.3%)	0.546
PAKT Hscore			
Positivo	0	20 (46.5%)	
Negativo	1 (100%)	23 (53.5%)	0.652
P4EBP1 Hscore			
Positivo	0	11 (47.8%)	0.476

Negativo	0	12 (52.8%)	
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	1 (50%)	8 (20.5%)	
Ausente	1 (50%)	31 (79.5%)	0.569
Infiltrado linfocitario			
Positivo	0	10 (18.5%)	
Negativo	2 (100%)	44 (81.5%)	0.787

4.1.4.6. Análisis de la expresión de las variables a estudio según la expresión de receptores hormonales

Finalmente y relacionado con la expresión de RH, en los tumores RH+ se describió una menor expresión de PTEN (57.1 vs 78.6%; $p=0.035$), similar infiltrado linfocitario, y tasa de mutaciones en la unidad catalítica de PI3K respecto a los RH-.

En cuanto a la correlación de las variables a estudio y la expresión del RP no se observaron diferencias significativas entre los tumores RP+ y RP-.

Tabla 22. Análisis de la expresión de variables a estudio en función de la expresión de receptores hormonales.

Expresión de la Variable a estudio	RH+	RH-	Valor P (Chi cuadrado)
PTEN-IRS			
Positivo	24 (57.1%)	33 (78.6%)	
Negativo	18 (42.9%)	9 (21.4%)	0.035
PTEN Hscore			
Positivo	26 (61.9%)	33 (78.6%)	
Negativo	16 (38.1%)	9 (21.4%)	0.095
PAKT Hscore			
Positivo	15 (39.5%)	18 (51.4%)	
Negativo	23 (60.5%)	17 (48.6%)	0.305
P4EBP1 Hscore			
Positivo	10 (58.8%)	9 (50%)	

Negativo	7 (41.2%)	9 (50%)	
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	9 (24.3%)	7 (23.3%)	
Ausente	28 (75.7%)	23 (76.7%)	0.925
Infiltrado linfocitario			
Positivo	6 (14%)	9 (20.9%)	
Negativo	37 (86%)	34 (79.1%)	0.394

4.1.5. Análisis de la expresión de las variables a estudio en la enfermedad residual

Del mismo modo que en la biopsia diagnóstica, se determinó la expresión de estas variables junto con la amplificación del gen HER2 en las muestras de tejido parafinado de aquellas pacientes que no alcanzaron RCp. Como se puede observar en la tabla siguiente, no se dispone del resultado en todas ellas principalmente por disponer de escasa cantidad de tejido además de los problemas en la técnica de análisis de p-4EBP1.

Tabla 23. Análisis de la determinación de las variables a estudio en la enfermedad residual

Análisis Realizado de las Variables a estudio	Total
	40 (100%)
PTEN-IRS	
Realizada	40 (100%)
No realizada	0
PTEN Hscore	
Realizada	40 (100%)
No realizada	0
PAKT Hscore	
Realizada	40 (100%)
No realizada	0
P4EBP1 Hscore	
Realizada	1 (2.5%)
No realizada	39 (97.5%)

Infiltrado linfocitario	
Realizada	39 (97.5%)
No realizada	1 (2.5%)
HER2	
Realizada	40 (100%)
No realizada	0

En la tabla 24 se describe la expresión de las diferentes variables a estudio en la enfermedad residual de pacientes que no alcanzaron la RCp. Cabe destacar que el 57.2% de ellas presentaron una menor expresión de PTEN, independientemente de la técnica de cuantificación realizada. Se objetivó una menor expresión de p-AKT en la mayoría de muestras, alcanzando el 80% del global. La determinación de p-4EBP1 no fue posible en el momento del procesamiento de muestras por lo que los resultados no pueden ser interpretables. El TIL fue positivo en el 15.4% de las pacientes.

El aspecto más destacable fue el análisis de la amplificación de HER2 mediante la técnica de FISH en la muestra tras la QNA. Como se ha comentado en varios momentos, todas las pacientes presentaban tumores HER2 positivos en la biopsia basal, ya fuera por la sobre-expresión inmuno-histoquímica de HER2 o bien por amplificación del gen mediante FISH. En este sentido, de las 40 pacientes con enfermedad residual tras la QNA, en 35 casos la positividad de la biopsia diagnóstica se obtuvo por inmuno-histoquímica y en 5 por técnica de FISH. Sin embargo, cuando se realizó la técnica de FISH en la muestra residual de estas pacientes tan sólo el 40% tenían amplificación del gen.

Tabla 24. Análisis de la expresión de las variables a estudio en la enfermedad residual

Expresión de la Variable a estudio	Total
	40 (100%)
PTEN-IRS	
Positivo	17 (42.5%)

Negativo	23 (57.5%)
PTEN Hscore	
Positivo	17 (42.5%)
Negativo	23 (57.5%)
PAKT Hscore	
Positivo	8 (20%)
Negativo	32 (80%)
Infiltrado linfocitario	
Positivo	6 (15.4%)
Negativo	33 (84.6%)
HER2 (FISH)	
Positivo	16 (40%)
Negativo	24 (60%)

4.1.6. Análisis comparativo de la expresión de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica y la enfermedad residual correspondiente

La tabla contigua revisa el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en la biopsia diagnóstica inicial y la enfermedad residual correspondiente. Los hallazgos más destacables están relacionados con PTEN y p-AKT donde se confirma una menor sobreexpresión de PTEN, determinado tanto por IRS como por H-score, pasando de un 29.8-32.1% al 57.5% de negativizaciones. En cuanto a p-AKT se redujo la sobreexpresión del 45.7% en la biopsia diagnóstica al 20% en la enfermedad residual. Remarcar de nuevo que los resultados en la enfermedad residual de p-4EBP1 no son interpretables por los problemas técnicos comentados.

Tabla 25. Concordancia entre la biopsia diagnóstica y la enfermedad residual.

Expresión de la Variable a estudio	Biopsia diagnóstica	Enfermedad Residual
PTEN-IRS		
Positivo	57 (67.9%)	17 (42.5%)
Negativo	27 (32.1%)	23 (57.5%)

PTEN Hscore		
Positivo	59 (70.2%)	17 (42.5%)
Negativo	25 (29.8%)	23 (57.5%)
PAKT Hscore		
Positivo	33 (45.8%)	8 (20%)
Negativo	40 (54.8%)	32 (80%)
P4EBP1 Hscore		
Positivo	16 (45.7%)	1 (100%)
Negativo	19 (54.3%)	0
Infiltrado linfocitario		
Positivo	15 (17.4%)	6 (15.4%)
Negativo	71 (82.6%)	33 (84.6%)

De forma complementaria se estudiaron las pacientes que tenían sobre-expresión de PTEM, p-AKT o TIL>10% en la biopsia diagnóstica y/o en la enfermedad residual para un posteriormente ser incluidos en el análisis como factores pronósticos.

La expresión de PTEN fue positiva, tanto mediante IRS como H-score, en la biopsia diagnóstica y/o en la enfermedad residual en el 77.65% (66 de los 85 pacientes). Del mismo modo, la expresión de p-AKT fue positiva al diagnóstico y/o tras la QNA en el 48.10% (38 de 79 pacientes).

El TIL fue positivo en la biopsia diagnóstica y/o en la residual en el 22,09% (19 de las 86 pacientes).

4.2. Tasa de respuesta completa patológica y análisis de factores predictivos de respuesta completa patológica

En el siguiente punto se desarrollan los resultados relacionados con el objetivo principal del estudio y se comparan con otras variables clínico-patológicas.

En la tabla contigua se describe la capacidad predictiva de RCp de las diferentes variables clínico-patológicas y las variables a estudio determinadas en la biopsia diagnóstica. Cabe destacar que se asociaron de forma significativa a mayores tasas de RCp: los tumores RH/RE- (RH/RE+ 39.5% vs RH/RE- 67.4%; p=0.009), los tumores RP- (RP+ 37.5% vs RE- 63.0%; p=0.022), como aquellos con mayores cifras de TIL (TIL>10% 80% vs TIL≤10 47.9%; p=0.023). En cuanto a la vía de PI3K, tanto de forma individual como combinada (PI3K/PTEN alterado 12.5% vs no alterado 79.2%; p<0.0001) la ausencia de expresión de PTEN (PTEN+ 71.9% vs PTEN- 14.8%; p<0.0001) y mutaciones en PI3KCA (PI3KCA mutado 6.3% vs 56.9%; p<0.001) se correlacionó con menores tasas de RCp.

Tabla 26. Factores predictivos de RCp.

Variable	RCp	No RCp	Valor P (Chi cuadrado)
Edad			
Edad >50 años	26 (52.0%)	24 (48.0%)	0.744
Edad ≤50 años	20 (55.6%)	16 (44.4%)	
cT			
cT1-cT2	20 (57.1%)	15 (42.9%)	0.574
cT3-cT4	26 (51.0%)	25 (49.0%)	
cN			
cN0	6 (50.0%)	6 (50.0%)	0.794
cN+	40 (54.1%)	34 (45.9%)	
Estadio Clínico			
Estadio II	23 (63.9%)	13 (36.1%)	0.101
Estadio III	23 (46%)	27 (54%)	
Grado			
Grado 1-2	22 (56.4%)	17 (43.6%)	0.900
Grado 3	22 (55.0%)	18 (45.0%)	
Ki67			
Ki67≤13	0	2 (100%)	0.302
Ki67>13	30 (55.6%)	24 (44.4%)	

Receptor Estrogénico			
Positivo	17 (39.5%)	26 (60.5%)	
Negativo	29 (67.4%)	14 (32.6%)	0.009
Receptor Progesterona			
Positivo	12 (37.5%)	20 (62.5%)	
Negativo	34 (63.0%)	20 (37%)	0.022
Esquema de quimioterapia			
MTH	41 (55.4%)	33 (44.6%)	
AC seguido de TH	5 (41.7%)	7 (58.3%)	0.376
Intensidad de dosis neoadyuvancia			
Completa el tratamiento previsto	39 (54.9%)	32 (45.1%)	
No completa el tratamiento	7 (46.7%)	8 (53.3%)	0.560
PTEN-IRS			
Positivo	41 (71.9%)	16 (28.1%)	
Negativo	4 (14.8%)	23 (85.2%)	<0.0001
PTEN Hscore			
Positivo	42 (71.2%)	17 (28.8%)	
Negativo	3 (12%)	22 (88%)	<0.0001
PAKT Hscore			
Positivo	21 (63.6%)	12 (36.4%)	
Negativo	18 (45%)	22 (55%)	0.112
P4EBP1 Hscore			
Positivo	10 (62.5%)	6 (37.5%)	
Negativo	13 (68.4%)	9 (31.6%)	0.713
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	1 (6.3%)	15 (93.8%)	
Ausente	29 (56.9%)	22 (43.1%)	<0.0001
Alteración PTEN/AKT/PI3KCA			
Presente	24 (43.6%)	31 (56.4%)	
Ausente	22 (73.3%)	8 (26.3%)	0.009
Alteración PTEN/PI3KCA			
Presente	4 (12.5%)	28 (87.5%)	
Ausente	42 (79.2%)	11 (20.8%)	<0.0001

Infiltrado linfocitario			
Positivo	12 (80%)	3 (20%)	0.023
Negativo	34 (47.9%)	37 (52.1%)	

En el análisis según la expresión del RH resaltamos que en el subgrupo de RH positivos permanece la capacidad predictiva PTEN y mutaciones de PI3KCA de forma individual como combinada, sin embargo, posiblemente debido a la reducción del tamaño muestral el infiltrado linfocitario estromal pierde su potencial predictivo (RCp: TIL>10% 66.7% vs TIL≤10 35.1%; p=0.150).

Tabla 27. Factores predictivos de RCp en el subgrupo de tumores RH positivos.

Variable	RCp	No RCp	Valor P (Chi cuadrado)
Edad			
Edad >50 años	8 (44.4%)	10 (55.6%)	0.587
Edad ≤50 años	9 (36%)	16 (64%)	
cT			
cT1-cT2	10 (41.7%)	14 (58.3%)	0.755
cT3-cT4	7 (36.8%)	12 (63.2%)	
cN			
cN0	3 (33%)	6 (66.7%)	0.678
cN+	14 (41.2%)	20 (58.8%)	
Estadio Clínico			
Estadio II	10 (45.5%)	12 (54.5%)	0.429
Estadio III	7 (33.3%)	14 (66.7%)	
Grado			
Grado 1-2	9 (45%)	11 (55%)	0.973
Grado 3	8 (44%)	10 (55.6%)	
Ki67			
Ki67≤13	0	2 (100%)	0.227
Ki67>13	13 (44.8%)	16 (55.2%)	
Esquema de quimioterapia			

MTH	13 (37.1%)	22 (62.9%)	
AC seguido de TH	4 (50%)	4 (50%)	0.514
Intensidad de dosis neoadyuvancia			
Completa el tratamiento previsto	14 (40%)	21 (60%)	
No completa el tratamiento	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0.899
PTEN-IRS			
Positivo	13 (54.2%)	11 (45.8%)	
Negativo	3 (16.7%)	15 (83.3%)	0.013
PTEN Hscore			
Positivo	14 (53.8%)	12 (46.2%)	
Negativo	2 (12.5%)	14 (87.5%)	0.006
PAKT Hscore			
Positivo	7 (46.7%)	8 (53.3%)	
Negativo	8 (34.8%)	15 (65.2%)	0.477
P4EBP1 Hscore			
Positivo	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
Negativo	5 (50%)	5 (50%)	0.409
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	0	9 (100%)	
Ausente	13 (46.4%)	15 (53.6%)	0.010
Alteración PTEN/AKT/PI3KCA			
Presente	9 (31%)	20 (69%)	
Ausente	8 (57.1%)	6 (42.9%)	0.106
Alteración PTEN/PI3KCA			
Presente	2 (10.5%)	17 (89.5%)	
Ausente	15 (62.5%)	9 (37.5%)	<0.0001
Infiltrado linfocitario			
Positivo	4 (66.7%)	2 (33.3%)	
Negativo	13 (35.1%)	24 (64.9%)	0.150

A diferencia del global de la muestra y el subgrupo de RH+, en pacientes con RH- el estadio clínico II (RCp: estadio II 90.9% vs estadio III 59.4%; p=0.056) y el esquema de

QNA MTH (71.8% vs 25%; p=0.059) presentan una tendencia significativa a asociarse a mayores tasas de RCp. De nuevo, se mantienen los resultados para PTEN y PI3KCA mientras que el TIL estromal no es predictivo de RCp.

Tabla 28. Factores predictivos de RCp en el subgrupo de tumores RH negativos.

Variable	RCp	No RCp	Valor P (Chi cuadrado)
Edad			
Edad >50 años	12 (66.7%)	6 (33.3%)	0.929
Edad ≤50 años	17 (68%)	8 (32%)	
cT			
cT1-cT2	10 (90.9%)	1 (9.1%)	0.056
cT3-cT4	19 (59.4%)	13 (40.6%)	
cN			
cN0	3 (100%)	0	0.222
cN+	26 (65%)	14 (35%)	
Estadio Clínico			
Estadio II	13 (92.9%)	1 (7.1%)	0.013
Estadio III	16 (55.2%)	13 (44.8%)	
Grado			
Grado 1-2	13 (68.4%)	6 (31.6%)	0.755
Grado 3	14 (63.6%)	8 (36.4%)	
Ki67			
Ki67≤13	0	0	
Ki67>13	17 (68%)	8 (32%)	
Esquema de quimioterapia			
MTH	28 (71.8%)	11 (28.2%)	0.059
AC seguido de TH	1 (25%)	3 (75%)	
Intensidad de dosis neoadyuvancia			
Completa el tratamiento previsto	25 (69.4%)	11 (30.6%)	0.536
No completa el tratamiento	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
PTEN-IRS			
Positivo	28 (84.8%)	5 (15.2%)	0.001

Negativo	1 (11.1%)	8 (88.9%)	
PTEN Hscore			
Positivo	28 (84.8%)	5 (15.2%)	
Negativo	1 (11.1%)	8 (88.9%)	<0.0001
PAKT Hscore			
Positivo	14 (77.8%)	4 (22.2%)	
Negativo	10 (58.8%)	7 (41.2%)	0.240
P4EBP1 Hscore			
Positivo	8 (88.9%)	1 (11.1%)	
Negativo	8 (88.9%)	1 (11.1%)	1.000
Mutaciones de PI3KCA			
Presente	1 (14.3%)	6 (85.7%)	
Ausente	16 (69.6%)	7 (30.4%)	0.008
Alteración PTEN/AKT/PI3KCA			
Presente	15 (57.7%)	11 (42.3%)	
Ausente	14 (87.2%)	2 (12.5%)	0.043
Alteración PTEN/PI3KCA			
Presente	2 (15.4%)	11 (84.6%)	
Ausente	27 (93.1%)	2 (6.9%)	<0.0001
Infiltrado linfocitario			
Positivo	8 (88.9%)	1 (11.1%)	
Negativo	21 (61.8%)	13 (38.2%)	0.128

4.3. Factores predictivos de respuesta completa patológica en el análisis de regresión logística univariante y multivariante

En la siguiente tabla se presenta de forma resumida los resultados más interesantes del análisis de regresión logística univariante. Se mantiene la capacidad predictiva de los factores previamente descritos: expresión de RH y RP, expresión de PTEN, mutaciones PI3KCA y el TIL estromal. El factor con mayor capacidad predictiva de RCp es la

activación de la vía PI3K definida como la presencia de mutaciones en PI3KCA y/o ausencia de expresión de PTEN.

Tabla 29. Factores predictivos de RCp en el análisis de regresión logística univariante.

Variable	Categoría	Odds Ratio	IC95%	Valor P
Edad	≤50/50 años	0.867	0.367-2.049	0.744
cT	cT1-2/cT3-4	1.287	0.755-2.196	0.354
cN	cN0/N+	1.254	0.634-2.482	0.516
Estadio Clínico	II/III	1.441	0.929-2.236	0.103
Grado	1-2/3	1.059	0.436-2.573	0.900
Ki67	≤13/>13	0.000		
RH	Positivo/Negativo	3.168	1.309-7.665	0.011
RP	Positivo/Negativo	2.833	1.147-6.997	0.024
Esquema de quimioterapia	MTH/AC-TH	1.739	0.505-5.985	0.380
Dosis neoadyuvancia	Completa/No	1.393	0.456-4.256	0.561
PTEN-IRS	Positivo/Negativo	0.764	0.677-0.862	<.0001
PTEN Hscore	Positivo/Negativo	0.971	0.959-0.984	<.0001
PAKT Hscore	Positivo/Negativo	0.468	0.182-1.202	0.114
P4EBP1 Hscore	Positivo/Negativo	1.004	0.995-1013	0.350
Mutaciones de PI3KCA	Presente/Ausente	19.773	2.424-161.261	0.005
Alteración	Presente/Ausente	3.552	1.348-9.360	0.010
PTEN/AKT/PI3KCA				
Alteración PTEN/PI3KCA	Presente/Ausente	26.727	7.732-92.383	<.0001
Infiltrado linfocitario	Positivo/Negativo	0.230	0.060-0884	0.032

En el análisis de regresión logística multivariante se incluyeron como variables: estadio clínico, expresión de RH y RP, expresión de PTEN según IRS/H-score, mutaciones en PI3KCA, combinado PTEN/AKT/PI3KCA, combinado PTEN/PI3KCA, TIL estromal. Los únicos factores que mantuvieron su capacidad predictiva fueron la expresión de RH (OR: 4.170, IC 95% 0.975-17.829; p=0.054) y la activación de la vía PI3K (PTEN/PI3KCA) con una OR de 45.87 (IC 95% 8.059-261.101; p<.0001).

4.4. Supervivencia libre de progresión y análisis de factores pronósticos

Tras una mediana de seguimiento de 75.85 meses 18 pacientes (20.9%) recayeron. Seis presentaron una recidiva local y diecisiete recaída a distancia (una paciente presentó recaída local exclusivamente). La tasa de SLP a 5 años fue del 83.4% en la población global.

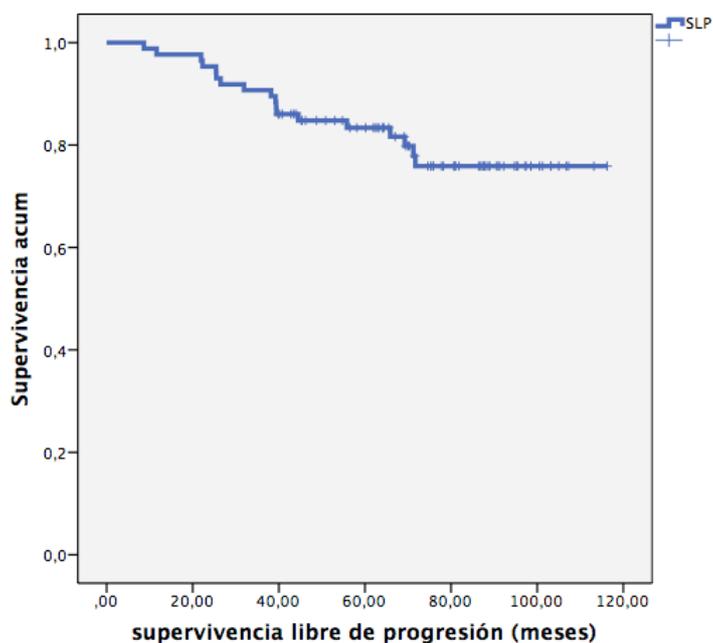


Figura 40. Supervivencia libre de progresión en la población global del estudio.

En la siguiente tabla se describe la tasa de SLP a 5 años en función de las distintas variables clínico-patológicas y factores a estudio.

Tabla 30. Tasa de SLP a 5 años según los distintos factores pronósticos a estudio.

