



## IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES Y ESTRATEGIAS QUE EVITEN O REDUZCAN EL USO DE QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER DE MAMA PRECOZ

Memoria de tesis doctoral presentada por **Núria Chic Ruché**  
para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

**Director y tutor de tesis**  
Aleix Prat Aparicio, MD, PhD

*Director Instituto del Cáncer y Enfermedades de la Sangre,  
Hospital Clinic de Barcelona*

*Genómica Traslacional y Terapias dirigidas en Tumores Sólidos,  
IDIBAPS, Barcelona*

*Profesor Cátedra de Innovación en Oncología de Precisión,  
Universidad de Barcelona*

**Director de tesis**  
Roger Gomis Cabré, PhD

*Profesor de investigación ICREA  
en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB Barcelona)*

*Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona*

**Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional**

---

*Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona.*



## AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

El Dr. Aleix Prat Aparicio, director del Instituto del Cáncer y Enfermedades de la Sangre del Hospital Clinic de Barcelona y Profesor con cátedra de innovación en oncología de precisión en la Universidad de Barcelona, con DNI 47713204A y el Dr. Roger Gomis Cabré, Profesor de investigación ICREA en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB Barcelona) y Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona, con DNI 38139231X

### DECLARAN QUE:

La memoria de tesis presentada por el Sra. Núria Chic Ruché con título *“Identificación de biomarcadores y estrategias que eviten o reduzcan el uso de quimioterapia en cáncer de mama precoz”*, ha sido realizada bajo mi dirección y que autorizo su depósito para ser defendida y juzgada por un tribunal

Firmado el día 19 de julio de 2023

Director

Aleix Prat  
Aparicio - DNI  
47713204A  
(TCAT)

Firmado digitalmente  
por Aleix Prat Aparicio -  
DNI 47713204A (TCAT)  
Fecha: 2023.07.20  
08:16:30 +02'00'

---

Aleix Prat Aparicio

Director

Sigend by/Firmado Roger Gomis -  
DNI \*\*\*3923\*\* (TCAT), and  
dated/Fecha 19/07/2023 certified  
by/certificado por EC-  
SectorPublic

---

Roger Gomis Cabré



# DECLARACIÓN DE LA PERSONA DOCTORANDA Y DE LA PERSONAS QUE DIRIGE DE LA ORIGINALIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS DE LA TESIS

El Dr. Aleix Prat Aparicio, director del Instituto del Cáncer y Enfermedades de la Sangre del Hospital Clinic de Barcelona y Profesor con cátedra de innovación en oncología de precisión en la Universidad de Barcelona, con DNI 47713204A, Roger Gomis Cabré, Profesor de investigación ICREA en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB Barcelona) y Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona, con DNI 38139231X

DECLARAN QUE:

La tesis doctoral, con título “*Identificación de biomarcadores y estrategias que eviten o reduzcan el uso de quimioterapia en cáncer de mama precoz*”, es original, conteniendo resultados e información fruto de investigación propia, y que no contiene plagios de otras tesis, publicaciones o investigaciones de otros autores. Asimismo, confirman que se han seguido los códigos éticos y de buenas prácticas, para su elaboración. Manifiestan que consienten que la memoria de tesis pueda ser sometida a procedimientos para la comprobación de su originalidad.

Para que así conste, firman el 19 de julio de 2023

Director

Aleix Prat  
Aparicio - DNI  
47713204A  
(TCAT)

Firmado digitalmente  
por Aleix Prat Aparicio  
- DNI 47713204A  
(TCAT)  
Fecha: 2023.07.20  
08:15:09 +02'00'

Aleix Prat Aparicio

Director

Sigend by/Firmado Roger  
Gomis - DNI \*\*\*3923\*\*  
(TCAT) and dated/Fecha  
19/07/2023 certified

Roger Gomis Cabré

Doctoranda

CHIC RUCHE  
NURIA -  
47904836E

Digitally signed by CHIC  
RUCHE NURIA -  
47904836E  
Date: 2023.07.20  
17:54:28 +10'00'

Núria Chic Ruché



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA TESIS

La doctoranda Sra. Núria Chic Ruché con DNI 47904836E

DECLARA QUE

Es autora de la tesis doctoral titulada “*Identificación de biomarcadores y estrategias que eviten o reduzcan el uso de quimioterapia en cáncer de mama precoz*”

Firmado el día 19 de Julio 2023

Doctoranda

CHIC RUCHE  
NURIA -  
47904836E

Digitally signed by  
CHIC RUCHE NURIA -  
47904836E  
Date: 2023.07.20  
17:56:14 +10'00'

---

Núria Chic Ruché





---

**“Només s’hi veu bé amb el cor.  
L’essencial és invisible als ulls”**

*El Petit Príncep*  
Antoine de Saint-Exupéry



---

A tots els que m'heu acompanyat al llarg del camí  
i que m'heu ensenyat a no rendir-me.

Al meu mentor, Aleix Prat,  
que m'ha ensenyat el valor de la perseverança,  
resiliència, dedicació i passió per la investigació i  
el càncer de mama.

A les meves pacients,  
que m'han ensenyat a continuar lluitant dia rere dia.

Sense vosaltres no hauria estat possible.

Gràcies.



---

## **FINANCIACIÓN**

Esta tesis ha sido financiada por:

- La beca del programa PERIS PhD4MD del Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, exp SLT008/18/00122 (2019 – 2022).
- La Cátedra de Innovación en Oncología de Precisión.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABLAS	20
GLOSARIO / ABREVIATURAS	22
TESIS EN FORMATO DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES	23
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN AL CÁNCER DE MAMA</b>	<b>27</b>
1.1 Epidemiología	27
1.2 Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama	28
1.3 Subtipos intrínsecos del cáncer de mama	30
1.4 Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs)	33
<b>2. CÁNCER DE MAMA HER2+ PRECOZ</b>	<b>36</b>
2.1 Bases biológicas del cáncer de mama HER2+ precoz	36
2.2 Generalidades del tratamiento del cáncer de mama HER2+	38
2.3 Tratamiento del cáncer de mama precoz HER2+	38
2.4 Estrategias de desescalada	43
2.5 Biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta para optimizar la desescalada.	48
<b>3. CÁNCER DE MAMA RRHH+ Y HER2 NEGATIVO</b>	<b>54</b>
3.1 Bases biológicas del cáncer de mama RRHH+/HER2-	54
3.2 Tratamiento estándar del cáncer de mama RRHH+/HER2- estadio precoz	56
3.3 Sobretratamiento de las pacientes con cáncer de mama RRHH+/HER2- precoz	62
3.5 Tratamiento (neo)adyuvante con inhibidores de CDK4/6	72
<b>4. NECESIDAD DE IDENTIFICAR BIOMARCADORES DE DESESCALADA PARA UNA ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN</b>	<b>80</b>

<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>83</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>87</b>
<b>IV. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS</b>	<b>91</b>
PRIMER ARTÍCULO	93
SEGUNDO ARTÍCULO	103
TERCER ARTÍCULO – NO PUBLICADO	115
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>137</b>
DISCUSIÓN GENERAL	139
5.1 Desescalada de tratamiento en cáncer de mama HER2+	140
5.2 Desescalada de tratamiento en cáncer de mama RRHH+/HER2- en pacientes premenopáusicas	143
5.3 Desescalada de tratamiento en pacientes menopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama precoz RRHH+/HER2- Luminal B por PAM50	146
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>





# Lista de Figuras

---

## FIGURA 1

Incidencia y muerte relacionada con el cáncer de mama A. Estimación en Estados Unidos en 2023 (Adaptado de Siegel R., et al; *CA Cancer J Clin*, 2023). B. Evolución temporal de las tasas de incidencia a nivel mundial en mujeres entre 2003 y 2023 \_\_\_\_\_ 28

## FIGURA 2

Clasificación IHQ de los diferentes subtipos del cáncer de mama. (Adaptado de *Rivenbark AG., et al; Am J Pathol.*, 2013) \_\_\_\_\_ 29

## FIGURA 3

Guía ASCO/CAP para la determinación de HER2 (Adaptado de Wolff AC., et al; *J Clin Oncol.*, 2023) \_ 30

## FIGURA 4

*Heatmap* donde se observan los diferentes niveles de expresión de los 50 genes utilizados para identificar los subtipos intrínsecos (Extraído de Prat A et al; *The Breast*, 2105) \_\_\_\_\_ 31

## FIGURA 5

Diferencias en la supervivencia en función del subtipo intrínseco (Extraído de Prat A., et al; *Breast Cancer Research*, 2010) \_\_\_\_\_ 31

## FIGURA 6

Imagen H/E de la determinación de TILs en dos muestras de cáncer de mama Luminal. A. Alta infiltración por TILs. B. Baja infiltración por TILs (Cortesía de Dra. B. González-Farré) \_\_\_\_\_ 33

## FIGURA 7

Tinción IHQ del receptor HER2. A. HER2 3+ (positivo). B. HER2 2+ (Equívoco). C. HER2 1+ (negativo). (Adaptado de Hicks D. and Schiffhauer L., *Laboratoy Medicine*, 2011) \_\_\_\_\_ 36

## FIGURA 8

Vía de señalización del receptor HER2. (Adaptado de Rimawi M.F., et al; *Annu, Rev Med*, 2015) \_\_ 37

## FIGURA 9

Mecanismo de acción de los diferentes fármacos anti-HER2 \_\_\_\_\_ 38

## FIGURA 10

SLE en función del estado de pCR posterior a tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama HER2+ precoz (Adaptado de Cortazar P., et al; *Lancet*, 2014) \_\_\_\_\_ 42