Variable	% SLP a 5 años	Valor P (Log Rank Test)
Edad		
Edad >50 años	77.5%	0.101

Edad ≤50 años	84.6%	
cT		
cT1-cT2	91.7%	
cT3-cT4	73.7%	0.004
cN		
cN0	91.7%	
cN+	82.1%	0.340
Estadio Clínico		
Estadio II	94.4%	
Estadio III	75.4%	0.022
Grado		
Grado 1-2	81.4%	
Grado 3	87.5%	0.899
Ki67		
Ki67≤13	100%	
Ki67>13	88.9%	0.593
Receptor Estrogénico		
Positivo	86%	
Negativo	78.8%	0.112
Receptor Progesterona		
Positivo	77.8%	
Negativo	88.9%	0.897
FISH enfermedad residual		
Amplificado	87.5%	
No amplificado	66.1%	0.069
Respuesta completa patológica		
RCp	91.0%	
No RCp	72.8%	0.042
PTEN-IRS		
Positivo	90.2%	
Negativo	73.9%	0.010
PTEN Hscore		
Positivo	89.4%	
Negativo	72.0%	0.022

PAKT Hscore		
Positivo	80.0%	
Negativo	81.6%	0.778
P4EBP1 Hscore		
Positivo	87.5%	
Negativo	94.1%	0.172
Mutaciones de PI3KCA		
Presente	68.8%	
Ausente	85.7%	0.203
Alteración PTEN/AKT/PI3KCA		
Presente	80.0%	
Ausente	92.3%	0.130
Alteración PTEN/PI3KCA		
Presente	67.4%	
Ausente	92.0%	0.010
Infiltrado linfocitario		
Positivo	93.3%	
Negativo	81.2%	0.138

4.4.1. SLP en función de las variables clínicas

En primer lugar revisamos el papel pronóstico de variables clínicas como el tamaño tumoral, afectación ganglionar y estadio clínico al diagnóstico. Se describió un incremento significativo en la SLP en aquellos tumores de menor tamaño (SLP a 5 años: $T \leq 5\text{cm}$ 91.7% vs $T > 5\text{cm}$ 73.7%; $p=0.004$) y estadio clínico II (SLP a 5 años: estadio II 94.4% vs estadio III 75.4%; $p=0.022$) respecto a tumores mayores de 5 cm y estadio III. No existió asociación con otros factores como la edad, esquema de QNA, intensidad de dosis y tipo de cirugía.

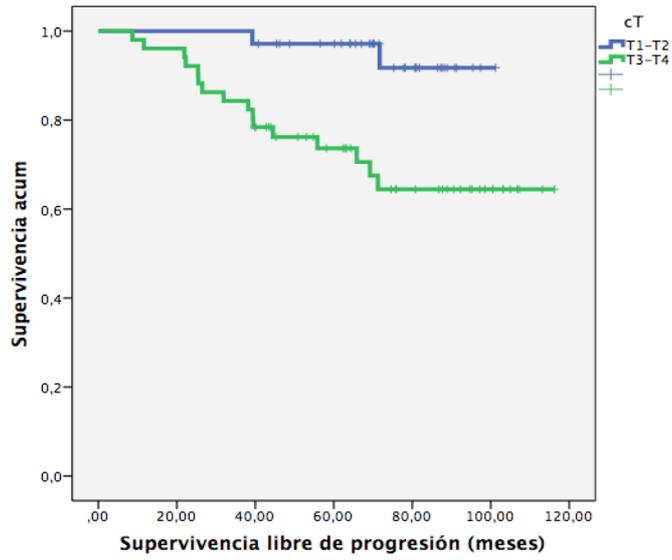


Figura 41. Supervivencia libre de progresión en función del tamaño tumoral al diagnóstico.

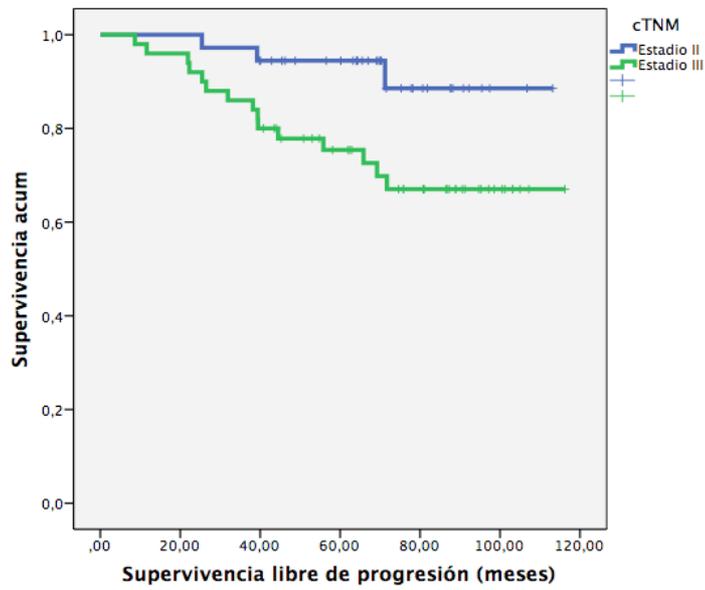


Figura 42. Supervivencia libre de progresión en función del estadio clínico al diagnóstico.

4.4.2. SLP en función de las variables histo-patológicas

Otro de los factores pronósticos analizados fueron las variables histo-patológicas. Al

determinar la SLP en función del grado histológico, la expresión de Ki67 así como la expresión del RE y RP no existieron diferencias significativas según la expresión de los mismos.

La amplificación del gen HER2 en la enfermedad residual se asoció a una mayor SLP sin alcanzar la significación estadística (SLP 5 años: FISH amplificado: 87.5% vs FISH no amplificado: 66.1%; $p=0.069$).

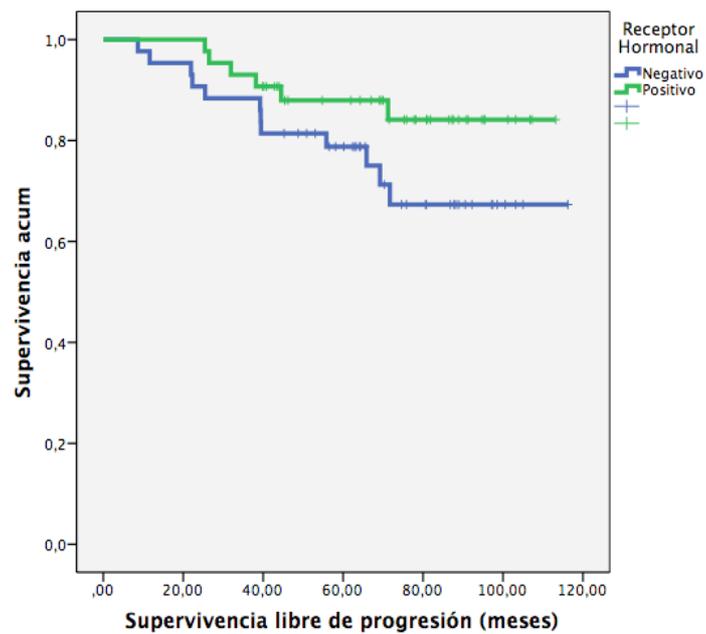


Figura 43. Supervivencia libre de progresión en función de la expresión del receptor hormonal.

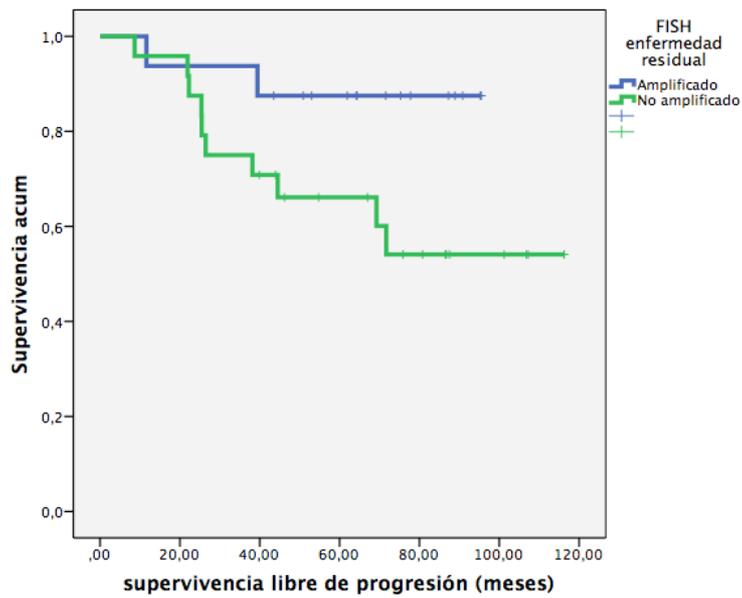


Figura 44. Supervivencia libre de progresión en función de la amplificación del gen HER2 en la enfermedad residual.

4.4.3. SLP en función de la RCp

Las pacientes que alcanzaron RCp tras la QNA presentaron un incremento significativo en la tasa de SLP respecto a aquellas que no la obtuvieron (Tasa SLP 5 años: RCp 91% vs No RCp 72.8%; $p=0.042$).

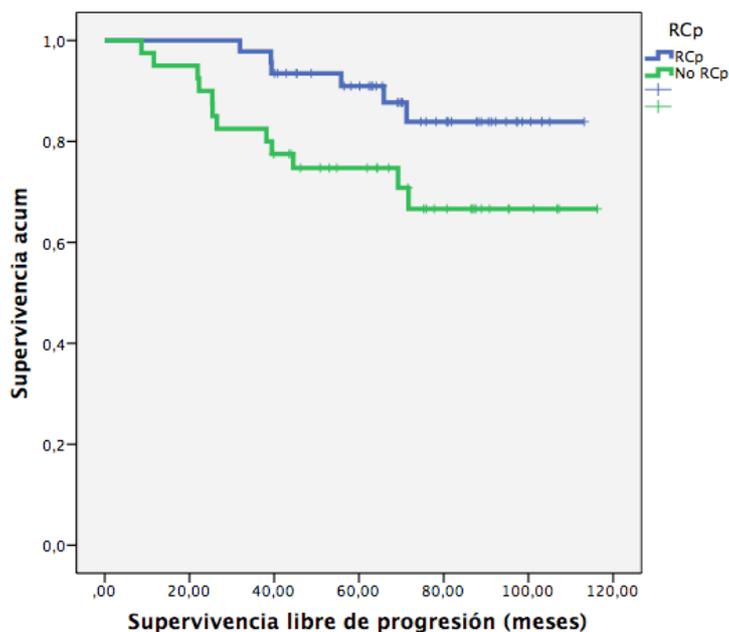


Figura 45. Supervivencia libre de enfermedad en función de la RCp.

4.4.4. SLP en función de la alteración de la vía PI3K

La expresión de p-AKT, tanto en la biopsia diagnóstica como en la enfermedad residual y su sobre-expresión en ambas, además de p-4EBP1 en la biopsia diagnóstica no se asociaron a incrementos en la SLP. Del mismo modo, la presencia de mutaciones en la unidad catalítica de PI3K no tuvo capacidad pronóstica significativa.

La mayor expresión de PTEN en la biopsia diagnóstica se asoció un menor riesgo de recidiva a 5 años, tanto en la determinación mediante IRS como H-score. Las pacientes que presentaron expresión elevada de PTEN en la biopsia diagnóstica y/o en la enfermedad residual se asociaron también a un menor riesgo de recidiva (SLP a 5 años: PTEN elevado 89.4% vs ausencia PTEN 68.4%; $p=0.003$). En el análisis combinado de PI3KCA y expresión de PTEN, la tasa de SLP a 5 años fue significativamente menor en las pacientes con mutación en PI3KCA y/o ausencia de expresión en PTEN (SLP 5 años: alteración vía 67.40% vs no alteración de la vía 92.0;

p=0.010).

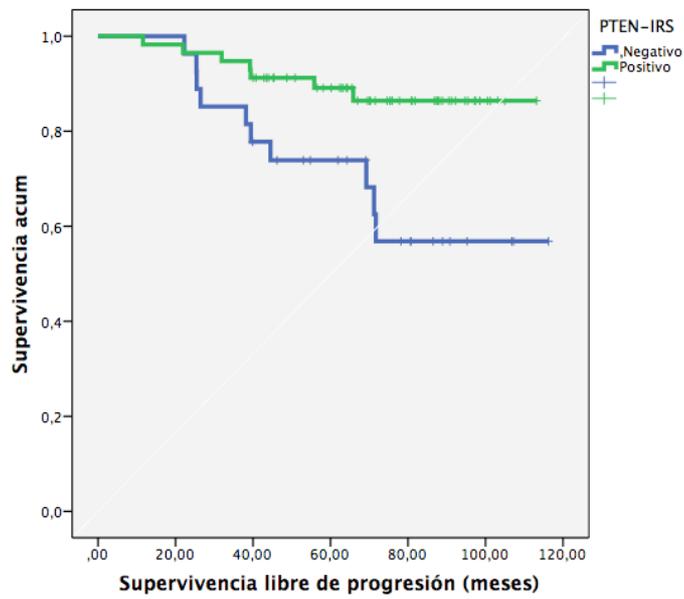


Figura 46. Supervivencia libre de enfermedad en función de la progresión de PTEN mediante IRS-score.

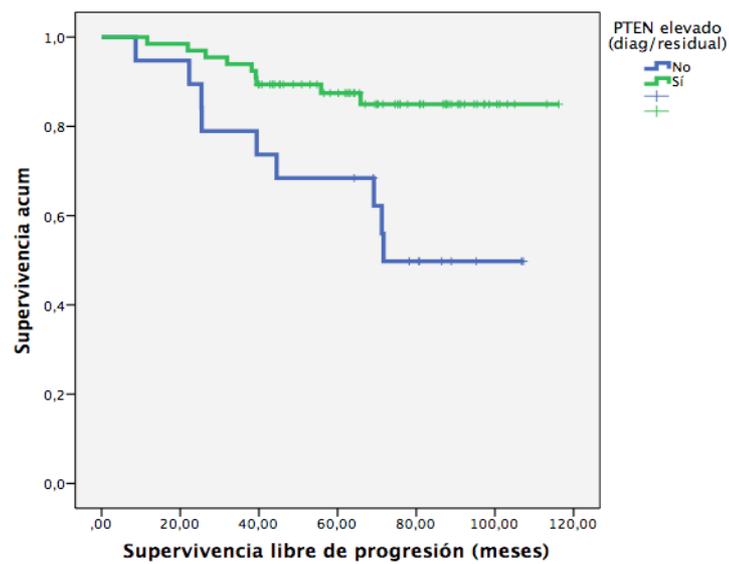


Figura 47. Supervivencia libre de progresión en función de la expresión elevada de PTEN en la biopsia diagnóstica y/o enfermedad residual.

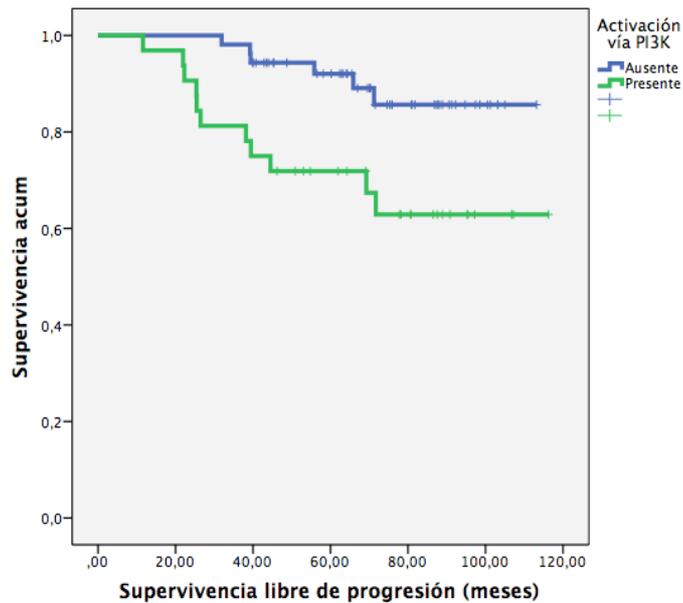


Figura 48. Supervivencia libre de progresión en función de la activación de la vía PI3K.

4.4.5. SLP en función del infiltrado linfocitario estromal

Uno de los hallazgos más destacables fue que de aquellas pacientes con TIL elevado en la biopsia diagnóstica únicamente una presentó recidiva de la enfermedad, sin embargo, no hubieron diferencias estadísticamente significativas (SLP a 5 años: TIL positivo 93.3% vs TIL negativo 81.2%; $p=0.138$). El TIL estromal en la enfermedad residual no tuvo impacto pronóstico. Tampoco la existencia de TIL elevado en la biopsia diagnóstica y/o en la enfermedad residual se asoció significativamente con un menor número de eventos (SLP a 5 años: TIL positivo 89.5% vs TIL negativo 81.6%; $p=0.213$).

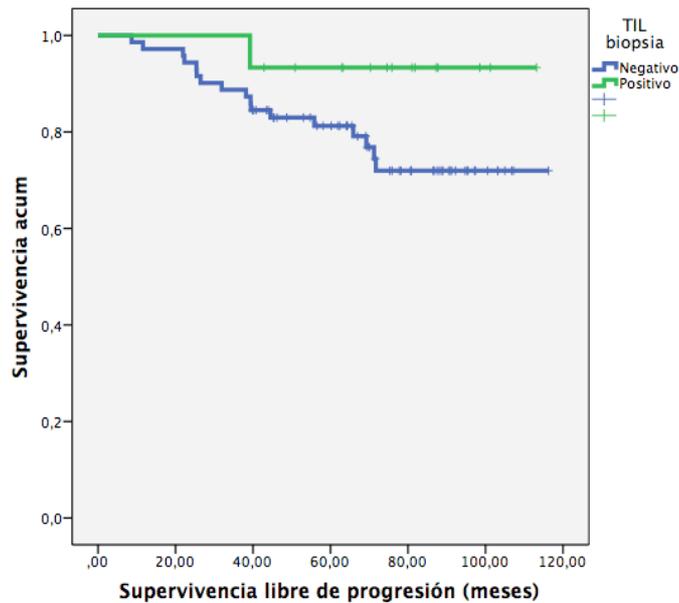


Figura 49. Supervivencia libre de progresión en función del TIL estromal en la biopsia diagnóstica.

4.4.6. Factores pronósticos de SLP en el análisis de regresión logística multivariante

En el análisis de regresión logística multivariante se incluyeron como variables: tamaño tumoral, estadio clínico, expresión de RH y RP, expresión de PTEN según IRS/Hscore, mutaciones en PI3KCA, combinado PTEN/PI3KCA, TIL estromal. Los únicos factores que mantuvieron su capacidad pronóstica fueron el tamaño tumoral al diagnóstico (OR: 2.684, IC 95% 1.280-5.626; $p=0.009$) y la activación de la vía PI3K (PTEN/PI3KCA) con una OR de 3.813 (IC 95% 1.405-10.347; $p=0.009$).

4.5. Supervivencia global y análisis de factores pronósticos

Tras una mediana de seguimiento de 75.85 meses únicamente once pacientes (12.7%) habían fallecido. La tasa de SG a 5 años fue del 91.7% en la población global.

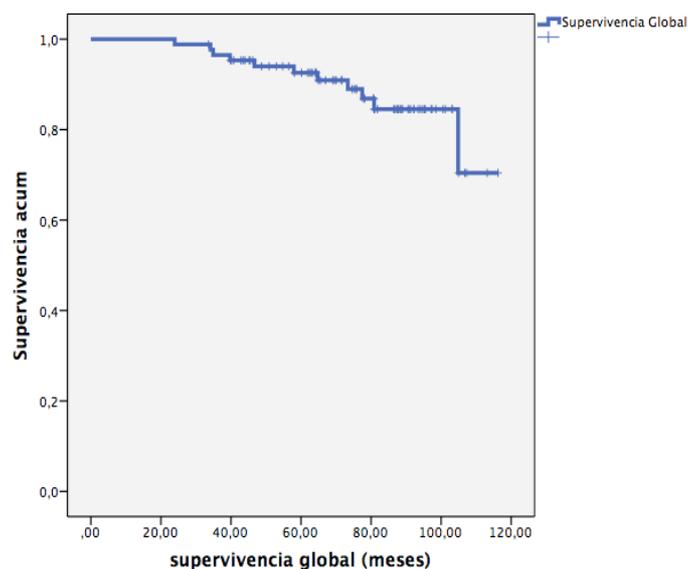


Figura 50. Supervivencia global en la población global del estudio.

La tabla contigua resume la tasa de SG a 5 años en función de las variables más destacables clínicas, histo-patológicas y a estudio.

Tabla 31. Tasa de SG a 5 años según los distintos factores pronósticos a estudio.

Variable	% SG a 5 años	Valor P (Log Rank Test)
Edad		
Edad >50 años	96.1%	0.031
Edad ≤50 años	85.2%	
cT		
cT1-cT2	100%	0.007
cT3-cT4	87.2%	
cN		
cN0	100%	0.227
cN+	91.5%	
Estadio Clínico		
Estadio II	100%	0.033
Estadio III	87.4%	

Grado		
Grado 1-2	88.6%	
Grado 3	89%	0.551
Ki67		
Ki67≤13	100%	
Ki67>13	88.7%	0.675
Receptor Estrogénico		
Positivo	92.2%	
Negativo	90.4%	0.316
Receptor Progesterona		
Positivo	90.6%	
Negativo	92.2%	0.577
FISH enfermedad residual		
Amplificado	85.9%	
No amplificado	81.0%	0.506
Respuesta completa patológica		
RCp	94.8%	
No RCp	86.3%	0.215
PTEN-IRS		
Positivo	94.0%	
Negativo	87.4%	0.096
PTEN Hscore		
Positivo	96.6%	
Negativo	86.7%	0.213
PAKT Hscore		
Positivo	90.9%	
Negativo	92.9%	0.213
P4EBP1 Hscore		
Positivo	100%	
Negativo	92.9%	0.270
Mutaciones de PI3KCA		
Presente	72.7%	
Ausente	96.2%	0.095
Alteración PTEN/AKT/PI3KCA		

Presente	92.2%	
Ausente	93.4%	0.480
Alteración PTEN/PI3KCA		
Presente	86.4%	
Ausente	95.3%	0.118
Infiltrado linfocitario		
Positivo	100%	
Negativo	90.9%	0.108

4.5.1. SG en función de las variables clínicas

De los factores revisados, las variables clínicas sean posiblemente las que mayor impacto tengan en la SG. En primer lugar, las pacientes de menores de 50 años se asociaron a mayores tasas de SG (SG 5 años: <50 años 96.1 vs ≥50 años 85.2%; p=0.031). Si revisamos el papel pronóstico de variables clínicas como el tamaño tumoral, afectación ganglionar y estadio clínico al diagnóstico, existe un incremento significativo en la SLE en aquellos tumores de menor tamaño (Tasa SG a 5 años: T≤5cm 100% vs T>5cm 87.2%; p=0.007) y estadio clínico II (Tasa SG a 5 años: estadio II 100% vs estadio III 87.4%; p=0.033) respecto a los tumores mayores de 5 cm y estadio III. Las pacientes con tumores menores de 5 cm y ausencia de afectación ganglionar al diagnóstico no presentaron ningún evento.