<b>FIGURA 11</b>	
Principales efectos secundarios del tratamiento con quimioterapia (Adaptado de Kuderer M., et al; <i>Nat. Rev.</i> , 2022)	43
<b>FIGURA 12</b>	
Diferentes subtipos intrínsecos representados en el cáncer de mama HER2+. (Adaptado de Prat A, Pascual T. y Adamo B., <i>Oncotarget</i> , 2017)	48
<b>FIGURA 13</b>	
Porcentaje de pCR alcanzado tras realizar tratamiento neoadyuvante anti-HER2 con o sin quimioterapia en función de subtipos intrínsecos (Adaptado de Cejalvo JM., et al; <i>Cancer Treat. Rev.</i> , 2018)	49
<b>FIGURA 14</b>	
Niveles del gen ERBB2 por ARNm según el estado IHQ de HER2 (Adaptado de Schettini F. y Prat A., <i>The Breast</i> , 2021)	50
<b>FIGURA 15</b>	
Capacidad de predicción de pCR de A. TILs determinados a día 15. B. Celularidad tumoral determinada a día 15 C. CelTIL score determinado a día 15. (Adaptado de Nuciforo P., et al; <i>Ann. Oncol.</i> , 2018).	53
<b>FIGURA 16</b>	
Vía de señalización del receptor de estrógeno (RE $\alpha$ ). A. Vía clásica/genómica. B. vía no-clásica/genómica. C. Vía no genómica. D. Vía independiente de estrógenos. E2 = 17 $\alpha$ -estradiol; Co-Reg= proteínas co-reguladores (pueden ser coactivadores o o coinhibidoras); FT= Factor de transcripción; P = Fosforilación; ER = Elementos de respuesta a otros factores de transcripción. (Adaptada de Le Romancer M., et al; <i>Endocrine Reviews</i> , 2011)	55
<b>FIGURA 17</b>	
Mecanismo de generación de estradiol tanto en pacientes premenopáusicas como menopáusicas (Adaptado de Fallowfiel L., <i>Eur. J. Oncol. Nurs.</i> , 2004)	55
<b>FIGURA 18</b>	
Supervivencia de los diferentes subtipos determinados por IHQ del cáncer de mama. (Adaptado de Parise C., et al; <i>The Breast Journal</i> , 2009)	58

---

**FIGURA 19**

Recurrencia (a distancia, local o contralateral) y mortalidad del cáncer de mama por edades (<50 o 50-69 años) en función de tratamiento con o sin quimioterapia (Adaptado de EBCTCG, *The Lancet*, 2005)\_\_\_\_\_59

**FIGURA 20**

Diseños de los 3 estudios fases III, MINDACT, TAILORx y RxPONDER (Adaptado de Piccart M., et al; *Ann. Oncol.*, 2021)\_\_\_\_\_63

**FIGURA 21**

Recuperación de la función ovárica A. En función de la edad. B. En función del tipo de quimioterapia. AC = doxorubicina más ciclofosfamida; ACT= doxorubicina más ciclofosfamida más palictaxel; CMF= ciclofosfamida más metotrexate más fluorouracilo; ACD = doxorubicina más ciclofosfamida más docetaxel (Adaptado de Petrek J.A et al ; *J Clin Oncol.*,2006)\_\_\_\_\_70

**FIGURA 22**

Supervivencia libre de enfermedad y Supervivencia global y en función de la recuperación de la función ovárica tras recibir tratamiento con quimioterapia adyuvante (Adaptado de Swain S., et al; *N Engl J Med.*,2010)\_\_\_\_\_71

**FIGURA 23**

Diseño del estudio fase II CORALEEN (NCT03248427)\_\_\_\_\_78

**FIGURA 24**

Resultados del objetivo primario del ensayo clínico CORALLEEN(NCT03248427), mediante el descenso de ROR por Prosigna en los dos brazos de tratamiento (Adaptado de Gavilà JM., et al; SABCS oral presentation, 2019)\_\_\_\_\_78

# Lista de Tablas

---

## TABLA 1

Consenso internacional de expertos de Saint Gallen de 2013 (Untch M., et al; *Breast Care*, 2013)\_\_\_28

## TABLA 2

Alteraciones genómicas asociadas a subtipos intrínsecos realizada por el TGCA. amp = amplificación; mut = mutación; del=delección (Extraído de TGCA, *Nature*, 2012)\_\_\_\_\_32

## TABLA 3

Estudios de desescalada de tratamiento en neoadyuvancia. D+C+TTZ+PTZ = Docetaxel, Carboplatino, Trastuzumab, Pertuzumab; P= Paclitaxel; TTZ = Trastuzumab; PTZ=Pertuzumab. (Adaptado de Tarantino P., Tolaney S., et al; *ASCO daily News*, 2022)\_\_\_\_\_45

## TABLA 4

Estudios de desescalada de tratamiento en neoadyuvancia. D+C+TTZ+PTZ = Docetaxel, Carboplatino, Trastuzumab, Pertuzumab; P= Paclitaxel; TTZ = Trastuzumab; PTZ=Pertuzumab. (Adaptado de Tarantino P., Tolaney S., et al; *ASCO daily News*, 2022)\_\_\_\_\_45

## TABLA 5

Estudios que compararon la duración del tratamiento con trastuzumab adyuvante (Adaptado de Metzger Filho O. and Burstein H.J, *Ann. Oncol.*, 2018)\_\_\_\_\_46

## TABLA 6

Ensayos clínicos neoadyuvantes en cáncer de mama HER2+ que utilizaron esquemas libres de quimioterapia. TTZ = Trastuzumab; PTZ= Pertuzumab\_\_\_\_\_47

## TABLA 7

Diferentes ensayos clínicos que añadieron SFO a tratamiento con tamoxifeno en monoterapia y su asociación con SLE y SG. SFO= Supresión de la función ovárica. HR = Hazard ratio\_\_\_\_\_61

## TABLA 8

Diferencias entre las plataformas MammaPrint y Oncotype en cuanto su objetivo primario en función de la edad (pacientes > 50 años o ≤ 50 años) o . SLEi = Supervivencia libre de enfermedad invasiva; QMT = quimioterapia\_\_\_\_\_68

## TABLA 9

Estudios adyuvantes con diferentes esquemas de tratamiento con iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2-. SLEi = intervalo supervivencia libre de enfermedad invasiva. (Adaptada de Agostinetti E., et al; *ESMO open*, 2021)\_\_\_\_\_73

---

**TABLA 10**

Estudios neoadyuvantes con diferentes esquemas de tratamiento con iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2- en comparación con ET. CCCA = arresto celular completo \_\_\_\_\_75

**TABLA 11**

Estudios neoadyuvantes con diferentes esquemas de tratamiento con iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2- en comparación con ET. CCCA = arresto celular completo \_\_\_\_\_76

# GLOSARIO / ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ASCO/CAP	<i>American society of clinical oncology/college of american pathology</i>
CCCA	Arresto celular completo (Siglas en ingles: complete cell-cycle arrest)
CK	Citoqueratina
ET	Endocrinoterapia
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEVi	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
H/E	Hematoxilina-eosina
HER2	Factor de crecimiento epidémico humano tipo 2
HER2+	HER2 positivo
HER2-	HER2 negativo
HER2-E	HER2-enriched
HR	<i>Hazard ratio</i>
IA	Inhibidor de la aromatasa
ICI	<i>Immune checkpoint inhibitors</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
iCKD4/6	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6
IKWG	<i>The international Ki67 in breast cancer working group</i>
ISH	<i>In situ hybridation</i>
iSLE	Intervalo de supervivencia libre de enfermedad
pCR	<i>Pathologic complete response</i>
PD-L1	<i>Programmed Ddeath-ligand 1</i>
RE	Receptor de estrógeno
RE+	Receptor de estrógeno positivo
ROR	<i>Risk of relapse</i>
RP	Receptor de progesterona
RRHH	Receptores hormonales
SERM	Modulador selectivo del receptor de estrógenos
SFO	Supresión de la función ovárica
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLP	Supervivencia libre de progresión
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
T-DXd	Trastuzumab - deruxtecan
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor
TK	Tirosina-quinasa
TMB	<i>Tumor mutational burden</i>
TN	Triple negativo

# Tesis en formato de compendio de publicaciones

---

Esta tesis consta de 2 artículos publicados y un artículo no publicado que tratan de resolver un objetivo común con un total de 10 objetivos específicos. El objetivo principal de esta tesis es realizar una caracterización molecular mediante expresión génica, así como la determinación de linfocitos infiltrantes de tumor en diferentes cohortes de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz RRHH-positivo y/o HER2-positivo previo y posterior al tratamiento para identificar biomarcadores que puedan ayudar a la desescalada de tratamiento (neo)adyuvante.

## PRIMER ARTICULO

---

### **Tumor cellularity and infiltrating lymphocytes as a survival surrogate in HER2-positive breast cancer**

Núria Chic, Stephen J Luen, Paolo Nuciforo, Roberto Salgado, Degbora Fumagalli, Florentine Hilbers, Yingbo Wang, Evandro de Azambuja, Itsván Láng, Serena Di Cosimo, Cristina Saura, Jens Houbert, Aleix Prat and Sherene Loi.

*Journal of the National Cancer Institute*, Volume 114, Issue 3, March 2022, Pages 467–470

PMID: 3378790; PMCID: PMC8902438; doi: 10.1093/jnci/djab057

Factor de impacto JCR 2022: 11.816

Cuartil: Q1

Área de conocimiento: Oncology

## SEGUNDO ARTICULO

---

### **Oestrogen receptor activity in hormone-dependent breast cancer during chemotherapy**

Núria Chic, Francesco Schettini, Fara Brasó-Maristany, Esther Sanfeliu, Barbara Adamo, Maria Vidal, Débora Martínez, Patricia Galvan, Blanca González-Farré, Javier Cortés, Joanquín Gavilá, Cristina Saura, Mafalda Oliveira, Sònia Pernas, Olga Martínez-Saez, Jesús Soberino, Eva Ciruelos, Lisa A Carey, Montserrat Muñoz, Charles M Perou, Tomás Pascual, Meritxell Bellet, Aleix Prat.