No existió asociación con otros factores como el esquema de QNA, intensidad de dosis y tipo de cirugía.

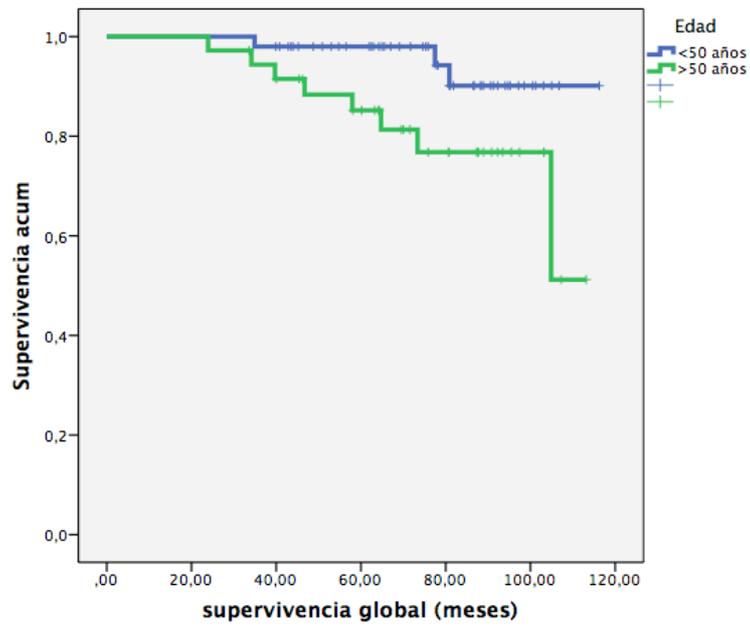


Figura 51. Supervivencia global en función de la edad al diagnóstico de las pacientes.

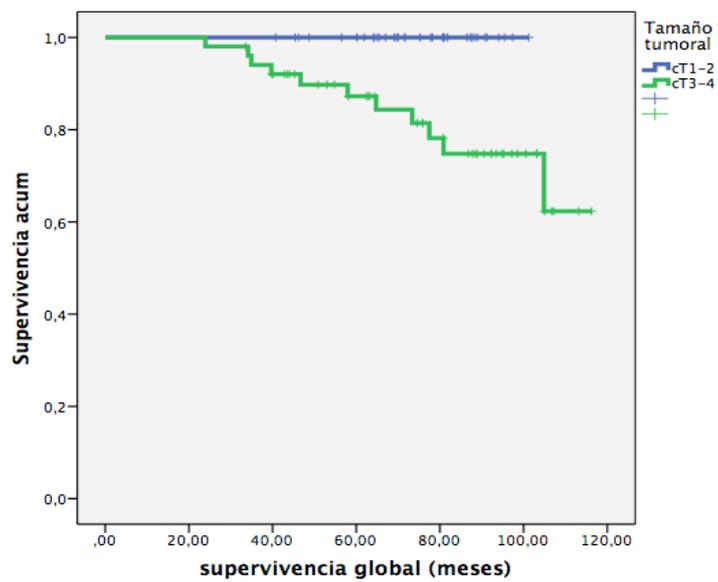


Figura 52. Supervivencia global en función del tamaño tumoral al diagnóstico.

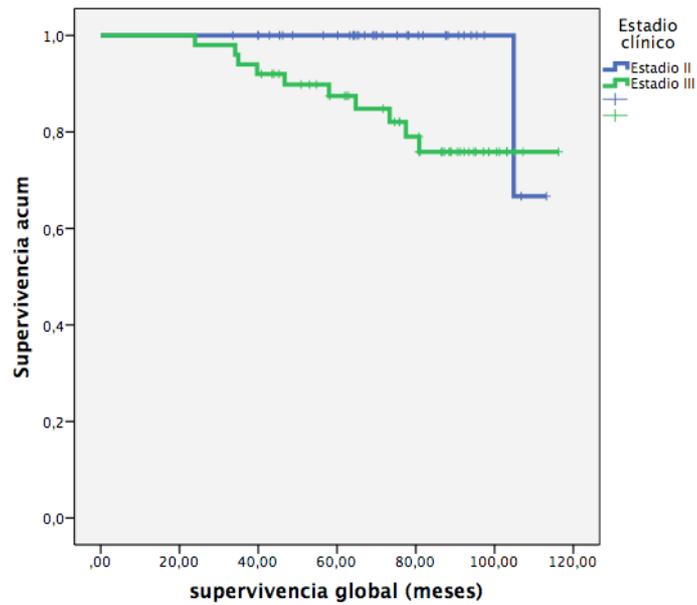


Figura 53. Supervivencia global en función del estadio clínico al diagnóstico.

4.5.2. SG en función de las variables histo-patológicas

Otro de los factores pronósticos analizados fueron las variables histo-patológicas. Al determinar la SG en función del grado histológico, expresión de Ki67 así como la expresión del RE y RP, no existieron diferencias significativas según la expresión de los mismos.

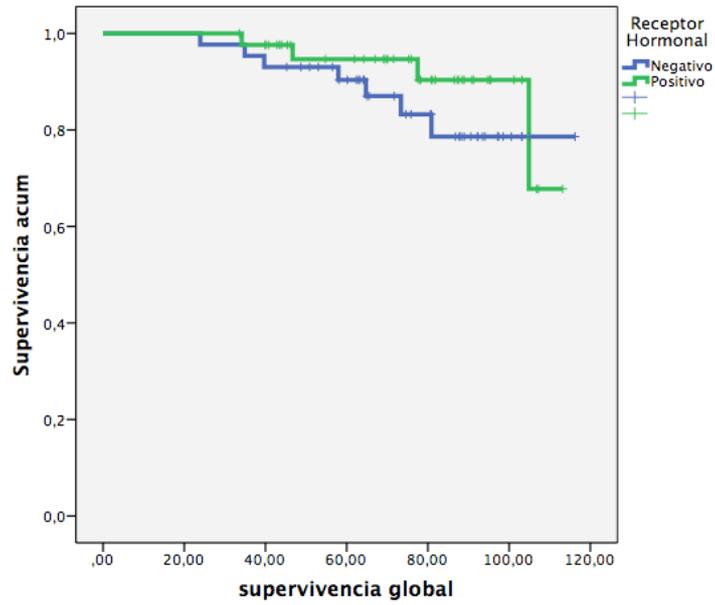


Figura 54. Supervivencia global en función de la expresión de los RH en la biopsia diagnóstica.

La amplificación del gen HER2 en la enfermedad residual no se asoció con un incremento en la SG (SG 5 años: FISH amplificado: 85.9% vs FISH no amplificado: 81.0%; $p=0.506$).

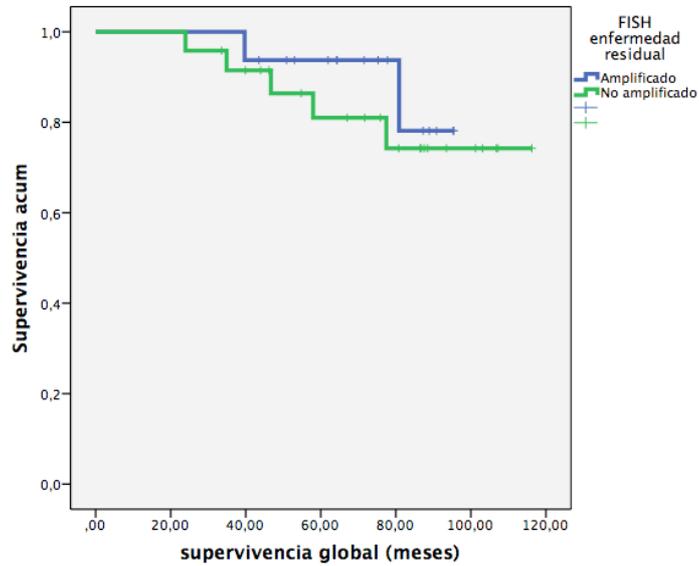


Figura 55. Supervivencia global en función de la amplificación del gen HER2 en la enfermedad residual.

4.5.3. SG en función de la RCp

Las pacientes que alcanzaron RCp tras la QNA presentaron un incremento no significativo en la SG respecto a aquellas que no la obtuvieron (Tasa SG 5 años: RCp 94.8% vs No RCp 86.3%; $p=0.215$).

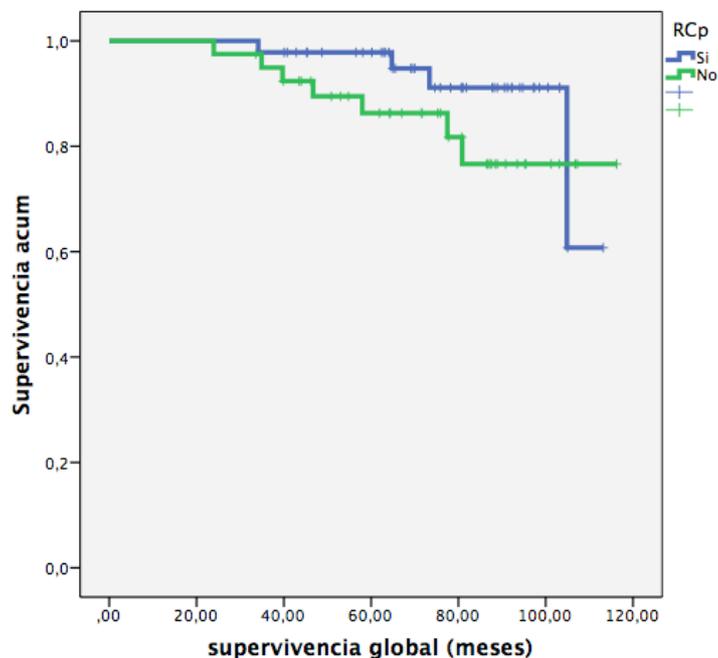


Figura 56. Supervivencia global en función de la respuesta completa patológica.

4.5.4. SG en función de la alteración en la vía PI3K

La expresión de p-AKT, tanto en la biopsia diagnóstica como en la enfermedad residual y su sobre-expresión en ambas, además de p-4EBP1 en la biopsia diagnóstica no se asociaron a incrementos en la SG. Del mismo modo, la presencia de mutaciones en la unidad catalítica de PI3K no tuvo capacidad pronóstica significativa.

La mayor expresión de PTEN en la biopsia diagnóstica se asoció a una menor mortalidad a 5 años, tanto en la determinación mediante IRS como H-score, sin

embargo, no alcanzó la significación estadística (SG 5 años: PTEN IRS score positivo: 94% vs negativo 87.4%; $p=0.096$). Las pacientes con expresión elevada de PTEN en la biopsia diagnóstica y/o en la enfermedad residual se asociaron también a menores tasas de mortalidad (SG a 5 años: PTEN elevado 93.1% vs ausencia PTEN 83.6%; $p=0.026$).

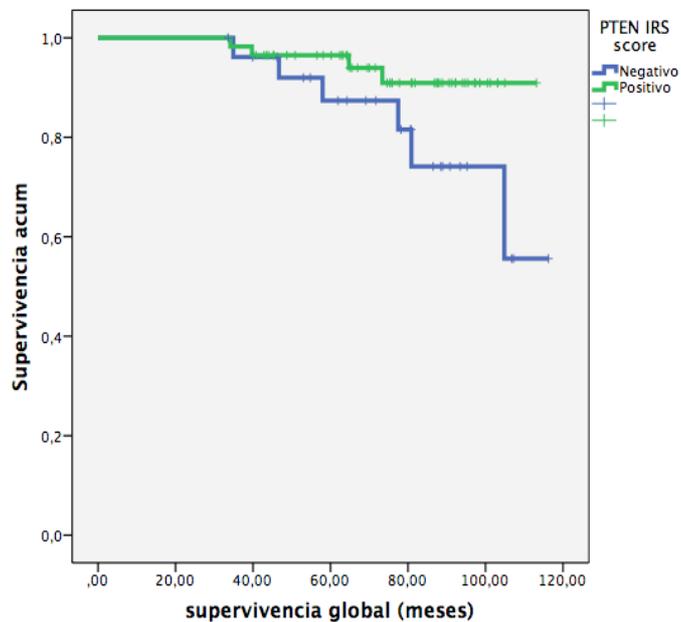


Figura 57. Supervivencia global en función de la expresión de PTEN según IRS-score en la biopsia diagnóstica.

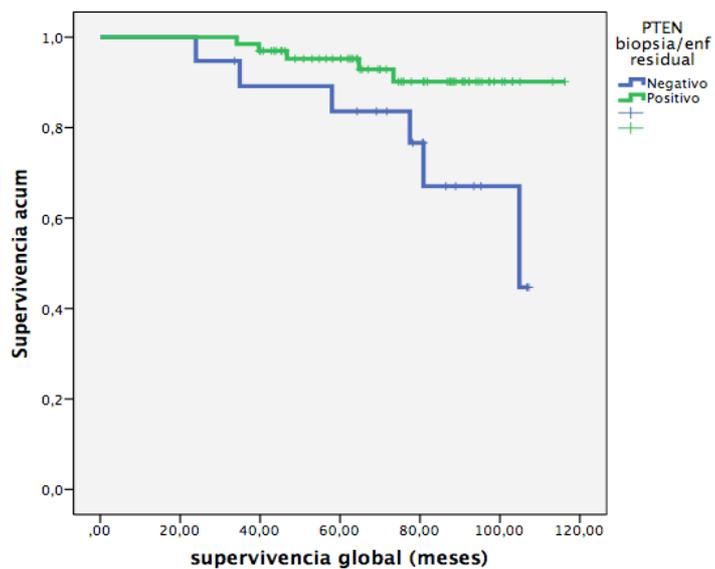


Figura 58. Supervivencia global en función de la sobre-expresión de PTEN en la biopsia diagnóstica o en la enfermedad residual.

En el análisis combinado de PI3KCA y expresión de PTEN, la tasa de SG a 5 años fue menor en las pacientes con alteración de la vía, solo una paciente sin alteración en la vía PI3K falleció durante el periodo de seguimiento (SG 5 años: alteración vía 86.4% vs no alteración de la vía 95.3; $p=0.188$).

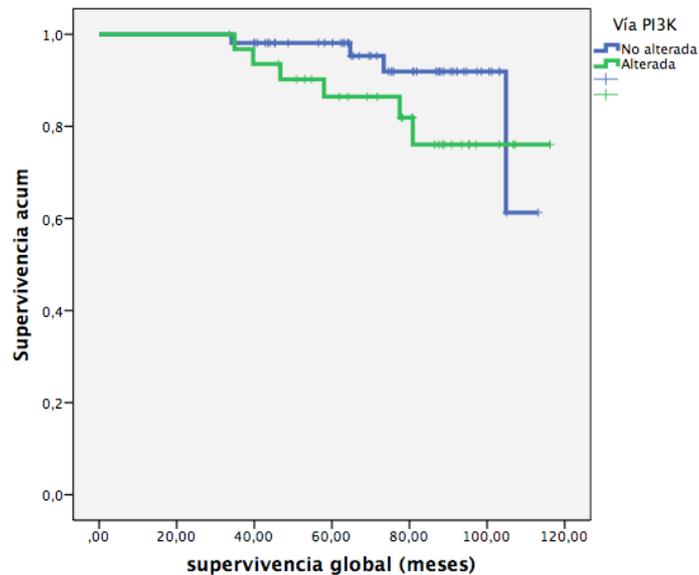


Figura 59. Supervivencia global en función de la alteración de la vía PI3K.

4.5.5. SG en función del infiltrado linfocitario estromal

Ninguna de las pacientes con un TIL elevado en la biopsia diagnóstica fallecieron durante el periodo de seguimiento, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas (SG a 5 años: TIL positivo 100% vs TIL negativo 90.9%; $p=0.108$). El TIL estromal en la enfermedad residual no tuvo impacto pronóstico. Tampoco la existencia de TIL elevado en la biopsia diagnóstica y/o en la enfermedad residual se asoció significativamente con un menor número de eventos (SG a 5 años: TIL positivo 94.7% vs TIL negativo 91.8%; $p=0.283$).

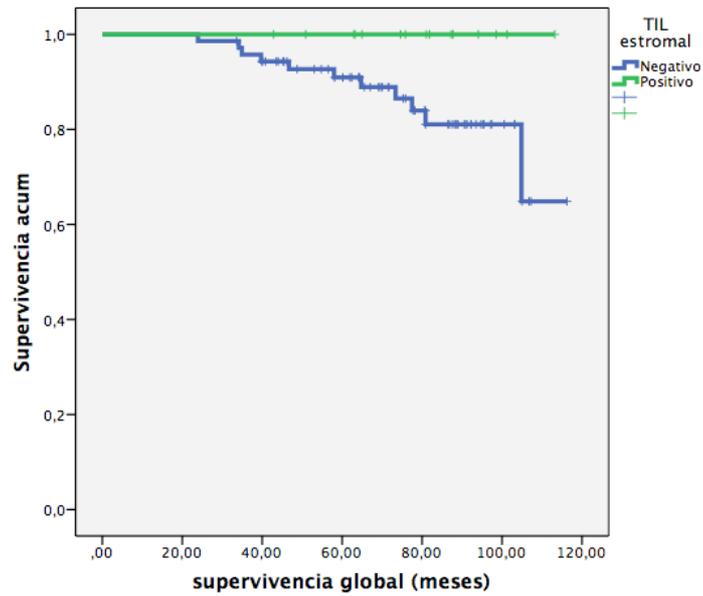


Figura 60. Supervivencia global en función del infiltrado linfocitario estromal en la biopsia diagnóstica.

4.5.6. Factores pronósticos de SG en el análisis de regresión logística multivariante

En el análisis de regresión logística multivariante se incluyeron como variables: edad, tamaño tumoral, estadio clínico, expresión de RH y RP, RCp, expresión de PTEN según IRS/H-score, mutaciones en PI3KCA, combinado PTEN/PI3KCA, TIL estromal. Ninguno de los factores revisados mantuvo su capacidad pronóstica.

5. Discusión

De acuerdo con los resultados de nuestro análisis, las pacientes con CM HER2 positivo tratadas con QNA basada en antraciclinas, taxanos y TTZ que presenten tumores con ausencia de expresión de RH-, tanto RE- como RP-, la presencia de TIL >10% se asociaron de forma significativa a mayores tasas de RCp. En el sentido contrario, la ausencia de expresión de PTEN y mutaciones en PI3KCA, tanto de forma individual como combinada se correlacionó con menores tasas de RCp.

En los siguientes párrafos revisaremos las fortalezas y debilidades de nuestro estudio así como una puesta en contexto con la bibliografía relacionada.

En primer lugar, uno de los puntos fuertes del trabajo tiene relación con la población incluida en el análisis ya que presenta características clínico-patológicas similares a las descritas en los estudios fase II-III neoadyuvantes de referencia en población HER2 positiva.

La edad media en nuestro estudio fue de 49.68 años mientras que la mediana fue de 47.37 años. Similar a las poblaciones incluidas en los estudios fase III como es el caso del fase III de Buzdar (141) la mediana de edad fue de 48 años mientras que en el GeparQuinto la mediana fue de 50 años (339). Del mismo modo, en este estudio el 52% de las mujeres tenían menos de 50 años al diagnóstico, en nuestro caso el 57% eran menores de 50 años (339).

En distintos trabajos de revisión, el estadio clínico en el diagnóstico destaca como factor predictivo y pronóstico (186,187). En nuestro trabajo, a diferencia de otras series donde se incluyeron pacientes con menor carga tumoral, la mayoría de pacientes presentaron tumores localmente avanzados, con un alto porcentaje de tumores mayores de 5 cm al diagnóstico (59.3% de las pacientes) y un 86% de con afectación metastásica ganglionar al diagnóstico. Es por ello que el 58.1% fueron clasificados como estadio clínico III. En la revisión retrospectiva de Sueta (340), que valoraba el papel predictivo de la vía PI3K en pacientes HER2 tratadas con QNA, el

51% tenían afectación ganglionar al diagnóstico. Del mismo modo en el estudio Neosphere, la afectación ganglionar fue descrita en el 70% de las pacientes (341).

Otro factor a tener en cuenta es la inclusión de pacientes con carcinomas inflamatorios pudiendo impactar en los resultados de supervivencia debido a su mayor riesgo de recaída (93,342,343). Si revisamos la bibliografía relacionada, son pocos los estudios que incluyen este subgrupo de pacientes. En el caso de ensayos clínicos con doble bloqueo anti-Her2, el estudio NeoALTTO (142) no incluyó pacientes con tumores inflamatorios ni N3, el 5% de las pacientes del estudio Neosphere (145) y Tryphaena (231) presentaron tumores inflamatorios. En el estudio de Z1041, se incluyeron un 39.1% de pacientes con tumores T3-T4 y el 64.5% con afectación ganglionar, de los cuales el 13% con N2-N3 (141). El estudio con mayor porcentaje de pacientes con tumores inflamatorios es el fase III NOAH que incluyó un 29%(130).

En concordancia con los grandes estudios de neoadyuvancia y series que analizan los factores moleculares a estudio observamos que, en todos ellos, aproximadamente en el 50% de las pacientes incluidas existía sobre-expresión de los RH. Un claro ejemplo lo vemos en el estudio Trypahena (344) con un 53% de pacientes con RH positivos. En los otros dos grandes estudios neoadyuvantes, Neosphere y Z1041, el 47% y 60% respectivamente, sobre-expresaban RE y/o RP (141,341). También en la serie de Sueta (340) el 44% presentaban sobre-expresión de RH.

Finalmente, otra de las variables clínicas con posible impacto pronóstico es la tasa de cirugías conservadoras. En nuestro caso el 47.7% fueron sometidas a cirugía conservadora, similar a lo descrito en estudios fase III como GeparQuattro (184) y el estudio de Buzdar (131) con tasas del 63% y 56.5% respectivamente.

La tasa de RCp obtenida en nuestro análisis, como aspecto determinante en el objetivo principal, debe ser concordante con los estudios fase III en población HER2 positiva que incluyen esquemas basados en antraciclinas, taxanos y terapia anti-HER2.