EBioMedicine Volume 69, July 2021,103451. PMID: 34161883; PMCID: PMC8233691; doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103451

Factor de impacto JCR 2021: 11.205

Cuartil: Q1

Área de conocimiento: Medicine, research and experimental

## TERCER ARTICULO - NO PUBLICADO

---

### **Gene expression profiling and immune response following neoadjuvant ribociclib plus letrozole versus chemotherapy in Luminal B early breast cancer: a correlative analysis of the SOLT1-1402/CORALLEEN phase 2 randomized trial**

TRABAJO NO PUBLICADO





# **I. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN AL CÁNCER DE MAMA


## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado a nivel mundial. La organización mundial de la salud estima que en 2021 se diagnosticaron un total de 2,261,419 nuevos casos de cáncer de mama en el mundo (representando un 12% del total de diagnósticos), con aproximadamente un 7% de las muertes por cáncer, situándose entre la primera y segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres en los últimos años (Figura 1)<sup>1,2</sup>.


En España, durante el año 2022, se estimó que se diagnosticaron más de 34,500 cánceres de mama, siendo la primera causa de mortalidad en mujeres por cáncer. Además, los datos apuntan a un aumento de incidencia estimándose que en 2023 se llegará a aproximadamente 35,000 nuevos diagnósticos<sup>1,3</sup>.

A.

### Estimación de nuevos casos

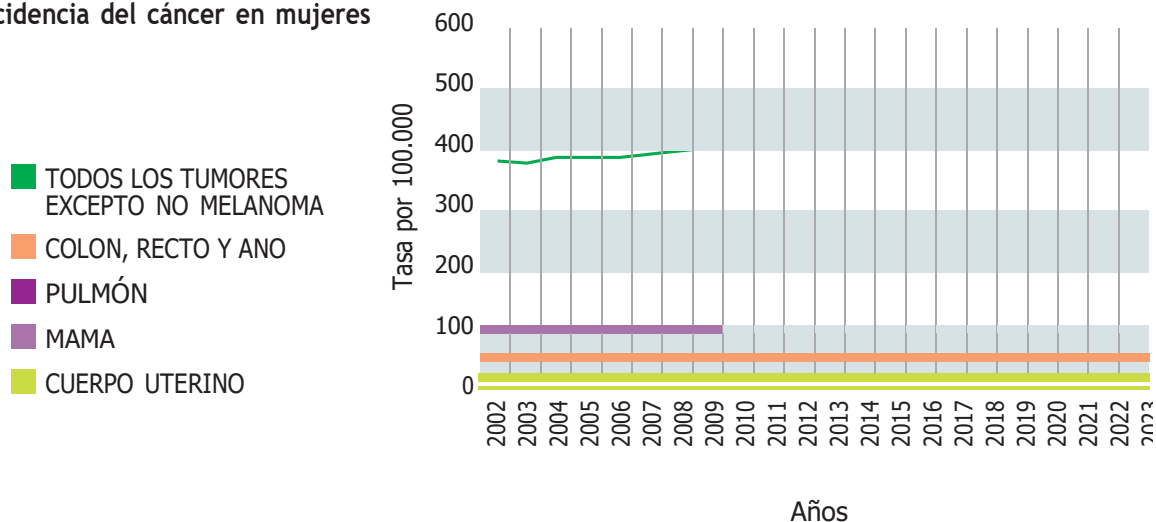
Prostate	288,300	29%		Breast	297,790	31%
Lung & bronchus	117,550	12%		Lung & bronchus	120,790	13%
Colon & rectum	81,860	8%		Colon & rectum	71,160	8%
Urinary bladder	62,420	6%		Uterine corpus	66,200	7%
Melanoma of the skin	58,120	6%		Melanoma of the skin	39,490	4%
Kidney & renal pelvis	52,360	5%		Non-Hodgkin lymphoma	35,670	4%
Non-Hodgkin lymphoma	44,880	4%		Thyroid	31,180	3%
Oral cavity & pharynx	39,290	4%		Pancreas	30,920	3%
Leukemia	35,670	4%		Kidney & renal pelvis	29,440	3%
Pancreas	33,130	3%		Leukemia	23,940	3%
All Sites	1,010,310	100%		All Sites	948,000	100%

### Muertes estimadas

Lung & bronchus	67,160	21%		Lung & bronchus	59,910	21%
Prostate	34,700	11%		Breast	43,170	15%
Colon & rectum	28,470	9%		Colon & rectum	24,080	8%
Pancreas	26,620	8%		Pancreas	23,930	8%
Liver & intrahepatic bile duct	19,000	6%		Ovary	13,270	5%
Leukemia	13,900	4%		Uterine corpus	13,030	5%
Esophagus	12,920	4%		Liver & intrahepatic bile duct	10,380	4%
Urinary bladder	12,160	4%		Leukemia	9,810	3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,780	4%		Non-Hodgkin lymphoma	8,400	3%
Brain & other nervous system	11,020	3%		Brain & other nervous system	7,970	3%
All Sites	322,080	100%		All Sites	287,740	100%

## B.

### Incidencia del cáncer en mujeres



**Figura 1.** Incidencia y muerte relacionada con el cáncer de mama **A.** Estimación en Estados Unidos en 2023 (Adaptado de Siegel R., et al; *CA Cancer J Clin*, 2023). **B.** Evolución temporal de las tasas de incidencia a nivel mundial en mujeres entre 2003 y 2023.

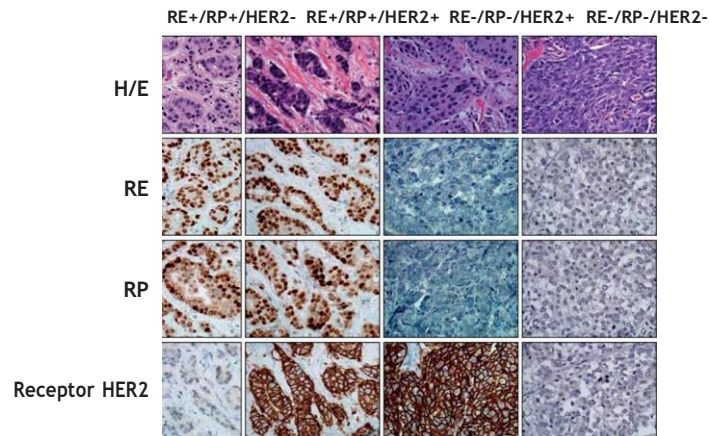
## 1.2 CLASIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se clasifica en función de diferentes biomarcadores patológicos, que permiten establecer diferencias en cuanto a pronóstico y tratamiento. La técnica más comúnmente utilizada para identificar estos biomarcadores es la inmunohistoquímica (IHQ) mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H/E). Esta técnica permite evaluar el receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (PR) y la sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2)<sup>4,5</sup>.

En función de la expresión de los receptores hormonales (RRHH), RE y RP, y de la sobreexpresión del receptor de HER2 se puede clasificar el cáncer de mama en 4 grupos principales que fueron definidos en el consenso de Saint Gallen del 2013 (Tabla 1, Figura 2)<sup>6</sup>. Éstos son de gran utilidad en la práctica clínica habitual, ya que aportan información pronóstica independiente y guiarán el tratamiento más adecuado<sup>7</sup>.

SUBTIPO IHQ	CARACTERÍSTICAS	SUBTIPO IHQ	CARACTERÍSTICAS
Luminal A-like	RE y/o RP positivos HER2 negativo Ki67 bajo (<20 %)	HER2 positivo	RE y RP positivos/negativos HER2 amplificado Cualquier Ki67
Luminal B-like	RE y/o RP positivo HER2 negativo Ki67 alto (≥20 %) RP negativo o bajo	Triple negativo	RE y RP negativos HER2 negativo Cualquier Ki67

**Tabla 1.** Consenso internacional de expertos de Saint Gallen de 2013 (Untch M., et al; *Breast Care*, 2013).



**Figura 2.** Clasificación IHQ de los diferentes subtipos del cáncer de mama. (Adaptado de *Rivenbark AG., et al; Am J Pathol., 2013*).

### » 1.2.1 Expresión de receptores hormonales: RE y RP

Aproximadamente el 70% de los cánceres de mama diagnosticados presentarán positividad de los RRHH<sup>8</sup> conformando un subgrupo de tumores que serán sensibles, aparentemente, a terapia hormonal<sup>9</sup>. Por este motivo, la determinación de la expresión del RE como RP será esencial para realizar un correcto abordaje y tratamiento. Para determinar la expresión de los RRHH, hay que valorar la expresión de las proteínas nucleares RE y RP mediante la tinción de IHQ. Según las guías *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathology (ASCO/CAP)*, se consideran positivos en aquellas muestras tumorales que presenten una positividad en la expresión de RE/RP entre el 1%-100%<sup>5</sup>.

### » 1.2.2 Determinación de la expresión del receptor de HER2

La amplificación y/o sobreexpresión de HER2 se encuentra aproximadamente en el 15-20% de los cánceres de mama<sup>10</sup> y se considera un factor pronóstico y predictivo a tratamiento anti-HER2<sup>11</sup>. Para realizar una correcta determinación de éste, se utilizan las guías ASCO/CAP donde se indica que se considera una expresión positiva si se observa una tinción circunferencial de la membrana celular, intensa y completa en >10% de las células tumorales, esto se denomina HER2 3+. Sin embargo, hay otras situaciones donde también se considera positivo, como la observación de una tinción leve o moderada de la membrana en >10% de las células tumorales. En este caso, se considera una tinción HER2 2+ equívoca por lo que se debe realizar una técnica de *ISH* (hibridación in situ) donde se determinará como positivo si el número de copias de HER2 es  $\geq 6.0$ , o si la ratio HER2/cromosoma 17 es  $>2$  y las copias del HER2  $\geq 4$ , o HER2/Cromosoma 17  $<2$  y copias del HER2  $\geq 6$ <sup>4</sup> (**Figura 3**).

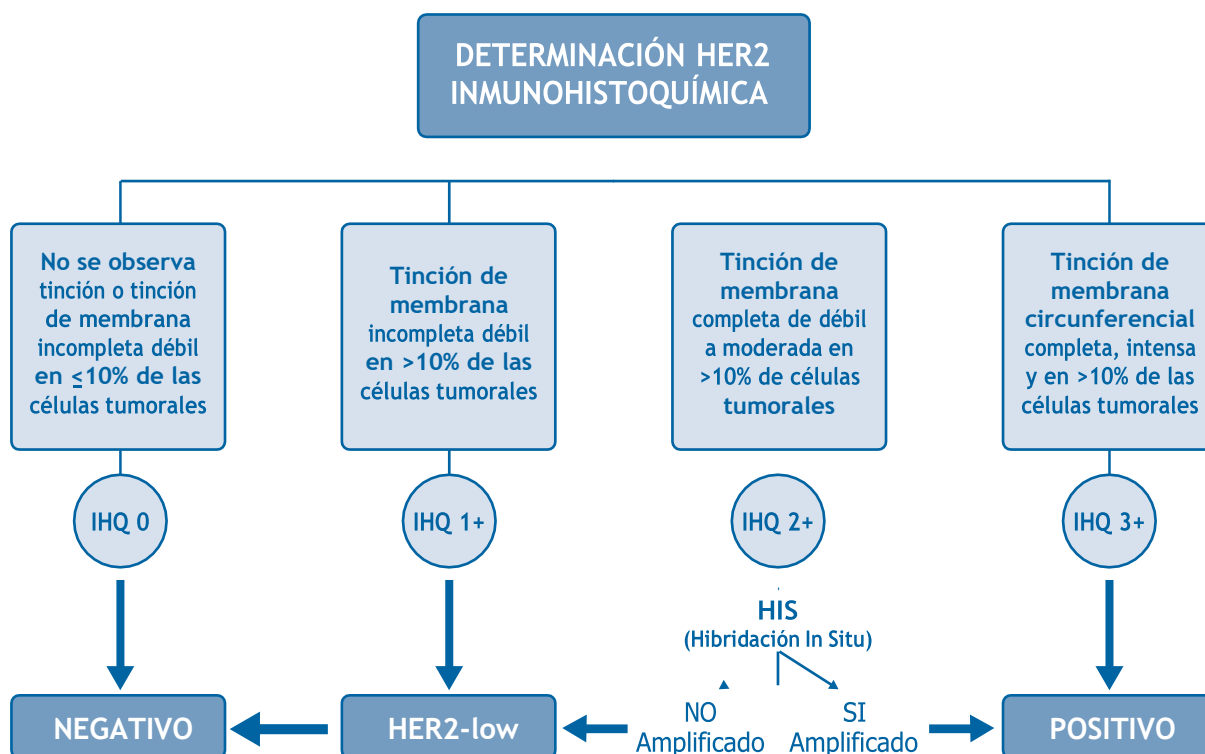


Figura 3. Guía ASCO/CAP para la determinación de HER2 (Adaptado de Wolff AC., et al; *J Clin Oncol.*, 2023).

### » 1.2.3 Índice de proliferación Ki67

La determinación del marcador de proliferación Ki67 por IHQ puede ser útil para mejorar la clasificación, sobre todo en los tumores luminales. Tumores con una alta proliferación (un mayor Ki67) acostumbran a tener un peor pronóstico y pueden llegar a presentar un mayor beneficio al tratamiento con quimioterapia<sup>12-14</sup>.

Sin embargo, la determinación del Ki67 tiene algunos inconvenientes. Por un lado, establecer el umbral a partir del cual se definirá la alta o baja proliferación del tumor. En el consenso de Saint Gallen de 2015 se estableció un punto de corte del 20%<sup>15</sup>, mientras que otros datos sugieren que el punto de corte más aproximado se situaría alrededor del 14%<sup>16,17</sup>. Además, existe una gran variabilidad inter-laboratorio, lo que hace que el Ki67 sea un valor poco reproducible<sup>18</sup>. Todo ello ha llevado a que, hoy en día, a pesar de que es bastante utilizado como marcador, tanto el grupo *The International Ki67 in Breast Cancer Working Group* (IKWG) como las guías ASCO (siglas en inglés *American Society of Clinical Oncology*) no aconsejen la utilización del Ki67 por sí solo como criterio para la desescalada de tratamiento con quimioterapia<sup>18,19</sup>.

## 1.3 SUBTIPOS INTRÍNSECOS DEL CÁNCER DE MAMA

La determinación de los diferentes receptores de forma IHQ es utilizada en la práctica clínica habitual para clasificar y determinar el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, dentro del mismo subtipo IHQ no todos los tumores presentan el mismo comportamiento, mostrando diferencias tanto en sensibilidad a tratamientos como en supervivencia<sup>20</sup>. Esta heterogeneidad podría explicarse

por diferentes patrones de expresión génica identificados en el año 2000 por C.M.Perou. En este trabajo seminal, se observó que, en función del nivel de expresión de diferentes genes, se podía clasificar el cáncer de mama en 4 subtipos diferentes, denominados subtipos intrínsecos del cáncer de mama, siendo éstos: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched (HER2-E) y Basal-like<sup>21,22</sup>, y un subtipo normal-like (Figura 4). Este estudio, demostró los diferentes procesos biológicos que gobiernan cada uno de los subtipos intrínsecos y, además, observó que existían diferencias importantes entre ellos a nivel de incidencia<sup>(23)</sup>, de predicción a respuesta a tratamientos<sup>24-27</sup> y a nivel pronóstico independientemente del subtipo definido por IHQ<sup>28,29</sup> (Figura 5).

Posteriormente, el grupo de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), realizó una caracterización molecular exhaustiva de los diferentes subtipos intrínsecos identificando diferencias en alteraciones genómicas entre ellos<sup>30</sup> (Tabla 2). Una de las principales diferencias que se observó entre los subtipos Luminales y no Luminales fue que la tasa global de mutaciones resultó más baja en el subtipo Luminal A y más alta en los subtipos Basal-like y HER2-E.

Los subtipos Luminales corresponden a los tumores que presentan una expresión positiva de receptores hormonales (RE +/- RP). En general, se trata de un subtipo donde los tumores son de bajo grado y menos del 20% presentan mutaciones en *TP53*.

El subtipo Luminal se puede clasificar en Luminal A y Luminal B. Las diferencias entre los dos subtipos luminales radican en que el

subtipo Luminal A presentan una alta expresión de RE y de genes relacionados con la vía del RE mientras que en el subtipo Luminal B la expresión de RE y de genes relacionados es moderada y menor. Además, el subtipo Luminal A presenta una baja expresión de genes relacionados con HER2 y proliferación, incluido el Ki67, a diferencia del Luminal B donde se observa una expresión variable de los genes relacionados con la proliferación. Los genes más frecuentemente mutados en el Luminal A

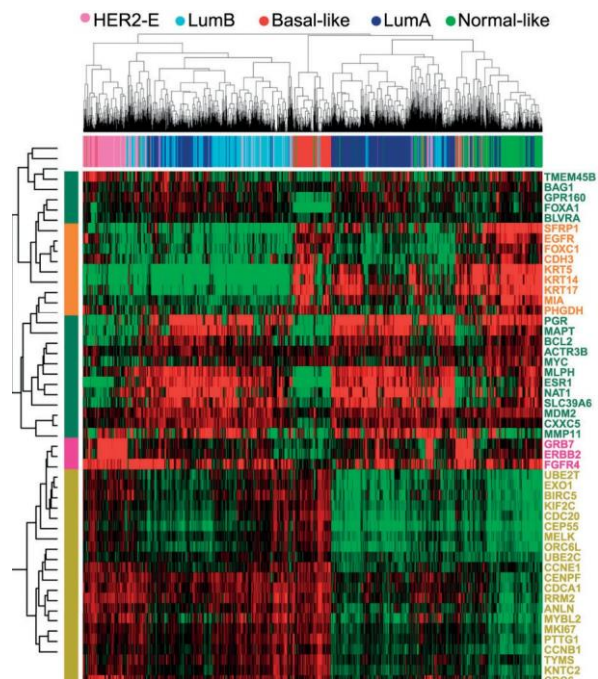


Figura 4. Heatmap donde se observan los diferentes niveles de expresión de los 50 genes utilizados para identificar los subtipos intrínsecos (Extraído de Prat A et al; *The Breast*, 2105).

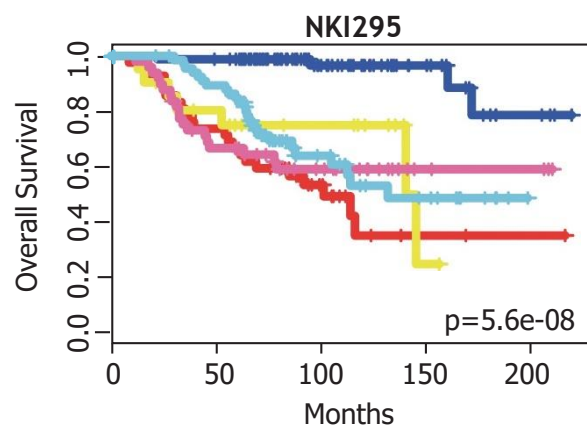


Figura 5. Diferencias en la supervivencia en función del subtipo intrínseco (Extraído de Prat A., et al; *Breast Cancer Research*, 2010).

son *PIK3CA* (45%), seguido de *MAP3K1*(13%), *GATA3* (14%), *TP53* (12%), *CDH1* (9%) y *MAP2K4*(7%). El Luminal B presenta una mayor frecuencia de mutaciones en *TP53* (29%) y menor en *PIK3CA* (29%) en comparación el subtipo Luminal A y además está relacionado con un peor pronóstico, ya que este subtipo tiene un mayor riesgo de recurrencia local y a distancia<sup>31</sup>. A pesar de las diferencias en el número y selección de genes analizados en los distintos perfiles de expresión, en todos ellos se ha demostrado que el subtipo Luminal A representa el fenotipo de mejor pronóstico, así como el más sensible a tratamientos hormonales<sup>32,33</sup>.

El subtipo HER2-E representa el 10-20% de los tumores de mama y se caracteriza por la alta expresión de los genes relacionados con *ERBB2* y/o *FGFR4*, genes implicados en el ciclo celular, y la baja expresión de los genes relacionados con los receptores hormonales. A nivel de ADN, estos tumores muestran el mayor número de mutaciones en todo el genoma, y el 72% y el 39% de los tumores HER2-E presentan mutaciones en *TP53* y *PIK3CA*, respectivamente.