En nuestro caso 46 de las 86 pacientes (53.5%) alcanzaron RCp definida como ausencia de tumor infiltrante en mama y ganglios axilares (ypT0/isN0). El tratamiento neoadyuvante en pacientes con CM HER2 positivo es precisamente el paradigma de la terapia dirigida y el marco idóneo que ha permitido y permite el desarrollo de nuevas drogas con una valoración de su eficacia en un tiempo precoz. La incorporación de TTZ al tratamiento sistémico primario de este subtipo tumoral ha logrado incrementar la tasa de RCp hasta valores nunca antes alcanzados (40-61%) (128,129,141,142,184,341,345). Como se ha comentado en la introducción, en la actualidad para esta población de pacientes el esquema de tratamiento neoadyuvante de elección está basado en la combinación de antraciclinas, taxanos y TTZ. Recientemente se ha producido un cambio en la práctica clínica, ya que se ha incorporado a estos esquemas otro agente anti-HER2 como PTZ. El primer estudio fase III reportado fue el del MD Anderson Cancer Center, encabezado por el Dr. Buzdar (128), donde 62 pacientes se aleatorizaron a recibir 4 ciclos de paclitaxel trisemanal seguido de 4 ciclos de FEC o el mismo esquema de quimioterapia en combinación con TTZ semanal. La tasa de RCp fue del 26% en el brazo de quimioterapia frente al 60% (IC 95%, 44.3-74.3%) en el brazo que incorporó TTZ. El ensayo fase III NOAH (345) incluyó a 235 pacientes randomizadas a recibir un complejo esquema secuencial de 33 semanas de duración con antraciclinas, paclitaxel y CMF, con o sin TTZ. Se evidenció también un incremento significativo de la tasa de RCp para el grupo que recibió TTZ (38% vs 20%; $p=0,003$). El otro estudio fase III es el GeparQuattro (184) que analizó el papel de añadir capecitabina a un régimen basado en antraciclinas y taxanos. El subgrupo de pacientes HER2, en total 445, recibieron además TTZ trisemanal de forma concomitante. El tratamiento con TTZ aumentó significativamente la tasa de RCp (31.7% vs. 15.7%). Más recientemente, el estudio Z1041 (141) comparó directamente la forma de administración y duración óptima de TTZ neoadyuvante junto con QNA basada en antraciclinas y taxanos. En este estudio, 282 pacientes fueron aleatorizadas a FEC₇₅ seguido de paclitaxel semanal combinado sólo este último con TTZ por 12 semanas, o bien, a paclitaxel semanal por 12 semanas

seguido de FEC₇₅ con TTZ concomitante durante todo el tratamiento. No se objetivaron diferencias significativas en la tasa de RCp (56.5% vs. 54.2%; p=0.72) y de nuevo la tasa de RCp fue similar a la descrita en nuestro análisis.

El siguiente aspecto a comentar es la expresión de las variables a estudio en la biopsia diagnóstica y su correlación con otras variables clínico-patológicas. En los siguientes párrafos se reflejarán los resultados de nuestro análisis y se contextualizarán con los datos de los estudios de referencia respectivos. En primer lugar, se comentarán los elementos implicados en la vía PI3K y finalmente todo aquello relacionado con el TIL.

En nuestro estudio, se objetivó una expresión negativa de PTEN en alrededor del 30% de pacientes. Según el IRS-score fue del 32.1% de las muestras mientras que tras la determinación H-score fue negativa en el 29.8%. El subgrupo de tumores RH- se caracterizaban por presentar un mayor porcentaje de expresión negativa de PTEN, tanto por IRS-score (42.9% vs 21.4%; p=0.035) como por H-score (38.1% vs 21.4%; p=0.095) respecto a tumores RH+. Esteva et al, analizaron la expresión de PTEN en una serie de 137 pacientes con CM metastásico tratados con TTZ. En todos ellos se cuantificó la expresión de PTEN, p-AKT y mutaciones en los exones 9 y 21 de PI3KCA en la biopsia diagnóstica. En esta serie existía una pérdida de expresión de PTEN en el 51% de las pacientes según IRS-score (IRS \leq 3) sin describir asociación significativa con las diferentes variables clínicas. Si revisamos las series de CM precoz observamos que en el subtipo HER2 alrededor del 20%-31% de los tumores presentan pérdida de expresión de PTEN (276,346,347). Jensen et al, publicó en el año 2012 una de las series más amplias con 240 CM tratados con quimioterapia adyuvante y TTZ, 24% de las pacientes presentaron una pérdida de expresión de PTEN determinado mediante H-score (Hscore \leq 40) (338). Otro de los trabajos publicados que estudiaron diferentes elementos de la vía PI3K/AKT y su capacidad predictiva y pronóstica en muestras de 43 pacientes con CM HER2 positivo tratados con QNA es la serie del Dr. Sueta. La determinación de la expresión de PTEN se realizó mediante H-score, siendo negativa en el 29% de los casos (340). El Dr. Nuciforo analizó de forma retrospectiva la

expresión de PTEN en 360 muestras del estudio fase III NeoALTTO de QNA combinada con terapia anti-HER2. Del global de las muestras la expresión de PTEN según H-score fue negativa en el 27%. La pérdida de PTEN fue más frecuentemente descrita en los tumores RH negativos respecto a los RH+ (33 vs 20%): La activación de la vía PI3K (definida como pérdida de PTEN o mutación en PI3KCA) se observó en el 47% de las muestras (276).

Referente al estudio inmuno-histoquímico de p-AKT, en nuestro trabajo se cuantificó con la técnica de H-score y fue positiva en el 45.2% de las muestras analizadas. Tomando como referencia la serie de muestras de CM metastásico HER2 positivo del Dr. Esteva, el 52.9% presentaba sobre-expresión de p-AKT según la determinación de H-score. El Dr. Rojo describió la expresión de p-AKT en 103 muestras de CM precoz, de las cuales el 23% eran HER2 positivo (210). P-AKT se encontraba sobre-expresado en el 46.6%, asociándose de forma significativa al subgrupo HER2 (test U de Mann-Whitney, $p < 0.001$) y a la afectación ganglionar ($p = 0.015$) de modo similar a nuestro trabajo. Si revisamos los trabajos con muestras tratadas con TTZ neoadyuvante se describió en la serie del Dr. Sueta que la sobre-expresión de p-AKT estaba descrita en el 70% de las muestras analizadas (340).

Son escasas las publicaciones que analizan la expresión de p-4EBP1. Por problemas técnicos, en nuestra revisión la determinación de p-4EBP1 únicamente se realizó en 35 muestras con un valor H-score negativo en 19 casos (54.3%). El primer estudio que evaluó la expresión de p-4EBP1 fue la revisión retrospectiva de 103 muestras de CM del Dr. Rojo (210). La expresión de p-4EBP1 determinada mediante H-score fue negativa en el 40.8% y se correlacionó con mayor grado histológico, tamaño tumoral y afectación ganglionar (test U de Mann-Whitney, $p < 0.001$; $p < 0.001$; $p = 0.02$ respectivamente). Otro de los estudios que analizó la expresión de p-4EBP1 en el marco del tratamiento neoadyuvante basado en antraciclinas, taxanos y TTZ es el fase 3 GeparQuattro (348). Se evaluó retrospectivamente la expresión de PTEN, p-4EBP1 y mutaciones en PI3KCA. De forma global, el 58.3% presentaron niveles bajos de p-

4EBP1. Cuando fue analizado como variable continua se asoció de forma significativa al estado del RH ($p=0.017$) y Ki67 ($p=0.008$).

Uno de los factores clave en la vía de señalización PI3K/AKT es la presencia de mutaciones en la unidad catalítica de PI3K y más concretamente en el exón 20. En nuestro trabajo la tasa de mutaciones fue del 23.9%. Las mutaciones más frecuentes se describieron en el exón 20 (H1047X) y con menor frecuencia en el exón 9 (E545X, E542K). Estos datos son altamente concordantes con las cifras derivadas de las publicaciones más recientes lo que valida los resultados generados en nuestro trabajo. Recientemente, se ha publicado una serie retrospectiva de 19.784 muestras de 40 tipos diferentes de tumores sólidos donde se revisó de forma centralizada la presencia de alteraciones en la vía PI3K/AKT. Para ello, se incluyeron distintas técnicas como secuenciación genómica masiva, inmuno-histoquímicas y FISH (349). La tasa de mutaciones fue del 13%, con un mayor porcentaje de mutaciones en aquellos tumores con sobre-expresión de HER2 (22% HER2+ vs 13% en HER2-; $p<0.001$). En las 2333 muestras de CM (se incluyeron diferentes subtipos histológicos) la tasa de mutaciones en PI3KCA fue del 31%, sin embargo, no se reflejaron los datos específicos según la expresión de HER2 y RH. En el estudio más importante para la caracterización genómica del cáncer, The Cancer Genome Atlas, de las 130 muestras de CM HER2 positivo analizadas se describió una tasa de mutaciones del 30% siendo excluyentes con la presencia de mutaciones en p53 (350). Si revisamos la bibliografía de pacientes con CM HER2 positivo, la cifras relacionadas con mutaciones de PI3KCA oscilan entre el 20-30% (232,246,346) y las más frecuentemente descritas afectan a los exones 9 y 20. De modo casi idéntico a nuestro trabajo, en la serie comentada de Esteva et al, la tasa de mutaciones en PI3KCA fue del 21.8%, siendo la más frecuente la mutación del exón 20 H1047X (265). En la serie de 240 CM tratadas con quimioterapia adyuvante y TTZ de Jensen et al, la tasa de mutaciones en los exones 9 y 20 de PI3KCA fue del 26% (338). Uno de los trabajos que incluyó mayor tamaño muestral es la revisión conjunta de los estudios neoadyuvantes del grupo alemán GeparQuattro, GeparQuinto y GeparSixto (258). En ella se revisaron

retrospectivamente 504 muestras de pacientes con CM HER2 positivo tratadas con QNA y terapia anti-HER2. De forma global, las mutaciones en la unidad catalítica de PI3K se describieron en el 21.4% de las muestras, siendo de nuevo la más frecuente la del exón 20. No se objetivó asociación entre los diferentes parámetros clínico-patológicos y el estado mutacional. En el grupo de tumores RH positivo (este subgrupo representaba el 57% del global de la muestra) la tasa de mutación fue del 21.6% y en las muestras RH negativas del 21.3% ($p=0.937$). De nuevo, en nuestra serie se describen resultados similares, la expresión de RH no se asoció con diferencias en la tasa de mutaciones, 24.3 en RH positivos y 23.3 en RH negativos ($p=0.925$). En el estudio fase III NeoALTTO se estudió el estado mutacional de PI3KCA en 355 muestras mediante genotipado basado en espectrometría de masas. La tasa de mutaciones fue del 23%, no existiendo diferencias según el estado del RH (23% en RH positivo, $n=169$ y 22% en RH negativo, $n=186$) (351). Otro de los análisis con mayor número de muestras de tumores HER2 es la revisión conjunta de 5 ensayos clínicos fase II-III basados en QNA con TTZ y/o L (GeparQuattro, GeparQuinto, GeparSixto, NeoALTTO, CHERLOB) (352). Con un total de 967 muestras y tras la determinación de mutaciones mediante el sistema de Genotipado Sequenom la tasa de mutaciones de PI3KCA fue del 21.7% no existiendo diferencias según la expresión de RH. Las mutaciones en el exón 20 duplicaron a las descritas en el exón 9.

Al contrario que en la cuantificación de la expresión de PTEN, p-AKT y p-4EBP1 donde los scores y los puntos de corte empleados son consistentes y concordantes entre la mayoría de estudios, en lo correspondiente a la determinación del TIL existen algunas diferencias. La técnica está muy estandarizada y se siguen las recomendaciones de las guías de trabajo de 2014 (315) siendo poco frecuentes la variabilidad intra-interobservador. Estas guías recomiendan la determinación del infiltrado linfocitario estromal como la técnica recomendada debido a su mayor evidencia científica. Sin embargo, el problema principal es conocer el punto de corte para definir a los subgrupos con TIL elevado, intermedio o bajo pudiendo oscilar los puntos de corte entre el 10-60%. En contraposición, a la hora de valorar su capacidad predictiva y

pronóstica se analiza el TIL como variable continua (incrementos del 10%) a pesar de su escasa aplicabilidad clínica. En nuestro análisis, en base a lo publicado por otros autores (315,353), se definió el punto de corte >10% para considerar el infiltrado linfocitario tumoral estromal como enriquecido. Así el TIL estromal estuvo enriquecido en el 17.4% de la muestra. La mayor población se encontraba en el rango del 5-10%, comprendiendo un 41.9% del total de la muestra. En el estudio fase II Neosphere, se analizó de forma retrospectiva el papel predictivo del TIL intratumoral y estromal en 243 muestras disponibles (58.3% de las pacientes incluidas en el estudio). Las pacientes con TIL bajo (TIL estromal o intratumoral <5%) representaron un 14% mientras que aquellas con TIL enriquecido ($\geq 50\%$) fueron el 17% (353). Si revisamos la literatura relacionada más reciente, en el estudio NeoALTTO se revisó el papel predictivo y pronóstico del TIL estromal. La mediana del nivel de TIL fue del 12.5%. El 39.9% presentaba niveles de TIL >10% (354). Cabe destacar la correlación entre la mediana del nivel de TIL y la expresión de los RH, donde los tumores RH negativos presentaron niveles más elevados (RH negativo: 12.5% (3.0%-35.0% y RH positivo 10% (5.0%-22.5%), $P=0.02$). Sin embargo, no se objetivaron diferencias según la edad del paciente al diagnóstico, la afectación ganglionar o presencia o no de mutaciones en PI3KCA. La Dra. Heppner realizó un estudio retrospectivo con 498 muestras de los estudios fase III neoadyuvantes GeparQuattro y GeparQuinto, basados en antraciclinas, taxanos y terapia anti-HER2, con el objetivo principal de evaluar el papel pronóstico y predictivo del TIL estromal enriquecido. Un total de 104 casos (20.9%) fueron clasificados como TIL enriquecido. Se objetivó un mayor TIL estromal en los tumores con afectación ganglionar, RH negativo y alto grado.

Una de los aspectos novedosos que ofrece el trabajo es el análisis de la expresión de las variables a estudio en la enfermedad residual. Sin embargo, debido al tamaño limitado de la muestra los resultados obtenidos no son concluyentes. Únicamente cabe destacar que en el 40% de las muestras se objetivó una pérdida de la amplificación del gen HER2. Estos datos junto a la presencia en la enfermedad residual de un mayor porcentaje de tumores RH+ (65% de las 40 muestras) y rasgos

característicos de esta población como la menor expresión de PTEN, p-AKT y menor infiltrado linfocitario estromal podrían generar la hipótesis de un posible cambio o persistencia de subtipo intrínseco. La evolución podría ser desde una población inicial mayoritariamente HER2 enriquecida que tras el tratamiento neoadyuvante persistiera en la enfermedad residual aquella población luminal más resistente a terapias anti-HER2 y quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos. En el estudio neoadyuvante fase II Cher-Lob, donde 121 pacientes fueron randomizados a recibir un esquema de QNA basado en antraciclinas, taxanos con TTZ, L o ambos, se revisó en 68 muestras disponibles de enfermedad residual tras QNA la expresión de PTEN, p-AKT y expresión de HER2. Se objetivó que el 15% de los pacientes presentaban una pérdida de expresión de HER2 así como una reducción significativa del 20% en la mediana de expresión de p-AKT ($p=0.0003$) (326). Este cambio de subtipo intrínseco tras el tratamiento neoadyuvante se ha descrito en algunos trabajos. En el estudio neoadyuvante CALGB 40601 basado en antraciclinas, taxanos en combinación con TTZ y/o L se realizó una revisión retrospectiva de subtipos intrínsecos en 265 biopsias diagnósticas y en las 81 muestras disponibles de enfermedad residual tras QNA (143). La biopsia diagnóstica se caracterizó por el subgrupo HER2 enriquecido como el más frecuente (31%), sin embargo, cuando se realizó la determinación del PAM50, el subgrupo predominante fue el subtipo luminal (49%).

El tratamiento neoadyuvante en pacientes con CM HER2 positivo es precisamente el paradigma de la terapia dirigida y el marco idóneo que ha permitido y permite el desarrollo de nuevas drogas con una valoración de su eficacia en un intervalo de tiempo precoz.

La búsqueda de factores predictivos de RCp y el conocimiento de mecanismos de resistencia a TTZ ha sido una constante en los últimos 5 años. A pesar de ello, no disponemos en la práctica clínica de factores predictivos de RCp que nos ayuden a identificar qué pacientes se beneficiaran del tratamiento y cuales serán resistentes, lo

que nos conduce en la actualidad a tratar de igual forma a la mayoría de pacientes HER2 positivas.

En nuestra experiencia hemos identificado algunos factores capaces de predecir RCp lo cual tendría un alto interés en el desarrollo de ensayos clínicos. Estos resultados podrían ser la base para generar ensayos clínicos con dos objetivos: la identificación de nuevos agentes para revertir resistencias o bien la selección de poblaciones que pudieran precisar de tratamientos menos agresivos. Todo ello con una clara ventaja, ya que todos los factores estudiados son fácilmente aplicables en la práctica clínica diaria.

Uno de los factores predictivos de RCp en población HER2 que mayor evidencia disponemos es la expresión de RH. En nuestra serie las pacientes con RH-, tanto RE como RP, se asociaron a una mayor tasa de RCp. En el análisis multivariante, la expresión de RH fue el único factor predictivo de RCp junto a la presencia de alteraciones conjuntas de PTEN y/o PI3KCA. La bibliografía disponible confirma de forma clara su papel predictivo. Desde los estudios preclínicos, donde se confirma en líneas celulares que la reactivación del RH es uno de los mecanismos de escape al bloqueo HER2 (355), hasta los estudios fase II-III de QNA en combinación con TTZ ha sido evidente la asociación con la RCp (134,142,145,339). Los estudios fase II-III en los que la expresión inmuno-histoquímica de los RH demuestra su papel como factor predictivo incluyen diferentes escenarios. Estudios como el fase III Z1041, cuyos resultados confirmaron el esquema de antraciclinas seguido de paclitaxel y TTZ como probablemente el tratamiento neoadyuvante estándar en la práctica clínica actual (hasta la incorporación de PTZ), confirmó las diferencias en la tasa de RCp entre la población RH- y RH+ (72.8% vs 45% respectivamente) (141). También en otro escenario como el fase III GeparQuinto que comparó un esquema basado en antraciclinas (EC x 4) seguido de docetaxel x 4 ciclos con TTZ o L (339). Tanto en el brazo de TTZ (RH- 39% vs RH+ 26%) como en el brazo de L (RH- 29% vs RH+ 16%), la tasa de RCp (definida como ypT0N0) fue superior en el subgrupo de RH-.

En cuanto a ensayos que compararon la combinación de agentes anti-HER2 y taxanos, el estudio fase III NeoALTTO, randomizó a 455 pacientes a recibir paclitaxel con TTZ, L o bien TTZ+L. De nuevo, las pacientes con RH-, independientemente del brazo de tratamiento, tuvieron mayores tasas de RCp definida como ypT0/isN0 (TTZ: RH- 36.5% vs RH+ 22.7%; L: RH- 33.8% vs RH+ 16.2%; TTZ+L RH- 61.3% vs RH+ 41.6%) (142). El segundo estudio, el fase II Neosphere con 417 pacientes, combinó docetaxel, con TTZ, PTZ o TTZ+PTZ y por último un cuarto brazo con TTZ+PTZ sin docetaxel (145). El incremento a favor del subgrupo RH- se mantuvo en todos los brazos de tratamiento, siendo más marcado en aquellas que recibieron docetaxel+TTZ+PTZ (TTZ: RH- 36.8% vs RH+20%; PTZ RH- 30% vs RH+ 17.4%; TTZ+PTZ RH-29.1% vs RH+ 5.9%; docetaxel+TTZ+PTZ RH- 63.2% vs RH+ 26%). El último escenario donde el estado de la expresión del RH demostró su asociación con la RCp fue el estudio fase II Tryphaena, donde 225 pacientes se randomizaron a tres brazos de tratamiento: FEC x 3 ciclos seguido de docetaxel x 3 ciclos combinado con TTZ+PTZ, un segundo brazo con el mismo esquema pero administrando TTZ+PTZ desde el inicio, y por último, carboplatino+docetaxel+TTZ+PTZ x 6 ciclos. En todos los brazos se objetivó una mayor tasa de RCp (ypT0) en el grupo RH- (brazo 1: RH- 65.0% vs RH+48.6%; brazo 2: RH- 79.4% vs RH+ 46.2%; brazo 3 RH- 83.8% vs 50%). En otras ocasiones, la determinación de la expresión del RH se realizó mediante técnicas diferentes a la inmunohistoquímica, como es la expresión de RNAm. En el estudio NeoALTTO, la expresión de ESR1 (receptor estrogénico) fue junto a la expresión de HER2 el factor predictivo más relevante en el análisis multivariante, por delante de firmas inmunes, grado genómico, expresión de AKT/mTOR y firmas estromales (p=0.008) (356).

Son varias las hipótesis que intentan justificar la diferencia mantenida a favor del subgrupo RH-. Como hemos comentado previamente de estudio preclínicos se deduce que el RE constituye una de las vías de escape a los tratamientos anti-HER2 (355). Otra de las posibles justificaciones, es la diferente composición de subtipos intrínsecos entre el grupo de RH+ y RH-. La Dra. Carey analizó esta cuestión en 365 biopsias diagnósticas del estudio fase III CALGB 40601 que comparó en el marco

neoadyuvante el tratamiento de paclitaxel y TTZ durante 16 semanas con o sin L. En el subgrupo RH+, la población HER2 enriquecida representó el 17% mientras que los subtipos Luminal A y B constituían el 82%. Sin embargo, en el grupo RH- la población HER2 enriquecida abarcaba el 51% (143).

La activación de la vía PI3K/AKT a través de la presencia de mutaciones de PI3KCA y la falta de expresión de PTEN tiene un papel crucial en los mecanismos de resistencia a terapias anti-HER2. Desde estudios preclínicos ha quedado confirmado que la pérdida de PTEN y/o mutaciones en PI3KCA contribuyen a la resistencia a TTZ (235,253,254). Por otro lado, el análisis combinado de la pérdida de expresión de PTEN y mutaciones de PI3KCA podría tener mayor capacidad predictiva y pronóstica respecto a su determinación de forma individual como demuestran análisis retrospectivos en enfermedad avanzada y estudios fase II-III neoadyuvantes (271,357,358) donde las pacientes que no presentan tumores con activación de la vía tienen mejores respuestas y pronóstico respecto aquellos con activación de la misma (208,235). En base a estos hallazgos se genera la hipótesis que la combinación de inhibidores de PI3K/AKT con terapias anti-HER2 podría revertir dichas resistencias a TTZ (359).