SUBTIPO INTRÍNSECO	LUMINAL A	LUMINAL B	BASAL-LIKE	HER2-E
VÍA TP53	TP53 mut. (12%); amp. de MDM2 (14%)	TP53 mut. (32%); amp. de MDM2 (31%)	TP53 mut. (84%); amp. de MDM2 (14%)	TP53 mut.(75%); amp. de MDM2 (30%)
PIK3CA/PTEN	PIK3CA mut. (49%); PTEN mut/del. (13%); INPP4B delección (9%)	PIK3CA mut. (32%); PTEN mut/del. (24%); INPP4B pérdida (16%)	PIK3CA mut. (7%); PTEN mut/del. (35%); INPP4B delección (30%)	PIK3CA mut. (42%); PTEN mut/del. (19%); INPP4B delección (30%)
VÍA RB1	Amp. Ciclina D1 (29%); amplificación CDK4 (14%)	Amp. Ciclina D1 (58%); amplificación CDK4 (25%)	RB1 mut/delección (20%); Amp. Ciclina E1 (9%)	Amp. ciclina D1 (38%); Amp. CDK4 (24%).
EXPRESIÓN MRNA	Alta expresión de RB; alta expresión del cluster RE; baja proliferación	Baja expresión del cluster de RE; Alta proliferación	Alta expresión RB1; Firma basal-like; Alta proliferación	Firma HER2 sobreexpresada; Alta proliferación
NÚMERO DE COPIAS	Mayoría diploide	Mayoría aneuploide	Mayoría aneuploide; Alta inestabilidad genómica	Mayoría aneuploide; Alta inestabilidad genómica
MUTACIONES DNA	PIK3CA (49%); TP53 (12%); GATA3 (14%); MAP3K1(14%)	TP53(32%); PIK3CA (32%); MAP3K1(5%)	TP53 (84%); PIK3CA (7%)	ERBB2 amp (71%); TP53 (74%); PIK3CA (42%); PIK3R1 (8%).

Tabla 2. Alteraciones genómicas asociadas a subtipos intrínsecos realizada por el TGCA. amp = amplificación; mut = mutación; del=delección (Extraído de TGCA, *Nature*, 2012).

El subtipo Basal-like representa aproximadamente el 15% de los tumores de mama y se caracteriza por la escasa expresión de genes luminales y genes relacionados con la vía de HER2. Representa la mayor parte de tumores con ausencia expresión del RE, RP y HER2 determinado por IHQ. En este subtipo se



manifiesta un alto índice de mutaciones en *TP53* (80%). Como cabe esperar, su ausencia de expresión de RE y su alta capacidad de replicación, hacen de este subtipo el que conlleva el peor pronóstico.

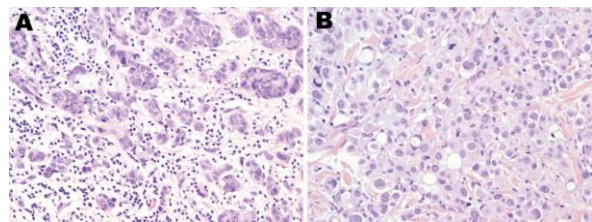
Finalmente, existe un pequeño grupo de tumores que serán clasificados como el subtipo Claudin-low. Se trata de un subtipo, que hoy en día, presenta poca relevancia clínica pero unas características histopatológicas y moleculares diferenciales. Las células tumorales presentan una baja expresión o ausencia de proteínas de adhesión célula-célula epiteliales (ej. claudina-3, claudina-4, claudina-7 y E-cadherina) además de una baja expresión de genes relacionados con la vía luminal y una alta expresión de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima. A nivel clínico son tumores que presentan un pronóstico agresivo, ya que clásicamente se han relacionado con tumores triple negativo (TN), carcinomas medulares, metaplásicos y tumores filoides malignos, con un pronóstico similar a los subtipos no-luminales (**Figura 5**)<sup>32,34</sup>.

Actualmente, los perfiles moleculares del cáncer de mama no han sustituido a los métodos diagnósticos convencionales (más bien constituyen un complemento de éstos). Ahora bien, estos perfiles genómicos sí que han contribuido a un mejor entendimiento de la biología del cáncer de mama y, un cambio en el diseño de los ensayos clínicos y en la toma de decisiones terapéuticas, sobre todo respecto al uso de quimioterapia (neo)adyuvante.

#### 1.4 LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILS)

La interacción entre el sistema inmune y las células cancerígenas se ha convertido en un punto clave para la progresión tumoral<sup>35,36</sup>. A lo largo de los años se ha ido acumulando evidencia indicando una asociación entre el infiltrado linfocitario y su papel predictivo y pronóstico en el cáncer de mama por lo que su determinación cada vez se está implementando más en la práctica clínica habitual<sup>37</sup>.

Desde hace más de dos décadas, se ha estudiado el papel predictivo y pronóstico de la infiltración por TILs en los diferentes subtipos de cáncer de mama<sup>38</sup>. Múltiples estudios han observado que cuanto mayor es la infiltración por TILs en la biopsia inicial mayor es la probabilidad de alcanzar una respuesta patológica completa (pCR) tras tratamiento con quimioterapia neoadyuvante<sup>39-43</sup>, siendo esta mayor cuanto mayor es la infiltración por TILs, especialmente



**Figura 6.** Imagen H/E de la determinación de TILs en dos muestras de cáncer de mama Luminal. **A.** Alta infiltración por TILs. **B.** Baja infiltración por TILs (Cortesía de Dra. B. González-Farré).

si se sitúa por  $\geq 60\%$ <sup>41,44</sup>(**Figura 6**). También ha sido muy estudiada la capacidad pronóstica de la infiltración por TILs, estando ésta independientemente relacionada con un mejor pronóstico en algunos subtipos<sup>44,45</sup>. Sin embargo, no todos los subtipos IHQ presentan la misma probabilidad de tener infiltración por TILs y esta infiltración tendrá diferentes implicaciones<sup>44</sup>.

##### » 1.4.1 Infiltración por TILs en cáncer de mama TN

El subtipo TN es el cáncer de mama con mayor porcentaje de infiltración por TILs en comparación con los subtipos luminales<sup>44,46</sup>. La capacidad predictiva de respuesta de la infiltración por TILs a tratamientos ha sido muy estudiada en la enfermedad TN tanto en el contexto metastásico como

precoz<sup>47</sup>. En general, se observa una mayor probabilidad de alcanzar pCR a mayor infiltración por TILs, tras un tratamiento basado en quimioterapia con o sin immune *checkpoint inhibitors* (ICI)<sup>41,48</sup>.

Ha sido también muy estudiado el impacto en el pronóstico de la infiltración por TILs en el cáncer de mama precoz, confirmado que una mayor infiltración por TILs basales mejora la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG), posterior a un tratamiento (neo)adyuvante<sup>44,49-51</sup>. Además, se ha observado un pronóstico excelente en cáncer de mama TN estadio I, con altos niveles de TILs (TILs  $\geq 30\%$ ) sin recibir ningún tipo de terapia sistémica<sup>52</sup>, incluso en pacientes muy jóvenes<sup>53</sup>.

En el 16th consenso de Saint Gallen se estableció como recomendación la determinación de los TILs en cáncer de mama TN en estadios precoces debido a la información pronóstica que pueden llegar a aportar. Sin embargo, no se recomienda su utilización para la elección del régimen de tratamiento (neo)adyuvante<sup>54</sup>.

#### » 1.4.2 Infiltración por TILs en cáncer de mama HER2-positivo

El cáncer de mama HER2-positivo (HER2+) es, junto con el TN, el que mayor infiltración por TILs presenta<sup>44,46</sup>. De forma similar a la enfermedad TN, la infiltración por TILs en cáncer de mama HER2+ tiene implicaciones predictivas y pronósticas.

Datos reportados por diferentes estudios han observado una mayor probabilidad de alcanzar una pCR, tras realizar tratamiento de quimioterapia neoadyuvante asociado o no a terapia anti-HER2, a mayor infiltración por TILs, especialmente cuando la infiltración por TILs es  $\geq 60\%$ <sup>55-57</sup>. Además, se confirmó su papel pronóstico con una mejor supervivencia en aquellos pacientes cuyos tumores presentan una mayor infiltración por TILs tratados con regímenes de quimioterapia asociado a terapia anti-HER2 en monoterapia<sup>50,58</sup>, o doble bloqueo HER2<sup>59,60</sup>. Recientemente, el estudio fase III Short-HER observó que a 5 años de seguimiento existía una mayor tasa de SLE en aquellos tumores que presentaban una infiltración por TILs  $\geq 20\%$ <sup>61</sup>.

#### » 1.4.3 Infiltración por TILs en cáncer de mama RRHH+/HER2-negativo

Clásicamente se ha considerado el cáncer de mama RRHH+/HER2-negativo (HER2-) como el subtipo menos inmunogénico<sup>45,62</sup>, siendo éste el que presenta un menor porcentaje de infiltración por TILs<sup>44,63</sup> y con una media de *Tumor Mutational Burden* (TMB) (el cual se correlaciona con la carga de neoantígenos) significativamente menor que el resto de los subtipos (de 1.1 mut/Mb), siendo de 1.8 mut/Mb y de 1.3 mut/Mb en TN y HER2+ respectivamente<sup>64</sup>.

Tanto el valor predictivo como el valor pronóstico de los TILs en este subtipo han presentado datos confusos y contradictorios. Mientras que existen estudios que indican que una mayor infiltración de TILs se encuentra relacionada con una mayor probabilidad de realizar una pCR (posterior a tratamiento neoadyuvante)<sup>44</sup> existe un metaanálisis posterior que no confirma esta asociación<sup>65</sup>. Un efecto parecido sucede en cuanto a su papel pronóstico. Mientras existen datos que indican que un aumento de TILs está relacionado con un peor pronóstico<sup>44,45</sup>, otros datos sugieren que presentar una mayor infiltración por TILs está relacionado con buen pronóstico cuando presentan un Ki67 alto<sup>66</sup> o en pacientes  $\leq 40$  años (Tesch M.E., et al; Abstract 505, *ASCO annual meeting*, 2023). Esta discrepancia en los resultados puede ser debida a la gran heterogeneidad de los estudios, ya que

pocas veces se ha realizado una clasificación del subtipo luminal cuando en realidad el subtipo luminal A (más dependiente de la vía estrogénica y menor proliferación) presenta una menor infiltración por TILs en relación con el subtipo luminal B<sup>67</sup>.

Con todo ello podemos afirmar que los datos de los que disponemos actualmente son contradictorios y poco concordantes por lo que no se recomienda su determinación ni como un factor pronóstico ni predictivo.

## 2. CÁNCER DE MAMA HER2+ PRECOZ

### 2.1 BASES BIOLÓGICAS DEL CÁNCER DE MAMA HER2+ PRECOZ

El cáncer de mama HER2+ precoz, representa aproximadamente el 15-20% de todos los cánceres de mama diagnosticados<sup>68</sup>. Este subtipo se caracteriza por la sobreexpresión del receptor HER2 en la superficie celular, siendo un mayor *driver* oncogénico<sup>69</sup> con vulnerabilidad terapéutica a los tratamientos anti-HER2<sup>11</sup>. La determinación de la sobreexpresión del receptor de HER2 se realiza mediante IHQ y/o otras técnicas de ISH utilizando el consenso de las guías ASCO/CAP (Figura 2 y Figura 7)<sup>4</sup>.

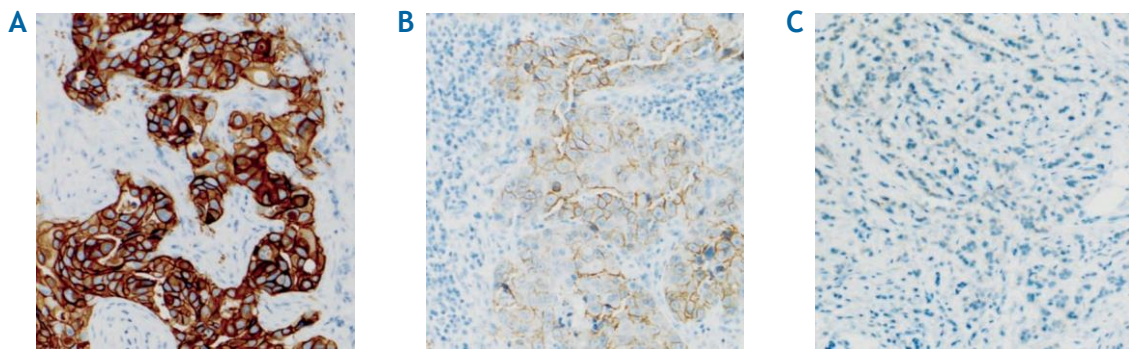


Figura 7. Tinción IHQ del receptor HER2. A. HER2 3+ (positivo). B. HER2 2+ (Equívoco). C. HER2 1+ (negativo). (Adaptado de Hicks D. and Schiffhauer L., Laboratory Medicine, 2011).

HER2 es una proteína codificada por el gen *ERBB2*, localizado en la región cromosómica 17q12 y pertenece a una familia de 4 receptores: HER1 (o más conocido como EGFR), HER2, HER3 y HER4. Estos receptores están compuestos por un dominio extracelular donde se unen los diferentes factores de crecimiento y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (TK). Esto es así en todos los miembros de la familia excepto por HER3, que no presentará actividad TK, y HER2, que es el único para el que no existe ningún ligando conocido. La activación del receptor HER2 dependerá de la unión con otro receptor, ya sea otro HER2 (homodimerización) o con otro miembro de la familia, EGFR, HER3 o HER4 (heterodimerización). Esta dimerización genera que el dominio TK desencadene una cascada de señalización intracelular activando diferentes vías importantes implicadas en la proliferación, migración, invasión y supervivencia celular<sup>70,71</sup> (Figura 8).

A lo largo de los años, se han desarrollado varios fármacos dirigidos contra el receptor de HER2 que, a través de diferentes estrategias, llevan al bloqueo de su función y consiguiente muerte celular. De entre las diferentes familias de fármacos destacan: los anticuerpos monoclonales, los inhibidores de la TK y, más recientemente los anticuerpos conjugados<sup>72</sup>.

Los anticuerpos monoclonales se unen a la parte extracelular del receptor HER2 impidiendo su dimerización, entre ellos destacan el trastuzumab y el pertuzumab. Mientras que el trastuzumab se une al dominio IV del receptor evitando su homodimerización inactivando la TK, el pertuzumab, se une al dominio II evitando su heterodimerización y consecuentemente la señalización intracelular<sup>72</sup>.

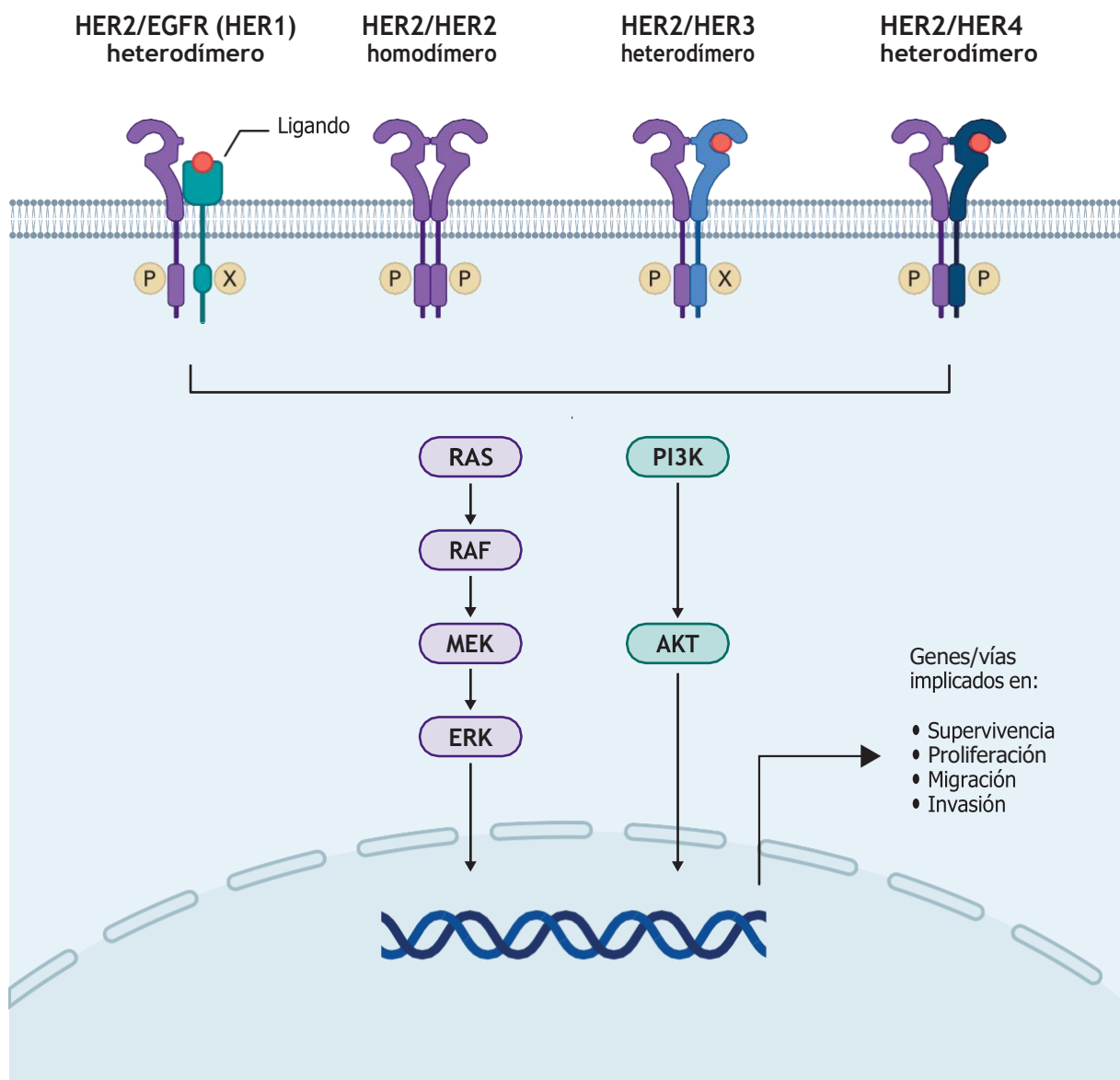


Figura 8. Vía de señalización del receptor HER2. (Adaptado de Rimawi M.F., et al; Annu, Rev Med, 2015).

Los inhibidores de la TK son otra familia de fármacos que actúan a nivel intracelular en la zona de unión del ATP inhibiendo la señalización y proliferación celular<sup>73</sup>. De entre los diferentes fármacos desarrollados destacan: el lapatinib, un inhibidor reversible de la TK que se une al receptor HER2, pero también a EGFR (HER1); neratinib un inhibidor irreversible que presenta afinidad por EGFR, HER2 y HER4; y tucatinib un inhibidor reversible de la TK específico de HER2.

Finalmente, los anticuerpos conjugados, como el T-DM1 o más recientemente el trastuzumab – deruxtecan (T-Dxd) entre otros. Estos fármacos están compuestos por una molécula de trastuzumab unida a varias moléculas de quimioterapia (3-4 moléculas de emtansina en el caso del T-DM1(74) o 7-8 moléculas de deruxtecan en el caso de T-Dxd<sup>75</sup>). Ambos fármacos se unen al dominio IV extracelular de HER2 y son internalizados juntamente con el receptor. Dentro de la célula, las moléculas de quimioterapia son liberadas causando la citotoxicidad celular<sup>76</sup> (Figura 9).