La pérdida de PTEN o las mutaciones de PI3KCA participan en la tumorigénesis a través principalmente de la activación de la quinasa AKT. Cuando analizamos otros eventos más tardíos en la vía como p-AKT o p-4EBP1, observamos que pacientes con pérdida de PTEN/activación p-AKT o pérdida de PTEN/inactivación de p-4EBP1 presentan peor pronóstico (207,210). Sin embargo, la determinación de p-AKT y p-4EBP1 de forma aislada carecen de capacidad predictiva (360,361) y pronóstica (207,271,326,348). Una posible explicación a este fenómeno es la posible capacidad de PI3K para promover la progresión tumoral a través de vías independientes de AKT (362).

La expresión de PTEN, mutaciones de PI3KCA y su determinación combinada en la biopsia diagnóstica son capaces de predecir RCp en nuestra experiencia, sin embargo,

únicamente la determinación combinada mantiene su capacidad predictiva en el análisis multivariante. De nuevo, como indica la literatura, la determinación aislada de p-AKT y p-4EBP1 carecen de capacidad predictiva.

La evidencia derivada de diferentes ensayos clínicos sobre la capacidad predictiva de la expresión de PTEN no es homogénea a pesar de existir una potente señal relacionando la ausencia de expresión de PTEN con menores tasas de RCp como se describe a continuación. El Dr. Sueta publicó una serie de 43 pacientes tratados con QNA basada en antraciclinas, taxanos y TTZ (340). Las pacientes con menor expresión de PTEN se asociaron a menores tasas de RCp respecto a las de mayor expresión (33% vs 72%; $p=0.034$). En el estudio de tratamiento neoadyuvante fase II TBCRC006, pacientes con CM HER2 recibieron 12 semanas de TTZ y L en combinación con hormonoterapia en el grupo de RH+ (358). La determinación de la expresión de PTEN por H-score se realizó en 59 pacientes, la tasa de RCp en pacientes con expresión alta de PTEN fue del 32% frente al 9% en el grupo de expresión baja ($p=0.04$). Otro de los trabajos retrospectivos que confirma el papel predictivo de la expresión de PTEN es el análisis de 181 muestras de pacientes que participaron en el estudio GeparQuattro (348). Las pacientes con PTEN bajo, determinado mediante IRS-score, se asociaron a tasas de RCp (ypT0N0) del 27.6% mientras que aquellas con IRS-score elevado fue del 57.1% ($p=0.010$). En el análisis multivariante ajustado por las características basales, la expresión de PTEN predijo de forma independiente la RCp (OR 7.54; IC 95%: 2.03-28.06; $p=0.003$). A diferencia de los trabajos previos, en los ensayos clínicos Tryphaena y Neo-ALTTO la expresión de PTEN no se asoció de forma significativa a la tasa de RCp (231,276). En el caso del estudio fase III NeoALTTO, se recogieron de forma prospectiva 429 muestras de la biopsia diagnóstica siendo válidas para el análisis 366 (276). Las pacientes con PTEN bajo, determinado mediante H-score, presentaron tasas de RCp del 33% frente al 32% de aquellas con PTEN elevado ($p=0.89$).

Múltiples estudios que investigaron el papel predictivo de las mutaciones de PI3KCA en pacientes tratadas con QNA y terapias anti-HER2 revelaron significativamente una menor tasa de RCp en el subgrupo de tumores con mutación de PI3KCA (258,351). En 355 muestras del estudio NeoALTTO cuyas características basales eran similares a las de la población global del estudio (52.4% RH positivos, T>5cm 40.3%, N+73.5%, tasa de RCp 31.4%) la tasa de mutaciones fue del 23%. Se evidenció una menor tasa de RCp en los tumores con mutación 21.3% vs no mutación 34.5% ($p=0.03$) independientemente de la expresión de RH. Por otra parte, las diferencias fueron más marcadas en el grupo que recibió TTZ y L en combinación (351). La capacidad predictiva del estado mutacional, junto con la expresión del RE y el tipo de tratamiento anti-HER2, se mantuvo en el análisis de regresión logística (OR 0.45; $p=0.015$). Estos resultados son concordantes con los descritos en el estudio fase III GeparSixto que combinó QNA con TTZ y L (352). Los tumores con mutación de PI3KCA tuvieron tasas de RCp significativamente menores respecto al grupo de no mutados (17.6% vs 36.8%, respectivamente; $p=0.015$). El estudio de mayor importancia es la revisión conjunta realizada por la Dra. Loibl de 5 estudios fase II-III con 967 pacientes tratadas con QNA basada en TTZ, L o la combinación de ambos. De forma global, la tasa de RCp (γ pT0N0) fue menor en el grupo de pacientes con mutación de PI3KCA (16.2% vs 29.6%, $p<0.001$). En el análisis por subgrupos las diferencias fueron más marcadas en los tumores RH+ y en el grupo de pacientes tratadas con TTZ + L.

Existen algunos estudios donde la capacidad predictiva de las mutaciones en PI3KCA no alcanza significación estadística (326,344). En el estudio fase II Cher-Lob, tras describir un 20.4% de mutaciones en los exones 9 y 20 en las 108 muestras analizadas, no se objetivaron diferencias significativas en la tasa de RCp (γ pT0isN0) según la presencia o no de las mismas (no mutación 33.7% vs mutación 22.7%; $p=0.323$). Los autores justificaron la falta de significación estadística al limitado tamaño muestral (326).

Como se ha comentado previamente, el análisis conjunto de PTEN/PI3KCA representa el factor predictivo de mayor potencia en nuestro trabajo. Del mismo modo, en la serie de Sueta (340), en el análisis multivariante la activación de la vía PI3K debido a mutación de PI3KCA o baja expresión de PTEN se correlacionó con peor respuesta a TTZ (OR 0.11; IC 95%, 0.03-0.48). En el estudio fase 2 TBCRC06 (358), la presencia de alteración en la vía PI3K se asoció a una menor tasa de RCp ($p=0.01$).

Otro factor con capacidad predictiva en nuestro análisis fue el TIL estromal, aunque en nuestra experiencia perdió su poder predictivo en el análisis multivariante. En la actualidad, existen gran cantidad de trabajos retrospectivos revisando la capacidad predictiva y pronóstica del TIL tanto en muestras de estudios fase II y III como Neosphere y NeoALTTO así como revisiones conjuntas de diferentes estudios randomizados de QNA y terapias anti-HER2. La mayoría de estos trabajos están realizados por la Dra. Loi o bien por miembros del grupo alemán German Breast Group (GBG), donde destacan la Dra. Loibl y el Dr. Denkert. Estas revisiones se caracterizan principalmente por analizar globalmente a todas las poblaciones linfocitarias que forma el TIL (a diferencia de algunos trabajos de tumores triple negativo (363) donde se analizan las poblaciones linfocitarias por separado) y por otro lado se estudia mayoritariamente el TIL a nivel del estroma frente al TIL intratumoral.

En el estudio Neosphere, se analizó en 243 muestras el TIL intratumoral y estromal definiendo tres grupos: CM de predominio linfocitario (TIL $\geq 50\%$ estromal o intratumoral), infiltrado linfocitario bajo (TIL $< 5\%$) y un grupo intermedio que incluiría el resto de casos (353). Estos tres grupos así como el TIL como variable continua se correlacionaron con la tasa de RCp (ypT0). No se evidenció asociación entre la RCp y el TIL como variable continua. Al igual que ocurrió en nuestro trabajo, el grupo de TIL bajo presentó una tasa de RCp menor (4.3%) respecto al grupo intermedio (26.9%) y predominio linfocitario (26.7%) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.018$). En este estudio, se revisaron junto al TIL, la expresión de la proteína PDL1 además de la expresión de RNAm de distintos inmuno-parámetros

(inmuno-genes e inmuno-metagenes). En el análisis multivariante, la expresión de PD1, MHC2 y STAT1 se asociaron mayores tasas de RCp, sin embargo, la expresión de PDL1 y MHC1 se correlacionaron a menores respuestas.

En el fase III NeoALTTO 387 muestras tumorales (85.1% de las pacientes incluidas en el estudio) fueron usadas para el análisis (315). Del mismo modo que en nuestra experiencia y el estudio Neosphere para el objetivo de RCp, niveles superiores de TIL del 5% se asociaron con tasas de RCp mayores independientemente del grupo de tratamiento (OR 2.60; IC 95%, 1.26-5.39; $p=0.01$).

Otro de los estudios en los que se describió la inmuno-genicidad del CM triple negativo y HER2 positivo fue el fase III GeparSixto (364), cuyo objetivo principal fue conocer si la incorporación de carboplatino a esquemas basados en antraciclinas y taxanos aumentaba la tasa de RCp (ypT0N0). Un total de 580 muestras diagnósticas fueron evaluadas para el estudio del TIL estromal. También se estudió la expresión de RNAm de factores inmuno-activadores (CXCL9, CCL5, CD8A, CD80, CXCL13, IGKC, CD21) así como inmuno-supresores (IDO1, PD-1, PD-L1, CTLA4, FOXP3) en 481 muestras tumorales. En el subgrupo HER2, el infiltrado linfocitario predominante se asoció a mayores tasas de RCp. Por otro lado los 12 factores inmunes se asociaron a mayores tasas de RCp siendo las mayores OR para PDL1 (OR 1.57, IC 95% 1.34-1.86; $p<0.001$) y CCL5 (OR 1.41, IC 95% 1.32-1.62; $p<0.001$). En la revisión conjunta realizada por la Dra. Heppner con 498 muestras de los estudios GeparQuattro y GeparQuinto (365), los resultados más destacables fueron que el grupo de CM con infiltrado linfocitario predominante presentó mayores tasas de RCp (ypT0N0) respecto al resto de la población y además tenía capacidad predictiva como variable continua. Estas diferencias se mantuvieron en el análisis univariante (infiltrado linfocitario dominante OR 2.02, $p=0.002$; TIL 10% OR 1.12, $p=0.002$;) y en el multivariante (infiltrado linfocitario dominante OR 1.87, $p=0.009$; 10% TIL OR 1.1, $p=0.014$;) La magnitud del efecto fue detectable en el grupo de pacientes tratadas con TTZ (infiltrado linfocitario dominante OR 2.08, $p=0.013$; 10%TILs: OR 1.12,

p=0.018) pero no en aquellas pacientes tratadas con L. Posiblemente, uno de los trabajos que mayor número de muestras ha revisado es el análisis conjunto de 5.514 pacientes de 8 ensayos clínicos randomizados, 4 de los cuales eran estudios de QNA (GeparTrio, GeparQuinto, GeparSixto y CherLob) (366). Se correlacionó el infiltrado linfocitario predominante con la tasa de RCp y la supervivencia. En los estudios neoadyuvantes, la presencia de infiltrado linfocitario predominante se asoció con incremento del 29.5% en la tasa de RCp respecto al resto de población ($p < 0.001$). Este beneficio se observó tanto en tumores triple negativos (incremento del 15.7%, IC 95% 4.9-26.2%) y en el grupo HER2 (incremento del 33.3%, IC 95% 23.6-42.7%).

Junto a los diferentes factores predictivos de RCp descritos en nuestro trabajo cabe destacar otras variables que han sido publicadas en diferentes publicaciones científicas.

Quizá uno de las plataformas con mayor evidencia predictiva es la firma genómica PAM50 y los subtipos intrínsecos (367). Destacamos la capacidad predictiva del subtipo HER2 enriquecido descrita en los estudios CALGB 40601(143) y NeoALTTO (356) que combinaron taxanos con TTZ y L. En el análisis multivariante del estudio NeoALTTO el subgrupo HER2 enriquecido junto con la expresión del RE fueron los factores con mayor capacidad predictiva. En el ensayo fase III del grupo CALGB, los tumores HER2 enriquecidos presentaron tasas de RCp del 70%, frente al 34% en tumores luminal A y 36% de tumores luminal B ($p = 0.01$). Según los autores, estos resultados deberán ser considerados a la hora de diseñar ensayos clínicos en un futuro.

Otro de los posibles factores, que de forma intensa, se ha revisado su capacidad predictiva de RCp es la expresión de la forma truncada de la proteína HER2, conocida como p95. Esta forma truncada se caracteriza por la pérdida del lugar del dominio de unión a TTZ y por estar sobre-expresada en el 30% de los CM HER2 positivo (221). Uno de los primeros estudios que demostraron en líneas celulares su capacidad

predictiva de respuesta a TTZ fue el trabajo de los Dres. Scaltriti y Rojo (217). Sin embargo, la falta de estandarización en su determinación inmuno-histoquímica, resultados negativos como los descritos en el estudio CherLob (326) e incluso trabajos como los análisis retrospectivos de los ensayos GeparQuattro y NeoALTO (368,369) en los que su elevada expresión se asoció a mayores tasas de RCp han hecho que su papel predictivo en el marco neoadyuvante haya sido descartado.

Por otra parte, aquellos tumores con niveles altos de amplificación de HER2 (>10 señales por núcleo) fueron asociados a una mayor probabilidad de RCp en pacientes tratadas con QNA y TTZ. Sin embargo, esta diferencia en RCp según los niveles altos de amplificación de HER2 no tuvo impacto pronóstico en términos de SLE y SG (370). Así mismo, niveles basales elevados de HER2 en suero de pacientes con CM HER2 positivo tratadas con esquemas de QNA basadas en antraciclinas, taxanos y TTZ, se han sido correlacionados con una mayores tasas de RCp ($p=0.045$) (371).

El último aspecto por comentar es la capacidad pronóstica de los diferentes factores a estudio. En este sentido, debido al limitado tamaño muestral y al escaso número de eventos no pueden establecerse claras conclusiones con los resultados obtenidos siendo únicamente generadores de hipótesis.

Las tasas de supervivencia descritas en nuestro estudio son ligeramente superiores a las descritas en estudios de adyuvancia y neoadyuvancia (73,76,130,142). Un claro ejemplo lo tenemos en el estudio NOAH (130), tras seis años de seguimiento la tasa de SLP a 5 años fue del 58% mientras que en nuestra experiencia fue del 83.4%. En consonancia con estas cifras, en nuestra experiencia tras un seguimiento de seis años el 87.3% de las pacientes permanecían libres de recidiva y el 79.1% no habían fallecido.

A pesar del escaso número de eventos, un dato que confirma la validez de nuestros resultados es la concordancia del impacto pronóstico de las variables clínicas de la

serie con los trabajos publicados de adyuvancia y neoadyuvancia (28,372,373). El menor tamaño tumoral al diagnóstico y el estadio clínico se asociaron significativamente a incrementos en la SLP y SG mientras que las pacientes menores de 50 años tuvieron mayores tasas de SG.

En el estudio adyuvante HERA, tras la actualización realizada a cuatro años de seguimiento se objetivó que la tasa de recidivas a cinco años fue superior en las pacientes con estadio clínico mayor (HR 0.54, IC 95% (0.43-0.69)) y menor edad (HR0.57, IC 95% 0.39-0.84) (73).

En nuestro estudio, el análisis de la RCp como factor pronóstico se correlacionó de forma significativa a la SLP. Sin embargo y posiblemente por el menor número de eventos no existió asociación significativa en la SG. La RCp es un factor pronóstico independiente asociado a un aumento de supervivencia tanto términos de SLP como SG. Varios estudios aleatorizados (125,374) así como distintos meta-análisis (94,375) establecen una correlación entre la obtención de RCp y un incremento en la SLP y SG. Y no solo en la población triple negativa, sino también en tumores HER2 positivos, especialmente en el subgrupo RH- tratados con QNA combinada con TTZ (94,130,184,375).

En el CM HER2 positivo, el reciente meta-análisis de Cortazar ha demostrado una asociación de la RCp y la supervivencia independientemente del estado del RH (SLE: HR, 0.39; SG: HR, 0.34), con una mayor asociación en el grupo de RH- (SLE: HR, 0.25; SG: HR, 0.19) (94). De este modo, los ensayos clínicos neoadyuvantes han sido propuestos como marco ideal para testar hipótesis biológicas en el CM precoz HER2 positivo.

A pesar de tener sus limitaciones, la RCp es hoy por hoy, el marcador precoz de eficacia o marcador subrogado de supervivencia más utilizado y establecido en el tratamiento neoadyuvante, siendo la definición de ausencia de tumor invasivo en

mama y ganglios linfáticos (ypT0/is ypN0) la más recomendada y aceptada (94,376). Como se ha comentado anteriormente, en base a este concepto se ha desarrollado tanto por parte de la FDA como de la EMA la aprobación acelerada de aquellos fármacos que incrementen de forma significativa la tasa de RCp (377).

Sin embargo, la RCp tiene sus limitaciones. Hasta hace poco tiempo, no existía una definición universal de RCp, utilizándose diferentes escalas de valoración de respuesta patológica como la de Chevallier, Miller y Payne, la clasificación de Fisher y la de Symmans (154,155,378,379), dificultando la comparación de resultados entre los diferentes estudios. Por otro lado, la incorporación de nuevos agentes a la neoadyuvancia, como son los taxanos, que incrementan la tasa de RCp no se ha traducido en un aumento significativo en la supervivencia (125). Asimismo, no todas las pacientes que consigan una RCp estarán libres de recurrencia ni todas aquellas que no la alcancen tendrán mal pronóstico. Es necesario encontrar marcadores de eficacia más precisos para identificar qué pacientes sí se benefician de un determinado régimen de quimioterapia y por otro lado, evitar toxicidades innecesarias.

En el análisis de regresión logística multivariante en relación a la SLP, el factor que mantuvo su capacidad pronóstica fue la activación de la vía PI3K. Del mismo modo, en la serie del Dr. Esteva de 137 pacientes con CMM HER2 positivo se observó que las pacientes con alteración de la vía PI3K (ausencia expresión PTEN / mutación PI3K) tuvieron una supervivencia significativamente más reducida ($p=0.023$) (271). En la serie de Jensen de 240 CM HER2 tratados con antraciclinas y TTZ adyuvante, las pacientes con mutación en PI3KCA o alteración de la vía PI3K presentaron un peor pronóstico en el análisis multivariante (HR2.14, IC 95% 1.01-4.51, $p=0.046$ y HR 2.35, IC 95% 1.10-5.04, $p=0.03$, respectivamente) (346).

El meta-análisis del Dr. Wang incluyó diez estudios y 1889 casos de CM HER2 tratados con TTZ en neo-adyuvancia o enfermedad avanzada en los que se estudió el papel

predictivo y pronóstico de PTEN (255). En el grupo de CM avanzado, la pérdida de PTEN se asoció a un peor pronóstico (RR=0.682, IC 95% 0.550-0.846, $p<.0001$). Otro de los estudios en enfermedad avanzada que confirma el poder pronóstico de PTEN es el trabajo retrospectivo del Dr. Fabi donde las pacientes con sobre-expresión de PTEN según IRS-score se asociaron a mayores tasas de SLP a 12 meses (43.2% vs 27.6% $p=0.06$) sin impactar en la SG.

En el estudio NeoALTTO, la presencia de mutaciones de PI3KCA se asociaron a peor pronóstico, tanto en términos de SLP como de SG determinado mediante modelo de Cox (SLE: HR 0.78; IC 95%, 0.38-1.36; $p=0.38$; SG: 0.50; IC 95%, 0.19-1.23; $p=0.14$) aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (351). La expresión de PTEN en este estudio no fue un factor pronóstico de supervivencia (276).

En la revisión conjunta de la Dra. Loibl de 5 estudios neoadyuvantes (352), tras un seguimiento de 47 meses, no hubo diferencias significativas en la SLE (HR 1.07; IC 95%, 0.76-1.50, $p=0.691$). En las pacientes con tumores RH+, la presencia de mutaciones en PI3KCA se asoció a peor pronóstico (HR 1.56; IC 95% 1.00-2.45; $p=0.0502$).

En el marco adyuvante, uno de los pocos estudios que no demostró la asociación entre el estado de PI3KCA y el pronóstico fue el ensayo fase 3 FinHER, donde las pacientes eran randomizadas a recibir 9 semanas de TTZ o no. Sin embargo, hay que destacar que el tamaño muestral era escaso, 157 pacientes de las cuales 34 (19.3%) presentaron mutación de PI3KCA (262).

En conclusión, el papel pronóstico de las mutaciones de PI3KCA y la expresión de PTEN es controvertido, debido a que la evidencia científica disponible es escasa y el número de eventos incluido en la mayoría de revisiones es muy bajo.

En cuanto al TIL y su papel pronóstico son múltiples los trabajos que revisan este aspecto, tanto en la población triple negativa (321), donde existe mayor evidencia, como en la HER2 positiva. En el ensayo NeoALTTO, con una mediana de seguimiento de 3.77 (3.50-4.22) años, por cada incremento del 1% en el TIL se asoció con una reducción del 3% en la tasa de eventos (OR 0.97; IC 95%,0.95-0.99; p=0.002) en todos los grupos de tratamiento (315).

En la revisión conjunta de la Dra. Heppner (365), el infiltrado linfocitario dominante y el TIL como variable continua no se asociaron de forma significativa a incrementos en la SLE (p=0.231). Se identificó un subgrupo de buen pronóstico al combinar RCp y el infiltrado linfocitario dominante (p=0.039). Por otro lado, el TIL tuvo una mayor relevancia pronóstica que incluso la RCp en el subgrupo de RH+ (HR 2.8, IC 95% 0.987-7.909; p=0.053), mientras que en el grupo de RH- se invirtió el orden a favor de la RCp (HR 2.49, IC 95 % 1.422-4.363; p=0.001. Estos datos según los autores, confirmarían que el subgrupo RH- es totalmente diferente al RH+.

En dos estudios de adyuvancia se confirmó la capacidad pronóstica del TIL. El primero de ellos es el estudio FinHER, en las 209 muestras de pacientes con CM HER2 tratadas con TTZ cada incremento del 10% en el TIL estromal se asoció a una reducción del 23% en el riesgo de recidiva (SLED p=0.025), debido al escaso número de eventos no se evidenció asociación con la SG (321).

El segundo estudio adyuvante es el N9831, donde tras una mediana de seguimiento de 4.4 años se analizó la asociación del TIL estromal con la SLR en 945 muestras de pacientes. En este caso, en contra de lo descrito en otros trabajos, el TIL estromal no se asoció a un incremento en la SLR en las pacientes tratadas con TTZ (380).

En el análisis conjunto de 8 ensayos clínicos randomizados de la Dra. Carbognin (366), respecto a los 4 estudios adyuvantes, se objetivó que el TIL como variable continua se

asoció significativamente a con mayores tasas de SG en el subgrupo de tumores HER2 ($p=0.0025$) y triple negativo ($p<0.001$).

A modo de resumen, nuestro estudio es uno de los primeros trabajos que demuestran de forma conjunta la importancia pronóstica y predictiva de la respuesta inmune y el estado de activación de la vía PI3K/AKT en un población de pacientes con CM precoz HER2 positivo tratados de forma uniforme con un similar esquema de tratamiento. Una de las fortalezas de nuestro estudio es que el tratamiento recibido en todas las pacientes de la muestra es homogéneo, existe uniformidad en el tratamiento sistémico neoadyuvante y adyuvante así como la radioterapia adyuvante, ya que elimina potenciales diferencias relativas al empleo de distintos regímenes de tratamiento.

Sin embargo, una de las limitaciones del estudio es el número de pacientes analizados. Este factor limita el análisis de subpoblaciones debido a la reducción numérica de éstas. Por otra parte, si añadimos al volumen de la muestra el escaso número de eventos podría justificar la falta de significancia estadística en términos de SG a diferencia de lo observado en la tasa de RCp y SLP. A pesar de la falta de significación estadística, los resultados obtenidos llevan la dirección esperada de acuerdo con las hipótesis y resultados de otros trabajos. Por tanto, es necesario una validación de estos datos en una serie con tamaño muestral mayor.

Los resultados generados en nuestro estudio y los publicados previamente han permitido el desarrollo de nuevos ensayos clínicos buscando revertir resistencias a PI3K como el estudio fase II randomizado Neophoebe (NCT01816594) que comparará en el marco de la neoadyuvancia dos ramas de tratamiento con paclitaxel + TTZ +/- BKM 120 (pan-inhibidor de PI3K).

También estudios en enfermedad avanzada con inhibidores específicos de la unidad catalítica de PI3K como alpelisib (NCT02038010) y taselisib NCT02390427 en combinación con diferentes agentes anti-HER2.

En cuanto a agentes inmunoterápicos que actúan sobre PD1 y PDL1 existen algunos estudios en enfermedad avanzada, como el estudio fase II que combina el agente anti-PDL1 atezolizumab y T-DM1 (NCT02924883).

6. Conclusiones

Considerando los resultados del siguiente estudio podemos obtener las siguientes conclusiones:

1. La población incluida en nuestro análisis presenta características clínico-patológicas (edad, tamaño tumoral, estadio clínico, expresión de receptores hormonales) similares a la de estudios fase III en población HER2 positiva tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, taxanos y TTZ.

2. La expresión de PTEN (ausencia de expresión en el 32.1% según IRS-score y 29.8% con H-score), p-AKT (sobre-expresado en el 54.8% de las pacientes), p-4EBP1 (ausencia de expresión en el 54.3% de las muestras) y la tasa de mutaciones en PI3KCA (23.9% siendo la más frecuente la del exón 20) así como el infiltrado linfocitario estromal (elevado en el 17.4% de las pacientes) determinado en la biopsia diagnóstica es comparable a las publicaciones científicas relacionadas.

3. La tasa de RCp alcanzada del 53.5% es equivalente a la descrita en los estudios de quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, taxanos y terapia anti-HER2.

4. La ausencia de expresión de RH- (tanto RE- como RP-) y la presencia de TIL >10% (infiltrado bajo tasa de RCp 47.9% vs alto 80%; $p=0.023$) se asociaron de forma significativa a mayores tasas de RCp.

5. La ausencia de expresión de PTEN y mutaciones en PI3KCA, tanto de forma individual como combinada se correlacionó con menores tasas de RCp (mutación de PI3KCA y/o ausencia expresión de PTEN RCp 12.5% vs no alteración PTEN/PI3KCA 79.2%; $p<.0001$).

6. En el análisis de regresión logística multivariante mantuvieron su capacidad predictiva de RCp la expresión de RH y la presencia de mutaciones de PI3KCA y/o ausencia de expresión de PTEN.

7. La identificación de estos factores predictivos de respuesta completa patológica tiene un alto interés en el desarrollo de ensayos clínicos con dos objetivos: identificar nuevos agentes para revertir resistencias y seleccionar poblaciones de pacientes que necesitaran tratamientos menos agresivos.

8. En la población con enfermedad residual se observaron rasgos característicos del subtipo luminal (reducción absoluta del 20% en la expresión PTEN y p-AKT) y un alto porcentaje de pérdida, hasta en el 40% de las pacientes, en la amplificación del gen HER2.

9. Tras un seguimiento de 75.85 meses la supervivencia libre de progresión fue del 83.4% y la supervivencia global del 91.7% lo que refleja el escaso número de recidivas descrito en nuestro trabajo.

10. Entre los factores que se asociaron a aumentos significativos en la supervivencia libre de progresión en el análisis univariante destacamos el menor tamaño y estadio clínico, la obtención de RCp, la expresión elevada de PTEN, la ausencia de mutaciones en la unidad catalítica de PI3K y activación en la vía PI3K. En el análisis multivariante mantuvieron la capacidad pronóstica el tamaño tumoral al diagnóstico y la activación de la vía PI3K.

11. En el análisis univariante se asociaron significativamente con la supervivencia global variables clínicas como la edad al diagnóstico, el tamaño y estadio clínico mientras que ninguna de las variables a estudio se correlacionó con incrementos en la supervivencia global. Ningún factor mantuvo la capacidad pronóstica en el análisis multivariante probablemente debido al escaso número de eventos.

7. Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [Internet]. (Consultado 10 Septiembre de 2016). Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2016. Soc Española Oncol Médica, 2016;1–24.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer*, 2015;136(5):E359-86.
4. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2012;62(1):10–29.
5. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*, 2007;356(16):1670–4.
6. López-Abente G, Mispireta S, Pollán M. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological features in mortality trends in Spain. *BMC Cancer*, 2014;14:874.
7. Sant M, Chirlaque Lopez MD, Agresti R, Sánchez Pérez MJ, Holleccek B, Bielska-Lasota M, et al. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999-2007: results of the EUROCORE-5 study. *Eur J Cancer*, 2015.
8. Martín M, Mahillo E, Llombart-Cussac A, Lluch A, Munarriz B, Pastor M, 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):508–18.
9. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2008;107(3):309–30.
10. Jimeno A, Amador ML, González-Cortijo L, Tornamira MV, Ropero S, Valentín V, et al. Initially metastatic breast carcinoma has a distinct disease pattern but an equivalent outcome compared with recurrent metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 2004;100(9):1833–42.
11. Singletary K, Gapstur S. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*, 2001;286(17):2143–51.
12. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*, 2002;87(11):1234–45.
13. Majed B, Moreau T, Senouci K, Salmon RJ, Fourquet A, Asselain B. Is obesity an independent prognosis factor in woman breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*, 2008;111(2):329–42.
14. Friedenreich C, Cust A. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *Br J Sport Med*, 2008;42(8):636–47.

15. Kyu HH, Bachman VF, Alexander LT, Mumford JE, Afshin A, Estep K, et al. Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *BMJ*, 2016;354:i3857.
16. Dossus L, Boutron-Ruault M, Kaaks R, Gram IT, Vilier A, Fervers B, et al. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*, 2014;134(8):1871–88.
17. Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, Bernstein JL, Malhotra J, Novetsky Friedman D, et al. Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *J Clin Oncol*, 2014;32(21):2217–23.
18. Said S, Visscher D, Nassar A, Frank RD, Vierkant RA, Frost MH, et al. Flat epithelial atypia and risk of breast cancer: A Mayo cohort study. *Cancer*, 2015;121(10):1548–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25639678>
19. Pollán M, Ascunce N, Ederra M, Murillo A, Erdozain N, Alés-Martínez J, et al. Mammographic density and risk of breast cancer according to tumor characteristics and mode of detection: a Spanish population-based case-control study. *Breast Cancer Res*, 2013;15(1):R9.
20. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 1994;139(8):819–35.
21. Bernstein L, Ross R. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, 1993;15(1):48–65.
22. Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ, Berrino F, Peeters PHM, Biessy C, et al. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer*, 2005;12(4):1071–82.
23. La Vecchia C, Decarli A, Fasoli M, Franceschi S, Gentile A, Negri E, et al. Oral contraceptives and cancers of the breast and of the female genital tract. Interim results from a case-control study. *Br J Cancer*, 1986;54(2):311–7.
24. Sant M, Eurocare Working Group. Differences in stage and therapy for breast cancer across Europe. *Int J Cancer*, 2001;93(6):894–901.
25. Li CI MK, Daling JR. Differences in breast cancer stage, treatment, and survival by race and ethnicity. *Arch Intern Med*, 2003;163(1):49–56.
26. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000;100(1):57–70.
27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 2011;144(5):646–74.
28. Albain K, Allred D, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1994;(16):35–42.
29. Johnson H, Masood S, Belluco C, Abou-Azama AM, Dee S, Kahn L, et al. Prognostic factors in node-negative breast cancer. *Arch Surg*, 1992;127(12):1386–91.
30. Rowlings P, Williams S, Antman KH, Fields KK, Fay JW, Reed E, et al. Factors

- correlated with progression-free survival after high-dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer. *JAMA*, 1999;282(14):1335–43.
31. Maynard P, Davies C, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Griffiths K. Relationship between oestrogen-receptor content and histological grade in human primary breast tumours. *Br J Cancer*, 1978;38(6):745–8.
 32. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Sci*, 1989;244(4905):707–12.
 33. Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn H-P. Invasive breast cancer: the current WHO classification. *Pathologe*, 2014;35(1):7–17.
 34. Virnig B, Tuttle T, Shamliyan T, Kane RL. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. *J Natl Cancer Inst*, 2010;102(3):170–8.
 35. Zengel B, Yararbas U, Duran A, Uslu A, Eliyatkin N, Demirkiran MA, et al. Comparison of the clinicopathological features of invasive ductal, invasive lobular, and mixed (invasive ductal + invasive lobular) carcinoma of the breast. *Breast cancer*, 2015;22(4):374–81.
 36. O'Malley F. Lobular neoplasia: morphology, biological potential and management in core biopsies. *Mod Pathol*, 2010;23 Suppl 2:S14-25.
 37. du Toit R, Locker A, Ellis IO, Elston CW, Nicholson RI, Blamey RW. Invasive lobular carcinomas of the breast--the prognosis of histopathological subtypes. *Br J Cancer*, 1989;60(4):605–9.
 38. Ross J. Multigene classifiers, prognostic factors, and predictors of breast cancer clinical outcome. *Adv Anat Pathol*, 2009;16(4):204–15.
 39. Stewart J, King R, Sexton SA, Millis RR, Rubens RD, Hayward JL. Oestrogen receptors, sites of metastatic disease and survival in recurrent breast cancer. *Eur J Cancer*, 1981;17(4):449–53.
 40. Bardou V, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*, 2003;21(10):1973–9.
 41. Barnes D, Bartkova J, Camplejohn RS, Gullick WJ, Smith PJ, Millis RR. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein: why does this occur more frequently in ductal carcinoma in situ than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance? *Eur J Cancer* 1992;28(2–3):644–8.
 42. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004;4(5):361–70.
 43. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D. The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology*, 2001;61 Suppl 2:73–82.
 44. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Sci*, 1987;235(4785):177–82.
 45. Cheang M, Chia S, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2

- status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009;101(10):736–50.
46. Perou C, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000;406(6797):747–52.
 47. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*, 2009;20(4):628–35.
 48. 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):1471–4.
 49. Veronesi U, Banfi A, Del Vecchio M, Saccozzi R, Clemente C, Greco M, et al. Comparison of Halsted mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in early breast cancer: long-term results. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1986;22(9):1085–9.
 50. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 1995;333(22):1456–61.
 51. Blichert-Toft M, Rose C, Andersen JA, Overgaard M, Axelsson CK, Andersen KW, et al. Danish randomized trial comparing breast conservation therapy with mastectomy: six years of life-table analysis. Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1992;(11):19–25.
 52. van Dongen JA, Voogd AC, Fentiman IS, Legrand C, Sylvester RJ, Tong D, et al. Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial. *J Natl Cancer Inst*, 2000;92(14):1143–50.
 53. Jacobson JA, Danforth DN, Cowan KH, d'Angelo T, Steinberg SM, Pierce L, et al. Ten-year results of a comparison of conservation with mastectomy in the treatment of stage I and II breast cancer. *N Engl J Med*, 1995;332(14):907–11.
 54. Arriagada R, Lê M, Rochard F, Contesso G. Conservative treatment versus mastectomy in early breast cancer: patterns of failure with 15 years of follow-up data. Institut Gustave-Roussy Breast Cancer Group. *J Clin Oncol*, 1996;14(5):1558–64.
 55. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*, 2003;349(6):546–53.
 56. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res*, 2009;15(8):2879–84.
 57. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, 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):426-32-3.
58. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, 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):1233–41.
 59. Fisher B, Jeong J, Anderson S, Bryant J, Fisher E, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med*, 2002;347(8):567–75.
 60. Onitilo AA, Engel JM, Stankowski R V, Doi SAR. Survival Comparisons for Breast Conserving Surgery and Mastectomy Revisited: Community Experience and the Role of Radiation Therapy. *Clin Med Res*, 2015;13(2):65–73.
 61. Guinot J, Tortajada M, Carrascosa M, Crispín V, Otero A, Ríos B, et al. Ten-year results of a phase II study with a single fraction of high-dose-rate brachytherapy (FAST-boost) after whole breast irradiation in invasive breast carcinoma. *Clin Transl Oncol*, 2012;14(2):109–15.
 62. Ragaz J, Jackson S, Le N, Plenderleith IH, Spinelli JJ, Basco VE, et al. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in node-positive premenopausal women with breast cancer. *New Engl J Med*, 1997;337(14):956–62.
 63. Recht A, Edge S, Solin L, Robinson D, Estabrook A, Fine R, et al. Postmastectomy radiotherapy: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*, 2001;19(5):1539–69.
 64. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005;366(9503):2087–106.
 65. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med*, 1995;332(14):901–6.
 66. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, Bowman D, Wolmark N, Wickerham DL KC. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from t. *J Clin Oncol*. 1990;8(9):1483–96.
 67. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, et al. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: A . *Ann Oncol*. 2003;14(6):833–42.
 68. Mamounas E, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant

- chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol*, 2005;23(16):3686–96.
69. Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, Alba E, Calvo L, Ruiz-Borrego M, et al. Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2008;100(11):805–14.
 70. Martín M, Seguí M, Antón A, Ruiz A, Ramos M, Adrover E, et al. Adjuvant docetaxel for high-risk, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 2010;363(23):2200–10.
 71. Jones S, Savin M, Holmes F, O’Shaughnessy J, Blum J, Vukelja S, et al. Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006;24(34):5381–7.
 72. Sparano J, Wang M, Martino S, Jones V, Perez E, Saphner T, et al. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 2008;358(16):1663–71.
 73. Piccart-Gebhart M, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl j M*, 2005;353(16):1659–72.
 74. Romond E, Perez E, Bryant J, Suman V, Geyer C, Davidson N, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005;353(16):1673–84.
 75. Joensuu H, Bono P, Kataja V, Alanko T, Kokko R, Asola R, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol*, 2009;27(34):5685–92.
 76. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl j Med*, 2011;365(14):1273–83.
 77. Controlled trial of tamoxifen as a single adjuvant agent in the management of early breast cancer. “Nolvadex” Adjuvant Trial Organisation. *Brr J Cancer* [Internet]. 1988 Jun [cited 2016 Oct 8];57(6):608–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2900647>
 78. Fisher B, Jeong J, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, et al. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet*, 2016;364(9437):858–68.
 79. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* ,2011;378(9793):771–84.
 80. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, 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):805–16.
81. Smith I, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*, 2003;348(24):2431–42.
 82. Miller W, Bartlett J, Brodie A, Brueggemeier R, di Salle E, Lønning P, et al. Aromatase inhibitors: are there differences between steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors and do they matter? *Oncologist*, 2008;13(8):829–37.
 83. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes J, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 2010;365(9453):60–2.
 84. Regan M, Neven P, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Ejlertsen B, Mauriac L, et al. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up. *Lancet Oncol*, 2011;12(12):1101–8.
 85. Coombes R, Hall E, Gibson L, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*, 2004;350(11):1081–92.
 86. Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, Eidtmann H, Gademann G, Zuna I, et al. Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study. *J Clin Oncol*, 2007;25(19):2664–70.
 87. Goss P, Ingle J, Martino S, Robert N, Muss H, Piccart M, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*, 2003;349(19):1793–802.
 88. Shenkier T, Weir L, Levine M, Olivetto I, Whelan T, Reyno L, et al. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 15. Treatment for women with stage III or locally advanced breast cancer. *CMAJ*, 2004;170(6):983–94.
 89. De Lena M, Zucali R, Viganotti G, Valagussa P, Bonadonna G. Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced (T3b-T4) breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1978;1(1):53–9.
 90. Hortobagyi G, Blumenschein G, Spanos W, Montague E, Buzdar A, Yap H, et al. Multimodal treatment of locoregionally advanced breast cancer. *Cancer*, 1983;51(5):763–8.
 91. 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.
 92. Buchholz T, Hunt K, Whitman G, Sahin A, Hortobagyi G. Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: multidisciplinary considerations of benefits and risks. *Cancer*, 2003;98(6):1150–60.

93. Ueno N, Buzdar A, Singletary S, Ames F, McNeese M, Holmes F, et al. Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1997;40(4):321–9.
94. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino J, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*, 2014;384(9938):164–72.
95. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear H, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol*, 2007;18(12):1927–34.
96. Luini A, Zurrida S, Galimberti V, Paganelli G. Radioguided surgery of occult breast lesions. *Eur J Cancer*, 1998;34(1):204–5.
97. Moran M, Schnitt S, Giuliano A, Harris J, Khan S, Horton J, et al. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2014;32(14):1507–15.
98. Houssami N, Turner R, Macaskill P, Turnbull L, McCready D, Tuttle TM, et al. An individual person data meta-analysis of preoperative magnetic resonance imaging and breast cancer recurrence. *J Clin Oncol*, 2014;32(5):392–401.
99. Loibl S, von Minckwitz G, Raab G, Blohmer J, Dan Costa S, Gerber B, et al. Surgical procedures after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer: results of the GEPARUO trial. *Ann Surg Oncol*, 2006;13(11):1434–42.
100. Coutant C, Jankowski C, Portha H, Barranger E. Assessment of sentinel lymph node biopsy in patients receiving neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: before or after?. *Gynecol Obs Fertil*, 2016;44(6):345–9.
101. Mamounas E, Brown A, Anderson S, Smith R, Julian T, Miller B, et al. Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*, 2005;23(12):2694–702.
102. Xing Y, Foy M, Cox D, Kuerer H, Hunt K, Cormier J. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy after preoperative chemotherapy in patients with breast cancer. *Br J Surg*, 2006;93(5):539–46.
103. El Hage Chehade H, Headon H, Kasem A, Mokbel K. Refining the Performance of Sentinel Lymph Node Biopsy Post-neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Pathologically Proven Pre-treatment Node-positive Breast Cancer: An Update for Clinical Practice. *Anticancer Res*, 2016;36(4):1461–71.
104. Boughey J, Suman V, Mittendorf E, Ahrendt G, Wilke L, Taback B, et al. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial. *JAMA*, 2013;310(14):1455–61.
105. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M, Helms G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after

- neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol*, 2013;14(7):609–18.
106. Garg AK, Buchholz T. Influence of neoadjuvant chemotherapy on radiotherapy for breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2015;22(5):1434–40.
 107. Daveau C, Stevens D, Brain E, Berges O, Villette S, Moisson P, et al. Is regional lymph node irradiation necessary in stage II to III breast cancer patients with negative pathologic node status after neoadjuvant chemotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010;78(2):337–42.
 108. Hoffman K, Mittendorf E, Buchholz T. Optimising radiation treatment decisions for patients who receive neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. *Lancet Oncol*, 2012;13(6):e270-6.
 109. Le Scodan R, Selz J, Stevens D, Bollet M, de la Lande B, Daveau C, et al. Radiotherapy for stage II and stage III breast cancer patients with negative lymph nodes after preoperative chemotherapy and mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012;82(1):e1-7.
 110. Chapman C, Jagsi R. Postmastectomy Radiotherapy After Neoadjuvant Chemotherapy: A Review of the Evidence. *Oncology*, 2015;29(9):657–66.
 111. Buchholz T, Katz A, Strom E, McNeese M, Perkins G, Hortobagyi G, et al. Pathologic tumor size and lymph node status predict for different rates of locoregional recurrence after mastectomy for breast cancer patients treated with neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002;53(4):880–8.
 112. Bonadonna G. Evolving concepts in the systemic adjuvant treatment of breast cancer. *Cancer Res*, 1992;52(8):2127–37.
 113. Gunduz N, Fisher B, Saffer E. Effect of surgical removal on the growth and kinetics of residual tumor. *Cancer Res*, 1979;39(10):3861–5.
 114. Fisher B, Gunduz N, Saffer E. Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Res*, 1983;43(4):1488–92.
 115. Bonadonna G, Valagussa P, Zucali R, Salvadori B. Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer. *CA Cancer J Clin*, 1996;45(4):227–43.
 116. Kuerer H, Newman L, Buzdar A, Hunt K, Dhingra K, Buchholz T, et al. Residual metastatic axillary lymph nodes following neoadjuvant chemotherapy predict disease-free survival in patients with locally advanced breast cancer. *Am J Surg*, 1998;176(6):502–9.
 117. van der Hage J, van de Velde C, Julien J, 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):4224–37.
 118. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2005;97(3):188–94.
 119. Mieog J, van der Hage J, van de Velde C. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*,