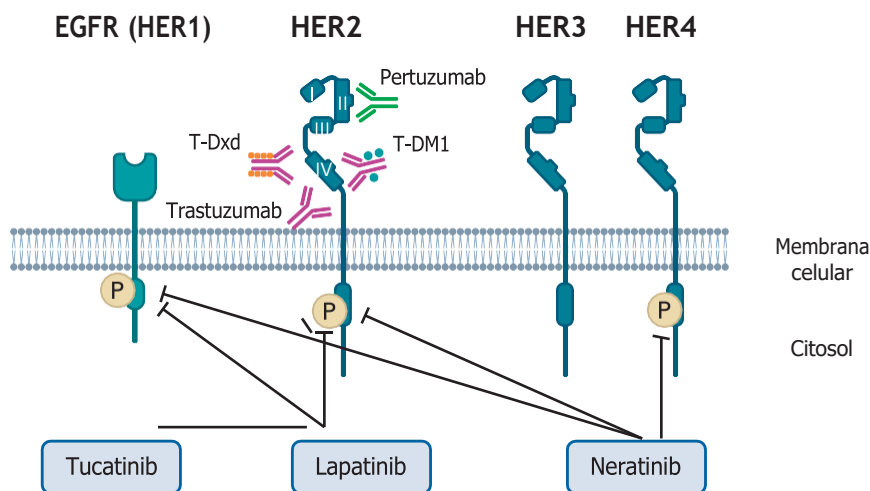


Figura 9. Mecanismo de acción de los diferentes fármacos anti-HER2.

## 2.2 GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA HER2+

Gracias a la introducción de los fármacos dirigidos contra HER2, el pronóstico de este subtipo de cáncer de mama ha sufrido cambios drásticos a lo largo de los años, aumentando su supervivencia y mejorando de forma sustancial la calidad de vida de las pacientes<sup>77</sup>.

El trastuzumab fue el primer anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor HER2 aprobado por las agencias del medicamento para tratar pacientes diagnosticadas de cáncer de mama metastásico HER2+. La combinación de quimioterapia más trastuzumab demostró una reducción relativa del riesgo de muerte del 20% y una reducción del riesgo de progresión de hasta un 50% situándose durante muchos años como el tratamiento estándar del cáncer de mama HER2+<sup>11</sup>. Posteriormente, con la aparición de los diferentes fármacos anti-HER2, el ensayo fase III CLEOPATRA, demostró que el doble bloqueo de HER2 mediante trastuzumab y pertuzumab asociado a quimioterapia resultaba más eficaz en términos de SLP y SG que el tratamiento únicamente con trastuzumab. Este estudio observó un aumento significativo de 6 meses en SLP (de 12.2 meses con trastuzumab a 18.7 meses con el doble bloqueo HER2; HR 0.69, 95% CI 0.59–0.81), y en aproximadamente 17 meses la SG (pasando de 40.8 meses a 57.1 meses con la adición de pertuzumab al tratamiento; HR 0.69, 95% CI 0.58–0.82)<sup>78</sup>.

Con todos estos datos, hoy en día, la combinación de trastuzumab con pertuzumab asociado a quimioterapia sigue siendo el régimen de elección en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama metastásico HER2+ en primera línea de tratamiento<sup>79,80</sup>.

## 2.3 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA PRECOZ HER2+

En el cáncer de mama precoz, el abordaje terapéutico es multidisciplinar, incluyendo: tratamiento local, cirugía y radioterapia, y un tratamiento sistémico que incluye quimioterapia asociada a terapia anti-HER2. Después de años de seguimiento, un metaanálisis que incluyó más de 13,000 pacientes ha confirmado el claro beneficio tanto en disminución de recurrencia como en mortalidad en la adición de trastuzumab a quimioterapia en el contexto (neo)adyuvante. Con un seguimiento de aproximadamente 10 años, se observó un descenso absoluto en un 9% del riesgo de recurrencia

(Rate Ratio 0.66, 95% CI 0.62-0.71;  $p < 0.0001$ ) y un 6.4% en el riesgo de muerte por cáncer de mama (Rate Ratio 0.67, 95% CI 0.61 – 0.73;  $p < 0.0001$ )<sup>81</sup>, siendo el beneficio de trastuzumab independiente al estado de RRHH, de afectación ganglionar y la edad<sup>81,82</sup>.

### » 2.3.1 Tratamiento adyuvante

Hace ya casi 2 décadas que múltiples estudios (entre ellos HERA, NSABP-31 y NCTGC N9831) demostraron y confirmaron el beneficio tanto en SLE como en SG de la adición de trastuzumab a tratamiento de quimioterapia convencional. Los ensayos NSABP B-31 y NCCTG N9831 (con más de 4,000 pacientes incluidos) observaron un aumento significativo de casi el 10% en SLE y SG a 10 años pasando de 62.2% a 73.7% (HR 0.60; 95% CI, 0.53 - 0.68;  $p < 0.001$ ) y de 75.2% al 84% (HR 0.63; 95% CI, 0.54 - 0.73;  $p < 0.001$ ) al añadir trastuzumab a la quimioterapia estándar respectivamente<sup>(83)</sup>. Además, en el ensayo HERA se observó que completar un año de tratamiento adyuvante con trastuzumab presentaba una reducción del riesgo relativo de un 25% tanto en SLE (HR 0.76; 95% CI 0.68–0.86) como en el riesgo de muerte (HR 0.74; 95% CI 0.64–0.86)<sup>84</sup>.

Con estos datos, se aprobó la combinación de tratamiento adyuvante mediante quimioterapia con trastuzumab seguida de trastuzumab durante un año, como tratamiento estándar en cáncer de mama HER2+ precoz, que fue el tratamiento utilizado durante muchos años.

Con la aparición de nuevos fármacos anti-HER2, junto con el aumento de beneficio en SLP y SG observados en el contexto metastásico con el doble bloqueo HER2, se llevaron a cabo múltiples estudios que testaban diferentes estrategias de combinaciones de doble bloqueo a nivel adyuvante. Las combinaciones más utilizadas fueron inicialmente con el inhibidor de la TK lapatinib y, posteriormente con el anticuerpo monoclonal pertuzumab asociados a trastuzumab.

Los datos observados más relevantes con el doble bloqueo HER2 mediante trastuzumab y lapatinib vienen del estudio fase III ALTTO donde no se observaron diferencias significativas en cuanto a SLE y SG con la adición del doble bloqueo más quimioterapia frente al bloqueo único de HER2<sup>85</sup>. Posteriormente, la combinación con pertuzumab más trastuzumab adyuvante, se exploró en el ensayo clínico fase III APHINITY. En este estudio se observó un discreto, pero estadísticamente significativo, beneficio en la SLE invasiva con adición de pertuzumab en comparación con placebo a ocho años de seguimiento, pasando de 88.4% a 85.8% con el doble bloqueo (HR 0.77; 95% CI 0.66 – 0.91). Este beneficio fue mayor cuando existía afectación ganglionar al diagnóstico, con un beneficio de casi el 5% (de 86.1% a 81.2% con pertuzumab versus placebo respectivamente; HR 0.72; 95% CI 0.60 – 0.87) independientemente del estado de los RRHH. Sin embargo, el estudio no observó diferencias a nivel de SG<sup>86</sup>.

En diciembre de 2017, la FDA (siglas en inglés para *Food and Drug Administration*) aprobó el tratamiento de trastuzumab más pertuzumab en combinación con quimioterapia en adyuvancia para pacientes con alto riesgo de recurrencia<sup>87</sup>.

Más recientemente, se han realizado estudios con anticuerpos conjugados como el T-DM1 y T-Dxd. El estudio fase III KAITLIN no observó beneficio en SLE invasiva cuando se realizó tratamiento adyuvante basado en antraciclinas más ciclofosfamida seguido de T-DM1 más pertuzumab en comparación

con el tratamiento estándar (antraciclinas más ciclofosfamida seguido de taxano, pertuzumab y trastuzumab)<sup>88</sup>. Sin embargo, a medida que el tratamiento neoadyuvante se posicionó como una de las opciones preferibles en el cáncer de mama HER2+ de alto riesgo, se desarrolló el ensayo clínico fase III KATHERINE. Este estudio aleatorizó las pacientes que presentaron enfermedad residual tras tratamiento neoadyuvante a recibir T-DM1 o trastuzumab de forma adyuvante. Los resultados mostraron que el tratamiento con T-DM1 aumentaba las tasas de SLE invasiva en prácticamente un 10% respecto al grupo del trastuzumab a 3 años de seguimiento (88.3% del grupo de TDM1 y el 77% el grupo de trastuzumab; HR 0.50; 95% CI 0.35-0.64,  $p < 0.001$ ). Con una disminución de recidiva del 11% versus el 4% en el grupo de TDM1 versus el grupo tratado con trastuzumab<sup>89</sup>. Con estos resultados, la FDA aprobó en 2019 el tratamiento con T-DM1 para pacientes con cáncer de mama HER2+ en estadio precoz con enfermedad residual posterior al tratamiento neoadyuvante<sup>90</sup>.

Actualmente se encuentra en reclutamiento el estudio fase III DESTINY-Breast05 (NCT 04622319), que valora el papel adyuvante del T-DXd en pacientes con cáncer de mama HER2+ de alto riesgo que presenten enfermedad residual tras haber recibido tratamiento neoadyuvante mediante un esquema de poliquimioterapia y terapia anti-HER2.

### » 2.3.2 El tratamiento neoadyuvante

El primer gran estudio que demostró que la adición de trastuzumab a quimioterapia aumentaba las tasas de pCR fue el estudio fase III NOAH, observando prácticamente el doble de pCR alcanzadas con la adición de trastuzumab al régimen de poliquimioterapia (pasando de 22% a 43% sin y con tratamiento anti-HER2 respectivamente)<sup>91</sup>. Además, se observó con un seguimiento a casi 5 años un aumento de SLE en las pacientes que recibieron trastuzumab en comparación con las que no (HR 0.64 CI 95% 0.44-0.93  $p = 0.016$ )<sup>92</sup>. A lo largo de los años se han llegado a realizar múltiples ensayos clínicos, donde se ha explorado el papel de trastuzumab asociado a quimioterapia reportándose, en todos ellos, un aumento significativo de las tasas de pCR cuando se añadía trastuzumab al régimen de poliquimioterapia estándar<sup>82,93,94</sup>.

Posteriormente, y como sucedió en el contexto adyuvante, también se exploraron combinaciones con diferentes anti-HER2 asociados a trastuzumab. El lapatinib y el pertuzumab fueron, de nuevo, los fármacos más utilizados en combinación con el trastuzumab para investigar este tratamiento a nivel neoadyuvante.