- 2007;(2):CD005002.
120. Avril A, Faucher A, Bussièrès E, Stöckle E, Durand M, Mauriac L, et al. Results of 10 years of a randomized trial of neoadjuvant chemotherapy in breast cancers larger than 3 cm. *Chirurgie*, 1998;123(3):247–56.
 121. Mauriac L, MacGrogan G, Avril A, Durand M, Floquet A, Debled M, et al. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast carcinoma larger than 3 cm: a unicentre randomized trial with a 124-month median follow-up. Institut Bergonié Bordeaux Groupe Sein (IBBGS). *Ann Oncol*, 1999;10(1):47–52.
 122. Guarneri V, Frassoldati A, Giovannelli S, Borghi F, Conte P. Primary systemic therapy for operable breast cancer: a review of clinical trials and perspectives. *Cancer Lett*, 2007;248(2):175–85.
 123. Evans T, Yellowlees A, Foster E, Earl H, Cameron D, Hutcheon A, et al. Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: an anglo-celtic cooperative oncology group study. *J Clin Oncol*, 2005;23(13):2988–95.
 124. Steger G, Galid A, Gnant M, Mlineritsch B, Lang A, Tausch C, et al. Pathologic complete response with six compared with three cycles of neoadjuvant epirubicin plus docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor in operable breast cancer: results of ABCSG-14. *J Clin Oncol*, 2007;25(15):2012–8.
 125. Bear H, Anderson S, Smith R, Geyer C, Mamounas E, Fisher B, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*, 2006;24(13):2019–27.
 126. von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schütte M, Hilfrich J, Blohmer J, et al. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol*, 2005;23(12):2676–85.
 127. Green M, Buzdar A, Smith T, Ibrahim N, Valero V, Rosales M, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol*, 2005;23(25):5983–92.
 128. Buzdar A, Ibrahim N, Francis D, Booser D, Thomas E, Theriault R, 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):3676–85.
 129. Pernas S, Gil-Gil M, de Olza M, Gumà A, Climent F, Petit A, et al. 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(3):1161–8.
 130. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S,

- Zambetti M, Vazquez F, Byakhow M, Lichinitser M, Climent MA, Ciruelos E, Ojeda B, Mansutti M, Bozhok A, Baronio R, Feyereislova A, Barton C, Valagussa P BJ. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus Neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER-2 positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomized controlled superiority trial with a parallel HE. *Lancet*, 2010;375(9712):377–84.
131. Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK, Francis D, Broglio KR, Theriault RL, Pusztai L GM. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2–positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study. *Clin Cancer Res*, 2007;13(1):228–33.
 132. Coudert B, Arnould L, Moreau L, Chollet P, Weber B, Vanlemmens L, et al. Pre-operative systemic (neo-adjuvant) therapy with trastuzumab and docetaxel for HER2-overexpressing stage II or III breast cancer: results of a multicenter phase II trial. *Ann Oncol*, 2006;17(3):409–14.
 133. Bayraktar S, Gonzalez-Angulo A, Lei X, Buzdar AU, Valero V, Melhem-Bertrandt A, et al. Efficacy of neoadjuvant therapy with trastuzumab concurrent with anthracycline- and nonanthracycline-based regimens for HER2-positive breast cancer. *Cancer*, 2012;118(9):2385–93.
 134. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Hegg R, 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):2278–84.
 135. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, 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):783–92.
 136. Lazaridis G, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Integrating trastuzumab in the neoadjuvant treatment of primary breast cancer: accumulating evidence of efficacy, synergy and safety. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008;66(1):31–41.
 137. Antón A, Ruiz A, Plazaola A, Calvo L, Seguí M, Santaballa 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):74–9.
 138. Hyams D, Leichman G, Klein P, Rietchsel P, Levine E, GebSKI V KM. Phase II Trial of Neoadjuvant Pegylated Liposomal Doxorubicin with Paclitaxel and Trastuzumab in Patients with Operable Her-2-positive Breast Cancer. *Cancer Res*. 2009;69(24 S):Abstract nr 1098.
 139. Cortes J, Di Cosimo S, Climent MA, Cortés-Funes H, Lluch A, Gascón P, et al. Nonpegylated liposomal doxorubicin (TLC-D99), paclitaxel, and trastuzumab in HER-2-overexpressing breast cancer: a multicenter phase I/II study. *Clin Cancer Res*, 2009;15(1):307–14.

140. Gavilá J, Guerrero Á, Climent MÁ, Fernández A, Gozalbo F, Carrascosa M, 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*, 2014;20(3):480–9.
141. Buzdar AU, Suman VJ, Meric-Bernstam F, Leitch AM, Ellis MJ, Boughey JC, Unzeitig G, Royce M, McCall LM, Ewer MS HKAC of SOG investigators. 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 random. *Lancet Oncol*, 2013;14(13):1317–25.
142. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTT0): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*, 2012;379(9816):633–40.
143. Carey L, Berry D, Cirrincione C, Barry W, Pitcher B, Harris L, 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):542–9.
144. Robidoux A, Tang G, Rastogi P, Geyer C, Azar CA, Atkins JN, 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):1183–92.
145. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Tseng L, Liu M, Lluch A, 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.
146. Swain S, Baselga J, Kim S-B, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2015;372(8):724–34.
147. Kurosumi M. Significance and problems in evaluations of pathological responses to neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast Cancer*, 2006;13(3):254–9.
148. Peintinger F, Kuerer H, Anderson K, Boughey J, Meric-Bernstam F, Singletary S, et al. Accuracy of the combination of mammography and sonography in predicting tumor response in breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 2006;13(11):1443–9.
149. Yeh E, Slanetz P, Kopans D, Rafferty E, Georgian-Smith D, Moy L, et al. Prospective comparison of mammography, sonography, and MRI in patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for palpable breast cancer. *AJR Am J Roentgenol*, 2005;184(3):868–77.
150. Lin M, Chen J, Mehta R, Bahri S, Chan S, Nalcioglu O, et al. Spatial

- shrinkage/expansion patterns between breast density measured in two MRI scans evaluated by non-rigid registration. *Phys Med Biol*, 2011;56(18):5865–75.
151. Bui E, Belli P, Di Matteo M, Terribile D, Franceschini G, Nardone L, et al. Effect of breast cancer phenotype on diagnostic performance of MRI in the prediction to response to neoadjuvant treatment. *Eur J Radiol*, 2014;83(9):1631–8.
 152. Olivas-Maguregui S, Villaseñor-Navarro Y, Ferrari-Carballo T, Morales-Chairez V, Michel-Ortega RM, Cerón-Lizarraga T, et al. Importance of the preoperative evaluation of multifocal and multicentric breast cancer with magnetic resonance imaging in women with dense parenchyma. *Rev Invest Clin*, 2008;60(5):382–9.
 153. Cools-Lartigue J, Sinclair A, Trabulsi N, Meguerditchian A, Mesurolle B, Fuhrer R, et al. Preoperative axillary ultrasound and fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of axillary metastases in patients with breast cancer: predictors of accuracy and future implications. *Ann Surg Oncol*, 2013;20(3):819–27.
 154. Penault-Llorca F, Abrial C, Raoelfils I, Cayre A, Mouret-Reynier M, Leheurteur M, et al. Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. *Hum Pathol*, 2008;39(8):1221–8.
 155. Ogston K, Miller I, Payne S, Hutcheon A, Sarkar T, Smith I, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast*, 2003;12(5):320–7.
 156. Feldman L, Hortobagyi G, Buzdar A, Ames F, Blumenschein G. Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res*, 1986;46(5):2578–81.
 157. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*, 2014;384(9938):164–72.
 158. Kuerer H, Newman L, Smith T, Ames F, Hunt K, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, 1999;17(2):460–9.
 159. Sataloff D, Mason B, Prestipino A, Seinige U, Lieber C, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Col Surg*, 1995;180(3):297–306.
 160. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L. Preoperative chemotherapy in operable breast cancer. *Lancet*, 1993;341(8858):1485.
 161. Cameron D, Anderson E, Levack P, Hawkins R, Anderson T, Leonard R, et al. Primary systemic therapy for operable breast cancer--10-year survival data after chemotherapy and hormone therapy. *Br J Cancer*, 1997;76(8):1099–105.
 162. Liedtke C, Mazouni C, Hess K, André F, Tordai A, Mejia J, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008;26(8):1275–81.

163. Schnitt S, Connolly J. Processing and evaluation of breast excision specimens. A clinically oriented approach. *Am J Clin Pathol*, 1992;98(1):125–37.
164. Chevallier B, Roche H, Olivier J, Chollet P, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol*, 1993;16(3):223–8.
165. Sahin A. Surgical margin evaluation in patients treated with breast-conserving therapy. Singletary SE, Robb G, Hortobagyi GN, eds. *Advanced Therapy of Breast Disease*. 2nd ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc. 2004. 341-348 p.
166. von Minckwitz G, Untch M, Nüesch E, Loibl S, Kaufmann M, Kümmel S, 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*, 2011;125(1):145–56.
167. Fernández-Morales L, Seguí MA, Andreu X, Dalmau E, Sáez A, Pericay C, et al. Analysis of the pathologic response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer grouped according to estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status. *Clin Breast Cancer*, 2007;7(7):559–64.
168. Frassoldati A, Maur M, Guarneri V, Nicolini M, Conte P. Predictive value of biologic parameters for primary chemotherapy in operable breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2005;6(4):315–24.
169. Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier J, Borel C, et al. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*, 2004;40(2):205–11.
170. Guarneri V, Broglio K, Kau S, Cristofanilli M, Buzdar A, Valero V, et al. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol*, 2006;24(7):1037–44.
171. von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Steffen J, Kaufmann M, Loehr A, B Gerber G, Heinrich G, H Eidtmann, J Hilfrich, C Jackisch, SD Costa, J Huober, H Buhler, C Denkert AR and SL. Prospective central assessment of HER-2 status by FISH is not a predictive factor for pathologic complete response (pCR) in 648 breast cancer patients treated preoperatively with an anthracycline / taxane based regimen in the multicenter GeparTrio trial. *Cancer Res*. 2007;67(9s):Abstract 3510.
172. Shien T, Kinoshita T, Seki K, Yoshida M, Hojo T, Shimizu C, et al. p53 expression in pretreatment specimen predicts response to neoadjuvant chemotherapy including anthracycline and taxane in patients with primary breast cancer. *Acta Med Okayama*, 2013;67(3):165–70.
173. Rouzier R, Extra J, Klijanienko J, Falcou M, Asselain B, Vincent-Salomon A, et al. Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and

- cytologically proven axillary metastatic lymph nodes. *J Clin Oncol*, 2002;20(5):1304–10.
174. Hennessy B, Hortobagyi G, Rouzier R, Kuerer H, Sneige N, Buzdar A, et al. Outcome after pathologic complete eradication of cytologically proven breast cancer axillary node metastases following primary chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2005;23(36):9304–11.
 175. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese R, et al. 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. *J Clin Oncol*, 1997;15(7):2483–93.
 176. Alba E, Calvo L, Albanell J, De la Haba JR, Arcusa Lanza A, Chacon JI, et al. Chemotherapy (CT) and hormone therapy (HT) as neoadjuvant treatment in luminal breast cancer patients: results from the GEICAM/2006-03, a multicenter, randomized, phase-II study. *Ann Oncol*, 2012;23(12):3069–74.
 177. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100(14):8418–23.
 178. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2015;26(suppl 5):v8–30.
 179. Rouzier R, Perou C, Symmans W, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2005;11(16):5678–85.
 180. Prat A, Parker J, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012;135(1):301–6.
 181. Chang H, Glaspy J, Allison M, Kass F, Elashoff R, Chung D, et al. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. *Cancer*, 2010;116(18):4227–37.
 182. Straver M, Rutgers E, Rodenhuis S, Linn S, Loo C, Wesseling J, et al. The relevance of breast cancer subtypes in the outcome of neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 2010;17(9):2411–8.
 183. Jung S, Jeong J, Shin S, Kwon Y, Kim E, Ko K, et al. The invasive lobular carcinoma as a prototype luminal A breast cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, 2010;10:664.
 184. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmuüller S, Lebeau A, Kreienberg R, 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):3351–7.
 185. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau S, Broglio K, Theriault RL, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol*, 2005;23(1):41–8.
 186. Jeruss J, Mittendorf E, Tucker S, Gonzalez-Angulo A, Buchholz T, Sahin A, et al.

- Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*, 2008;26(2):246–52.
187. Tanioka M, Shimizu C, Yonemori K, Yoshimura K, Tamura K, Kouno T, et al. Predictors of recurrence in breast cancer patients with a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer*, 2010;103(3):297–302.
 188. Bulut N, Altundag K. Excellent clinical outcome of triple-negative breast cancer in younger and older women. *J BUON* 2016;20(5):1276–81.
 189. Fontanella C, Lederer B, Gade S, Vanoppen M, Blohmer J, Costa S, et al. Impact of body mass index on neoadjuvant treatment outcome: a pooled analysis of eight prospective neoadjuvant breast cancer trials. *Breast Cancer Res Treat*, 2015;150(1):127–39.
 190. Kogawa T, Fouad T, Wei C, Masuda H, Kai K, Fujii T, et al. Association of Body Mass Index Changes during Neoadjuvant Chemotherapy with Pathologic Complete Response and Clinical Outcomes in Patients with Locally Advanced Breast Cancer. *J Cancer*, 2015;6(4):310–8.
 191. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess K, Gold D, Stec J, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102(23):8315–20.
 192. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res*, 2003;9(7):2406–15.
 193. Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res*, 2001;61(16):5979–84.
 194. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl cancer Inst*, 2006;98(4):262–72.
 195. Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005;23(29):7265–77.
 196. Rouzier R, Extra J, Carton M, Falcou M, Vincent-Salomon A, Fourquet A, 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):3828–35.
 197. Chen A, Meric-Bernstam F, Hunt K, Thames H, Oswald M, Outlaw E, et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy: the MD Anderson cancer center experience. *J Clin Oncol*, 2004;22(12):2303–12.
 198. McCready D, Hortobagyi G, Kau S, Smith T, Buzdar A, Balch C. The prognostic significance of lymph node metastases after preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Arch Surg*, 1989;124(1):21–5.

199. Kuerer H, Newman L, Fornage B, Dhingra K, Hunt K, Buzdar A, et al. Role of axillary lymph node dissection after tumor downstaging with induction chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 1998;5(8):673–80.
200. Bacus S, Altomare D, Lyass L, Chin D, Farrell M, Gurova K, et al. AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. *Oncogene*, 2002;21(22):3532–40.
201. Neve R, Holbro T, Hynes N. Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene*, 2002;21(29):4567–76.
202. Bender LM, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer. *Front Biosci*. 2008;13(404):3906–12.
203. Huber K, Carey L, Wazer D. Breast cancer molecular subtypes in patients with locally advanced disease: impact on prognosis, patterns of recurrence, and response to therapy. *Semin Radiat Oncol*, 2009;19(4):204–10.
204. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Wirapati P, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med*, 2009;15(1):68–74.
205. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller B, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2010;28(1):105–13.
206. Spector NL, Blackwell KL. Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 2013;27(34):5838–47.
207. Fabi A, Metro G, Di Benedetto A, Nisticò C, Vici P, Melucci E, et al. Clinical significance of PTEN and p-Akt co-expression in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Oncology*, 2010;78(2):141–9.
208. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 2004;6(2):117–27.
209. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*, 2010;28(6):1075–83.
210. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jiménez J, Guzmán M, Dolors Sabadell M, et al. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res*, 2007;13(1):81–9.
211. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst*, 2001;93(24):1852–7.
212. Liedtke C, Cardone L, Tordai A, Yan K, Gomez HL, Figureoa LJB, et al. PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II-III breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2008;10(2):R27.
213. Junttila T, Akita R, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips G, Friedman LS, et al.

- Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*, 2009;15(5):429–40.
214. Molina M, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*, 2001;61(12):4744–9.
 215. Carson W, Parihar R, Lindemann M, Personeni N, Dierksheide J, Meropol N, et al. Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol*, 2001;31(10):3016–25.
 216. De P, Hasmann M, Leyland-Jones B. Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance? *Cancer Treat Rev*, 2013;39(8):925–34.
 217. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, 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):628–38.
 218. Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, Aura C, Jimenez J, Angelini P, et al. Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clin Cancer Res*, 2010;16(9):2688–95.
 219. Christianson T, Doherty J, Lin Y, Ramsey E, Holmes R, Keenan E, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res*, 1998;58(22):5123–9.
 220. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera J, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res*, 1999;59(6):1196–201.
 221. Tural D, Akar E, Mutlu H, Kilickap S. P95 HER2 fragments and breast cancer outcome. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2014;14(9):1089–96.
 222. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, Saha A, Diedrich G, 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):4226–35.
 223. Zuo W, Jiang Y, Wang Y, Xu X, Hu X, Liu G, et al. Dual Characteristics of Novel HER2 Kinase Domain Mutations in Response to HER2-Targeted Therapies in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2016;22(19):4859–69.
 224. Bose R, Kavuri S, Searleman A, Shen W, Shen D, Koboldt D, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov*, 2013;3(2):224–37.
 225. Hudelist G, Köstler W, Czerwenka K, Kubista E, Attems J, Müller R, et al. Her-2/neu and EGFR tyrosine kinase activation predict the efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer*, 2006;118(5):1126–34.

226. Gori S, Foglietta J, Mameli MG, Stocchi L, Fenocchio D, Anastasi P, et al. HER-3 status by immunohistochemistry in HER-2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab: correlation with clinical outcome. *Tumori*, 2006;98(1):39–44.
227. Köstler W, Hudelist G, Rabitsch W, Czerwenka K, Müller R, Singer CF, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression does not predict for resistance to trastuzumab-based treatment in patients with Her-2/neu overexpressing metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006;132(1):9–18.
228. Buzdar A. Role of biologic therapy and chemotherapy in hormone receptor- and HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol*, 2009;20(6):993–9.
229. Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2007;13(4):1198–207.
230. Cortés J, Baselga J, Fumoleau P, Gelmo K, Ross G McNally V, et al. Pertuzumab and trastuzumab: Exploratory biomarker correlations with clinical benefit in patients with metastatic HER2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2010;28:15s: abstr 1066.
231. Schneeweiss A, Chia S, Hegg R, Tausch C, Deb R, Ratnayake J, 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.
232. Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson M, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2007;13(12):3577–84.
233. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*, 2007;12(4):395–402.
234. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer*, 2006;94(2):247–52.
235. Berns K, Horlings H, Hennessy B, Madiredjo M, Hijmans E, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 2007;12(4):395–402.
236. Boulbes D, Arold S, Chauhan G, Blachno K, Deng N, Chang W, et al. HER family kinase domain mutations promote tumor progression and can predict response to treatment in human breast cancer. *Mol ONCOL*, 2015;9(3):586–600.
237. Hiles I, Otsu M, Volinia S, Fry M, Gout I, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*,

- 1992;70(3):419–29.
238. Cantley L. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Sci*, 2002;296(5573):1655–7.
 239. Alessi D, James S, Downes C, Holmes A, Gaffney P, Reese C, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 1997;7(4):261–9.
 240. Currie R, Walker K, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes C, et al. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J*, 1999;575–83.
 241. Engelman J, Luo J, Cantley L. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 2006;7(8):606–19.
 242. Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*, 2008;415(3):333–44.
 243. Hresko R, Mueckler M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2005;280(49):40406–16.
 244. Sarbassov D, Ali S, Sengupta S, Sheen J, Hsu P, Bagley A, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. 2006;22(2):159–68.
 245. Cizkova M, Dujaric M, Lehmann-Che J, Scott V, Tembo O, Asselain B, et al. Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab. *Br J Cancer*, 2013;108(9):1807–9.
 246. Saal L, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*, 2005;65(7):2554–9.
 247. Kandula M, Chennaboina KK, Ys AR, Raju S. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KCA) oncogene mutation analysis and gene expression profiling in primary breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013;14(9):5067–72.
 248. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 2004;3(8):772–5.
 249. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*, 2005;65(7):2554–9.
 250. Zhao J, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda M, Roberts T. The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102(51):18443–8.
 251. Kan Z, Jaiswal B, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern H, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 2010;466(7308):869–73.
 252. Dbouk H, Khalil B, Wu H, Shymanets A, Nürnberg B, Backer J. Characterization

- of a tumor-associated activating mutation of the p110 β PI 3-kinase. *PLoS One*, 2013;8(5):e63833.
253. Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, Saijo N, Hirai M, Minami H. Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol*, 2010;21(2):255–62.
 254. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn P, Valero V, Guzman M, et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, 2008;68(19):8022–30.
 255. 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):633–42.
 256. Baselga J, Cortés J, Im S, Clark E, Ross G, Kiermaier A, et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2014;32(33):3753–61.
 257. Arpino G, Wiechmann L, Osborne C, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*, 2008;29(2):217–33.
 258. Loibl S, Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Paepke S, Lehmann A, Rezai M, et al. PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol*, 2014;32(29):3212–20.
 259. Takada M, Higuchi T, Tozuka K, Takei H, Haruta M, Watanabe J, Kasai F, Inoue K, Kurosumi M, Miyazaki M, Sato-Otsubo A, Ogawa S KY. Alterations of the genes involved in the PI3K and estrogen-receptor pathways influence outcome in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemot. *BMC Cancer*, 2013;16(13):241.
 260. Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2011;128(2):447–56.
 261. Nishimura R, Arima N, Toyoshima S, Ohi Y, Anan K, Sagara Y, et al. Evaluation of PTEN loss and PIK3CA mutations and their correlation with efficacy of trastuzumab treatment in HER2-positive metastatic breast cancer: A retrospective study (KBC-SG 1001). *Mol Clin Oncol*, 2013;1(1):47–52.
 262. Loi S, Michiels S, Lambrechts D, Fumagalli D, Claes B, Kellokumpu-Lehtinen P-L, et al. Somatic mutation profiling and associations with prognosis and trastuzumab benefit in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst*,

- 2013;105(13):960–7.
263. Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L, Bosma AJ, Eidtmann H, Holmes E, 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.* 33:1334–9.
 264. Madrid-Paredes A, Cañadas-Garre M, Sánchez-Pozo A, Calleja-Hernández MÁ. De novo resistance biomarkers to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer. *Pharmacogenomics*, 2015;16(12):1411–26. A
 265. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K Status. *Am J Pathol*, 2010;177(4):1647–56.
 266. Furnari F, Huang H, Cavenee W. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res*, 1998;58(22):5002–8.
 267. Vanhaesebroeck B, Alessi D. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J [Internet]*. 2000 Mar 15 [cited 2016 Oct 16];346 Pt 3:561–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698680>
 268. Duman B, 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 BIJON*, 2010;18(1):44–50.
 269. Robinson A, Turbin D, Thomson T, Yorida E, Ellard S, Bajdik C, et al. Molecular predictive factors in patients receiving trastuzumab-based chemotherapy for metastatic disease. *Clin Breast Cancer*, 2006;7(3):254–61.
 270. Smith B, Chin D, Maltzman W, Crosby K, Hortobagyi G, Bacus S. The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins. *Br J Cancer*, 2004;91(6):1190–4.
 271. Esteva F, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury J, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*, 2010;177(4):1647–56.
 272. Cortes J, Baselga J, Fumoleau P, Gelmon K, Ross G, McNally V, et al. Pertuzumab and trastuzumab: Exploratory biomarker correlations with clinical benefit in patients with metastatic HER2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2010; 28:15s: abstr 1066.
 273. Parsons R, Simpson L. PTEN and cancer. *Methods Mol Biol*, 2003;222:147–66.
 274. Pradella L, Evangelisti C, Ligorio C, Ceccarelli C, Neri I, Zuntini R, et al. A novel deleterious PTEN mutation in a patient with early-onset bilateral breast cancer. *BMC Cancer*, 2014;14:70–78.
 275. Feilotter H, Coulon V, McVeigh J, Boag A, Dorion-Bonnet F, Duboué B, et al. Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. *Br J Cancer*, 1999;79(5–6):718–23.
 276. Nuciforo P, Aura C, Holmes E, Prudkin L, Jimenez J, Martinez P, et al. Benefit to neoadjuvant anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in HER2-positive primary breast cancer is independent of

- phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) status. *Ann Oncol*, 2015;26(7):1494–500.
277. Faratian D, Goltsov A, Lebedeva G, Sorokin A, Moodie S, Mullen P, et al. Systems biology reveals new strategies for personalizing cancer medicine and confirms the role of PTEN in resistance to trastuzumab. *Cancer Res*, 2009;69(16):6713–20.
 278. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan K-H, Yang Y, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res*, 2004;10(20):6779–88.
 279. Heesom K, Gampel A, Mellor H, Denton R. Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr Biol*, 2001;11(17):1374–9.
 280. Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res*, 2004;64(23):8639–42.
 281. Millican-Slater R, Sayers C, Hanby A, Hughes T. Expression of phosphorylated eIF4E-binding protein 1, but not of eIF4E itself, predicts survival in male breast cancer. *Br J Cancer*, 2016;115(3):339–45.
 282. Wendel H, De Stanchina E, Fridman J, Malina A, Ray S, Kogan S, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*, 2004;428(6980):332–7.
 283. Baselga J, Albanell J, Ruiz A, Lluch A, Gascón P, Guillém V, et al. Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005;23(23):5323–33.
 284. Schreiber R, Old L, Smyth M. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Sci*, 2011;331(6024):1565–70.
 285. Malyguine AM, Strobl SL, Shurin MR. Immunological monitoring of the tumor immunoenvironment for clinical trials. *Cancer Immunol Immunother*, 2012;61(2):239–47.
 286. Melichar B, Jandik P, Krejsek J, Solichova D, Drahosova M, Skopec F, et al. Mitogen-induced lymphocyte proliferation and systemic immune activation in cancer patients. *Tumori*, 2000;82(3):218–20.
 287. Melichar B, Tousková M, Solichová D, Králícková P, Kopecký G. CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours. *Scand J Clin Lab Invest*, 2001;61(5):363–70.
 288. Freedman R, Vadhan-Raj S, Butts C, Savary C, Melichar B, Verschraegen C, et al. Pilot study of Flt3 ligand comparing intraperitoneal with subcutaneous routes on hematologic and immunologic responses in patients with peritoneal carcinomatosis and mesotheliomas. *Clin Cancer Res*, 2003;9(14):5228–37.
 289. Melichar B, Freedman R. Immunology of the peritoneal cavity: relevance for host-tumor relation. *Int J Gynecol Cancer*, 2004;12(1):3–17.
 290. Melichar B, Savary CA, Patenia R, Templin S, Melicharova K, Freedman RS. Phenotype and antitumor activity of ascitic fluid monocytes in patients with

- ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 2006;13(4):435–43.
291. Melichar B, Nash M, Lenzi R, Platsoucas C, Freedman R. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol*, 2000;119(1):19–27.
292. Tomsová M, Melichar B, Sedláková I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2008;108(2):415–20.
293. Zhang L, Conejo-Garcia J, Katsaros D, Gimotty P, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med [Internet]*. 2003;348(3):203–13.
294. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2011;21(9):1628–34.
295. Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res*, 2008;14(8):2310–7.
296. Ménard S, Tomasic G, Casalini P, Balsari A, Pilotti S, Cascinelli N, et al. Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, 1997;3(5):817–9.
297. Mohammed Z, Going J, Edwards J, Elsberger B, Doughty J, McMillan D. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*, 2012;107(5):864–73.
298. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*, 2013;31(7):860–7.
299. Mahmoud S, Paish E, Powe D, Macmillan R, Grainge M, Lee A, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2011;29(15):1949–55.
300. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma V, Marin S, Alhava E, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer*, 1992;28A(4–5):859–64.
301. Alexe G, Dalgin G, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov J, DeLisi C, et al. High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. *Cancer Res*, 2007;67(22):10669–76.
302. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend

- on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res*, 2008;14(16):5158–65.
303. Cimino-Mathews A, Foote J, Emens L. Immune targeting in breast cancer. *Oncol*, 2015;29(5):375–85.
 304. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, 2007;13(9):1050–9.
 305. Mattarollo S, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth M. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res*, 2011;71(14):4809–20.
 306. Clynes R, Towers T, Presta L, Ravetch J. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 2000;6(4):443–6.
 307. Ignatiadis M, Singhal S, Desmedt C, Haibe-Kains B, Criscitiello C, Andre F, et al. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol*, 2012;30(16):1996–2004.
 308. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Apetoh L, Rébé C, Martin F, et al. T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival. *Br J Cancer*, 2011;105(3):366–71.
 309. Park S, Jiang Z, Mortenson E, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell*, 2010;18(2):160–70.
 310. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*, 2013;123(7):2873–92.
 311. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*, 2009;69(5):2000–9.
 312. Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urminska H, Ryska A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest*, 2008;26(10):1024–31.
 313. Melichar B, Študentova H, Kalábová H, Vitásková D, Čermáková P, Hornychová H, et al. Predictive and prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. *Anticancer Res*, 2014;34(3):1115–25.
 314. Seo A, Lee H, Kim E, Kim H, Jang M, Lee H, et al. Tumour-infiltrating CD8⁺ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer*, 2013;109(10):2705–13.
 315. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*, 2015;26(2):259–71.

316. West N, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson B, Watson P. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2011;13(6):R126.
317. Melichar B, Urbánek L, Krcmová L, Kalábová H, Melicharová K, Malířová E, et al. Urinary neopterin, hemoglobin and peripheral blood cell counts in breast carcinoma patients treated with dose-dense chemotherapy. *Anticancer Res*, 2015;28(4C):2389–96.
318. Melichar B, Tousková M, Dvorák J, Jandík P, Kopecký O. The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: effect of doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2001;23(2):163–73.
319. Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M, Koura K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol*, 2012;43(10):1688–94.
320. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, Kunz G, Nekljudova V, Schrader I, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One*, 2013;8(12):e79775.
321. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. *Ann Oncol*, 2014;25(8):1544–50.
322. Melichar B, Hornyřhová H, Kalábová H, Bařová H, Mergancová J, Urminská H, et al. Increased efficacy of a dose-dense regimen of neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma: a retrospective analysis. *Med Oncol*, 2012;29(4):2577–85.
323. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012;132(3):793–805.
324. Ingold Heppner B, Untch M, Denkert C, Pfitzner BM, Lederer B, Schmitt W, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2016;22(23).
325. Perez E, Ballman K, Tenner KS, Thompson E, Badve S, Bailey H, et al. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol*, 2016;2(1):56–64.
326. Guarneri V, Dieci M, Frassoldati A, Maiorana A, Ficarra G, Bettelli S, et al. Prospective Biomarker Analysis of the Randomized CHER-LOB Study Evaluating the Dual Anti-HER2 Treatment With Trastuzumab and Lapatinib Plus Chemotherapy as Neoadjuvant Therapy for HER2-Positive Breast Cancer.

- Oncologist, 2015;20(9):1001–10.
327. Oda N, Shimazu K, Naai Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M, et al. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2012;136(1):107–16.
 328. Ruffell B, Au A, Rugo H, Esserman L, Hwang E, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012;109(8):2796–801.
 329. Demaria S, Volm M, Shapiro R, Yee H, Oratz R, Formenti S, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2001;7(10):3025–30.
 330. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 2008;14(8):2413–20.
 331. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rébé C, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol*, 2011;224(3):389–400.
 332. Liu F, Li Y, Ren M, Zhang X, Guo X, Lang R, et al. Peritumoral FOXP3⁺ regulatory T cell is sensitive to chemotherapy while intratumoral FOXP3⁺ regulatory T cell is prognostic predictor of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2012;135(2):459–67.
 333. Aruga T, Suzuki E, Saji S, Horiguchi S-I, Horiguchi K, Sekine S, et al. A low number of tumor-infiltrating FOXP3-positive cells during primary systemic chemotherapy correlates with favorable anti-tumor response in patients with breast cancer. *Oncol Rep*, 2009;22(2):273–8.
 334. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta V, Semiglazov V, Lluch A, et al. Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 2009;27(15):2474–81.
 335. McShane L, Hayes D. Publication of Tumor Marker Research Results: The Necessity for Complete and Transparent Reporting. *J Clin Oncol*, 2012;30(34):4223–32.
 336. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009;45(2):228–47.
 337. Shousha S. Oestrogen receptor status of breast carcinoma: Allred/H score conversion table. *Histopathology*, 2008;53(3):346–7.
 338. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm A V., Grauslund M, Jensen MB, Santoni-Rugiu E, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol*, 2012;23(8):2034–42.

339. Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer J, et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto , GBG 44): a randomised phase 3 trial, 2012;2045(11):1–10.
340. Sueta A, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Hayashi M, Takeshita T, Yamamoto S, et al. An integrative analysis of PIK3CA mutation, PTEN, and INPP4B expression in terms of trastuzumab efficacy in HER2-positive breast cancer. *PLoS One*, 2014;9(12):1–17.
341. Gianni L, Pienkowski T, Im Y, Roman L, Tseng L, Liu M, 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. *Lancet Oncol*, 2012;13(1):25–32.
342. Mohammed Z, Going J, Edwards J, Elsberger B, Doughty J, McMillan D. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*, 2012;107(5):864–73.
343. Costa S, Loibl S, Kaufmann M, Zahm D, Hilfrich J, Huober J, et al. Neoadjuvant chemotherapy shows similar response in patients with inflammatory or locally advanced breast cancer when compared with operable breast cancer: a secondary analysis of the GeparTrio trial data. *J Clin Oncol*, 2010;28(1):83–91.
344. Schneeweiss A, Chia S, Hegg R, Tausch C, Deb R, Ratnayake J, 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.
345. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, et al. 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 . *Lancet*, 375(9712):377–84.
346. Jensen J, Knoop A, Laenkholm A V, Grauslund M, Jensen MB, Santoni-Rugiu E, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol*, 2012;23(8):2034–42.
347. Sueta A, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Hayashi M, Takeshita T, Yamamoto S, et al. An Integrative Analysis of PIK3CA Mutation, PTEN, and INPP4B Expression in Terms of Trastuzumab Efficacy in HER2-Positive Breast Cancer. Sapino A, editor. *PLoS One*, 2014;9(12):e116054.
348. Loibl S, Darb-Esfahani S, Huober J, Klimowicz A, Furlanetto J, Lederer B, et al. Integrated Analysis of PTEN and p4EBP1 Protein Expression as Predictors for pCR in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2016;22(11):2675–83.
349. Millis SZ, Ikeda S, Reddy S, Gatalica Z, Kurzrock R. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncol*, 2016;2(12):1565.

350. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2012;490(7418):61–70.
351. Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L, Bosma AJ, Eidtmann H, Holmes E, 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):1334–9.
352. Loibl S, Majewski I, Guarneri V, Nekljudova V, Holmes E, Bria E, et al. *PIK3CA* mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab. *Ann Oncol*, 2016;27(8):1519–25.
353. Bianchini G, Pusztai L, Pienkowski T, Im Y-H, Bianchi G, Tseng L-M, et al. Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. *Ann Oncol*, 2015;26(12):2429–36.
354. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab. *JAMA Oncol*, 2015;1(4):448.
355. Wang Y, Morrison G, Gillihan R, Guo J, Ward RM, Fu X, 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.
356. Fumagalli D, Venet D, Ignatiadis M, Azim HA, Maetens M, Rothé F, et al. RNA Sequencing to Predict Response to Neoadjuvant Anti-HER2 Therapy: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 2016;1–8.
357. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu M, Chamness GC, Wong H, 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):166–73.
358. Rimawi MF, Mayer IA, Forero A, Nanda R, Goetz MP, Rodriguez AA, 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):1726–31.
359. Morrow P, Wulf G, Ensor J, Booser DJ, Moore JA, Flores PR, et al. Phase I/II Study of Trastuzumab in Combination With Everolimus (RAD001) in Patients With HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Who Progressed on Trastuzumab-Based Therapy. *J Clin Oncol*, 2011;29(23):3126–32.
360. Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hashizume K, Ono M, et al. Immunohistochemical expression of PTEN and phosphorylated Akt are not

- correlated with clinical outcome in breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neo-adjuvant chemotherapy. *Med Oncol*, 2009;26(3):344–9.
361. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol*, 2009;20(4):648–54.
 362. Vasudevan K, Barbie D, Davies M, Rabinovsky R, McNear C, Kim JJ, et al. AKT-Independent Signaling Downstream of Oncogenic PIK3CA Mutations in Human Cancer. *Cancer Cell*, 2009;16(1):21–32.
 363. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014;9(12):1–21.
 364. Denkert C, Minckwitz G Von, Brase JC, Sinn B V, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – Positive and Triple-Negative Primary Breast Cancers. *J Clin Oncol*, 2015;33(9).
 365. Hoppner B, Untch M, Denkert C, Pfitzner BM, Lederer B, Schmitt W, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2016;22(23):5747–54.
 366. Carbognin L, Pilotto S, Nortilli R, Brunelli M, Nottegar A, Sperduti I, et al. Predictive and Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Early Breast Cancer According to Disease Subtypes: Sensitivity Analysis of Randomized Trials in Adjuvant and Neoadjuvant Setting. *Oncologist*, 2016;21(3):283–91.
 367. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortes J, et al. Molecular Features and Survival Outcomes of the Intrinsic Subtypes Within HER2-Positive Breast Cancer. *J Natl Cancer*, 2014;106(8):1-8.
 368. Loibl S, Bruey J von MG. Validation of p95 as a predictive marker for trastuzumab-based therapy in primary HER2- positive breast cancer: A translational investigation from the neoadjuvant GeparQuattro study. *J Clin Oncol*. 2011;29(suppl): abstr 530.
 369. Scaltriti M, Nuciforo P, Bradbury I, Sperinde J, Agbor-Tarh D, Campbell C, et al. High HER2 expression correlates with response to the combination of lapatinib and trastuzumab. *Clin Cancer Res*, 2015;21(3):569–76.
 370. Guiu S, Gauthier M, Coudert B, Bonnetain F, Favier L, Ladoire S, et al. Pathological complete response and survival according to the level of HER-2 amplification after trastuzumab-based neoadjuvant therapy for breast cancer. *Br J Cancer*, 2010;103(9):1335–42.
 371. Witzel I, Loibl S, von Minckwitz G, Mundhenke C, Huober J, Hanusch C, et al. Monitoring serum HER2 levels during neoadjuvant trastuzumab treatment within the GeparQuattro trial. *Breast Cancer Res Treat*, 2010;123(2):437–45.

372. Tubbs R, Barlow WE, Budd GT, Swain E, Porter P, Gown A, et al. Outcome of patients with early-stage breast cancer treated with doxorubicin-based adjuvant chemotherapy as a function of HER2 and TOP2A status. *J Clin Oncol*, 2009;27(24):3881–6.
373. Carter C, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 1989;63(1):181–7.
374. Rastogi P, Anderson S, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, 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):778–85.
375. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol*, 2012;30(15):1796–804.
376. Kaufmann M, Hortobagyi G, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol*, 2006;24(12):1940–9.
377. Prowell TM, Pazdur R. Pathological complete response and accelerated drug approval in early breast cancer. *N Engl J Med*, 2012;366(26):2438–41.
378. Fisher B, Saffer E, Fisher E. Studies concerning the regional lymph node in cancer. 3. Response of regional lymph node cells from breast and colon cancer patients to PHA stimulation. *Cancer*, 1972;30(5):1202–15.
379. Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo A, Symmans WF, et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol*, 2007;25(19):2650–5.
380. Perez E, Ballman K, Tenner K, Thompson E, Badve S, Bailey H, et al. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol*, 2016;2(1):56.

8. Anexos

Anexo I. Clasificación histológica de los tumores epiteliales de la mama propuesta por la OMS (33).

Carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación (NOS)

Carcinoma lobulillar infiltrante

Carcinoma tubular

Carcinoma infiltrante cribiforme

Carcinoma medular

Carcinoma mucinoso

Carcinoma neuroendocrino

Carcinoma papilar infiltrante

Carcinoma micropapilar infiltrante

Carcinoma apocrino

Carcinoma metaplásico

Carcinoma rico en lípidos

Carcinoma secretor

Carcinoma oncocítico

Carcinoma adenoide quístico

Carcinoma de células acínicas

Carcinoma sebáceo

Carcinoma de células claras rico en glucógeno

Carcinoma inflamatorio

Carcinoma lobulillar in situ

Carcinoma ductal in situ

 Hiperplasia ductal

 Hiperplasia ductal atípica

 Carcinoma ductal in situ

Carcinoma microinfiltrante

Anexo II. Tamaño tumoral (T). Clasificación tumoral de la American Joint Committee on cancer (AJCC) (48).

Tumor primario	Definición
Tx	No se puede medir el tumor primario
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal in situ
Tis (CLIS)	Carcinoma lobulillar in situ
Tis (Paget)	Enfermedad Paget del pezón sin tumor asociado
T1	≤2 cm
T1mic	Microinvasión ≤1 cm diámetro mayor
T1a	Tamaño tumoral >0,1 cm pero ≤0,5 cm en su diámetro mayor
T1b	>0,5 cm pero ≤1 cm en su d.mayor
T1c	>1cm pero ≤ 2 cm en su d. mayor
T2	>2 cm pero ≤5 cm en su d.mayor
T3	>5 cm
T4	Cualquier tamaño pero extensión a pared costal o a piel
T4a	Afecta pared torácica sin incluir pectoral mayor
T4b	Edema, ulceración o nódulos satélite en la piel de la misma mama
T4c	T4a+T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio

Anexo III. Ganglios linfáticos regionales. Afectación clínica (cN). Clasificación tumoral de la AJCC (48).

Afectación Ganglionar Clínica	Definición
Nx	No se pueden estudiar los ganglios (gg) linfáticos regionales.
N0	Sin metástasis en los gg linfáticos regionales.
N1	Metástasis en gg regionales Ipsilaterales móviles.
N2	Metástasis en gg regionales fijos entre sí o a otras estructuras, o clínicamente aparentes de la mamaria interna ipsilateral en ausencia de metástasis axilares clínicamente aparentes.
N3	Metástasis en gg infraclaviculares ipsilaterales o de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes con gg axilares homolaterales clínicamente visibles o metástasis en gg supraclaviculares homolaterales con o sin afectación de los nódulos de los gg de la axila o mamaria interna.
N3a	Metástasis en gg infraclaviculares homolaterales y en gg axilares.
N3b	Metástasis en gg homolaterales de la mamaria interna y en gg axilares.
N3c	Metástasis en gg supraclaviculares homolaterales.

Anexo IV. Afectación patológica ganglios linfáticos (pN). Clasificación AJCC (48).

Afectación Ganglionar Patológica	Definición
pN0	No metástasis en gg regionales.
pN0 (i-)	No metástasis en gg regionales. IHQ negativa.
pN0 (i+)	No metástasis en gg regionales. IHQ positiva con CTA (grupo de células neoplásicas <0,2 mm).
pN0 (mol-)	No metástasis en gg regionales. Estudio molecular negativo.
pN0 (mol+)	No metástasis en gg regionales. Estudio molecular positivo.
pN1	Metástasis en 1-3 gg axilares y/o en gg mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela.
pN1mi	Micrometástasis (>0,2mm, < 0,2 cm).
pN1a	Metástasis en 1 a 3 gg axilares.
pN1b	Metástasis en gg mamaros internos con afectación microscópicamente detectada por disección del ganglio centinela.
pN1c	Metástasis en 1-3 gg axilares y en gg mamaros internos con afectación microscópicamente detectada por disección del ganglio centinela.
pN2	Metástasis en 4-9 gg axilares o en gg mamaros internos clínicamente aparentes en ausencia de gg axilares afectados.
pN2a	Metástasis en 4-9 gg axilares (al menos un depósito tumoral >0,2 cm)
pN2b	Metástasis en gg mamaros internos clínicamente detectados en ausencia de gg axilares afectos.
pN3	Metástasis en ≥10 gg axilares, o infraclaviculares o mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectados en presencia de ≥1 gg axilares afectados; o ≥3 gg axilares con metástasis microscópicas en gg mamaros internos clínicamente negativos o en supraclaviculares ipsilaterales.
pN3a	Metástasis en ≥10 gg axilares (al menos un depósito tumoral >0,2 cm) o metástasis en gg infraclaviculares.
pN3b	Metástasis en gg mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables en presencia de ≥1 gg axilares afectados; o ≥ 3 gg axilares y en gg de la mama interna con afectación microscópica.
pN3c	Metástasis en gg supraclaviculares ipsilaterales.

Anexo V. Metástasis a distancia (M). Clasificación tumoral de la AJCC (48).

Afectación	Definición
Metastásica	
Mx	No se puede estudiar la presencia de metástasis
M0	No existen metástasis
M1	Metástasis a distancia

Anexo VI. Estadios del CM. Clasificación tumoral de la AJCC (48).

0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
IIIA	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
IIIB	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
IIIC	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1