De los diferentes estudios que exploraron la combinación de tratamiento mediante lapatinib y trastuzumab hay que destacar dos grandes estudios fases III: el NeoALTTO y el CALGB 40601. En el primero, se observó una mayor tasa de pCR en el grupo de poliquimioterapia más doble bloqueo (trastuzumab más lapatinib<sup>95</sup>, sin observar diferencias en cuanto a SLE y SG, pero si entre las pacientes que habían alcanzado una pCR independientemente del brazo de tratamiento<sup>96</sup>. En cambio, en el segundo, no se observaron diferencias en relación con las tasas de pCR alcanzadas en función del grupo de tratamiento, pero si en función de la expresión de RRHH, observando una mayor tasa de pCR en el grupo de doble bloqueo en tumores con RRHH-negativos<sup>97</sup>. A más de 7 años de seguimiento la combinación trastuzumab más lapatinib junto con taxano mostró una mayor SLE y SG<sup>98</sup>.



Posteriormente, se realizaron los estudios en combinación con pertuzumab. El estudio Neosphere, fue un estudio fase II que aleatorizó pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2+ precoz, a recibir un régimen de poliquimioterapia más trastuzumab asociado o no a doble bloqueo con pertuzumab. Se observó un aumento de tasas de pCR de prácticamente el doble con casi un 46% en el grupo de doble bloqueo respecto al 20-30% del grupo con quimioterapia más un único anti-HER2<sup>99</sup>. A 5 años de seguimiento describieron una mayor SLE en las pacientes que lograron la pCR en comparación a las que no (85% con 76% respectivamente, HR 0.54; 95% IC 0.29-1.00)<sup>100</sup>, confirmando que la pCR podría ser un buen indicador subrogado de supervivencia.

Posteriormente, diferentes estudios confirmaron tasas de pCR de entorno el 50-60% con la adición del doble bloqueo con pertuzumab más trastuzumab asociado a poliquimioterapia<sup>100-103</sup>. Actualmente esta combinación sigue siendo el tratamiento estándar para pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ estadios II y III<sup>104</sup>.

Por último, también se ha explorado el papel del T-DM1 en el contexto neoadyuvante. Éste fue valorado en el estudio fase III KRISTINE donde se observó que la combinación de tratamiento con T-DM1 más pertuzumab presentaba menor tasas de pCR que docetaxel, carboplatino, pertuzumab más trastuzumab (44.4% y 55.7%, respectivamente)<sup>105</sup>. A 3 años de seguimiento no se observó diferencias en SLE invasiva, pero sí peor recurrencia local en el grupo a estudio (HR 2.61, 95% CI, 1.36 - 4.98)<sup>106</sup>.

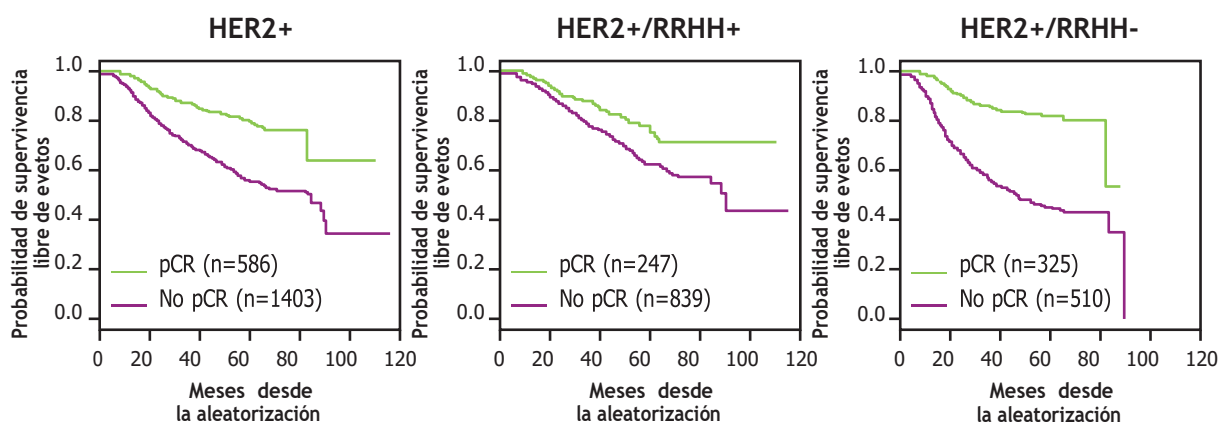
Actualmente, se está explorando el papel del T-Dxd a nivel neoadyuvante mediante el estudio fase III DESTINY-Breast11 (NCT05113251), pendiente de resultados. Este estudio ha aleatorizado pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ de alto riesgo a 3 brazos de tratamiento: T-Dxd en monoterapia, T-Dxd seguido de paclitaxel, trastuzumab y pertuzumab y el brazo control mediante antraciclinas más ciclofosfamida dosis densas seguido de paclitaxel, trastuzumab y pertuzumab. El objetivo primario del estudio es valorar las tasas de pCR.

### » 2.3.3 La importancia de la pCR

Alcanzar una pCR en tumores HER2+, definido como la ausencia de tumor residual invasivo tanto en mama como a nivel ganglionar (estadio ypT0/is N0), después de realizar un tratamiento neoadyuvante se ha relacionado con un aumento de SLE y una mejor SG<sup>107,108</sup>.

De manera que la pCR se ha propuesto como un objetivo subrogado para predecir el beneficio clínico a largo plazo a los diferentes tratamientos realizados. Por el contrario, la ausencia de pCR se puede traducir como un riesgo mayor de recurrencia y peor pronóstico creando la oportunidad de realizar un tratamiento/manejo diferente post cirugía (**Figura 10**).

Realizar un tratamiento neoadyuvante no solo es un escenario único para obtener información sobre la respuesta del tumor a los diferentes tratamientos realizados<sup>109,110</sup>, sino que además permite aumentar la probabilidad de realizar una cirugía conservadora, minimizar el número de vaciamiento axilar ganglionar, erradicar la potencial enfermedad metastásica y, además, se trata de un escenario único para poder observar la sensibilidad a diferentes tratamientos<sup>111</sup>. Todo esto teniendo en cuenta que tanto la terapia adyuvante como neoadyuvante no han presentado diferencias en cuanto a supervivencia<sup>112</sup>.



**Figura 10.** SLE en función del estado de pCR posterior a tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama HER2+ precoz (Adaptado de Cortazar P., et al; *Lancet*, 2014).

Por tanto, la estrategia terapéutica más utilizada en el cáncer de mama HER2+ precoz consiste en realizar quimioterapia asociada a terapia anti-HER2 de forma neoadyuvante y completar tratamiento mediante terapia anti-HER2 de forma adyuvante. Habrá que tener en cuenta que en función de si existe o no enfermedad residual y de las características clínico-patológicas del tumor inicial se utilizarán diferentes estrategias.

### » 2.3.4 Efectos secundarios y seguridad del tratamiento con poliquimioterapia y terapia anti-HER2

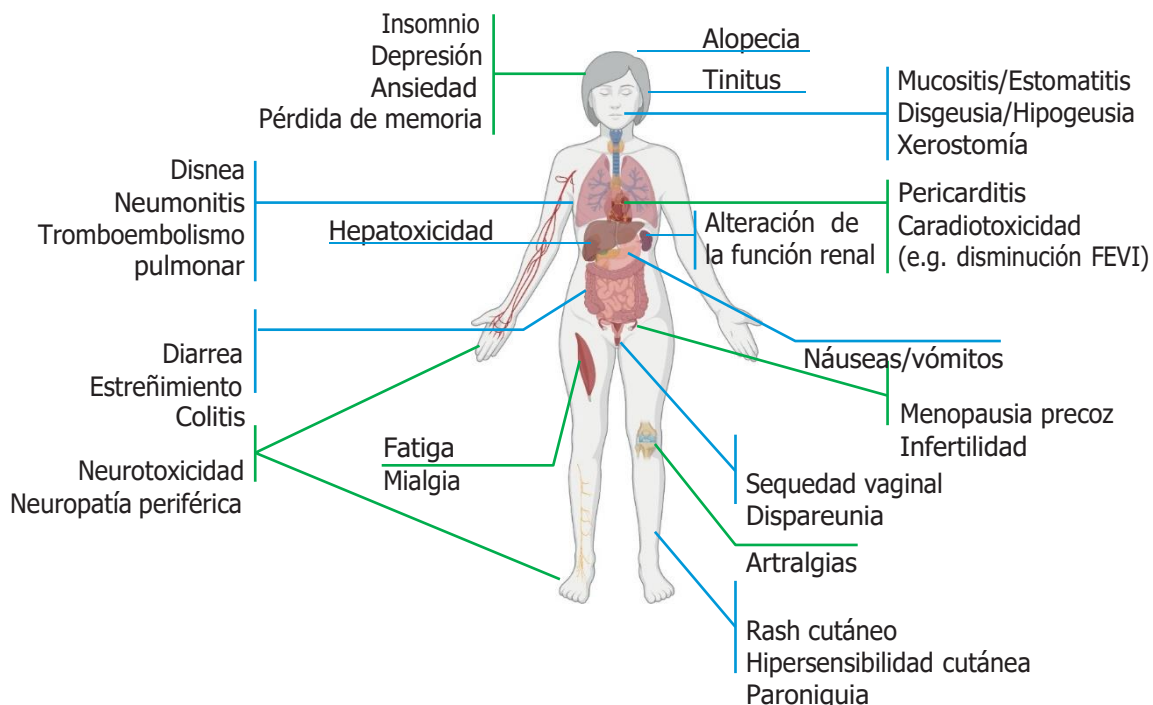
El efecto cardiotoxico de las antraciclinas y de la terapia anti-HER2 es bien conocido, por lo que el potencial efecto cardíaco fue valorado de forma muy minuciosa desde el inicio del uso de la combinación del régimen de poliquimioterapia con antraciclinas asociado a trastuzumab. En el ensayo clínico BCIRG-006 un 2% de las pacientes tratadas con la combinación de antraciclinas y trastuzumab presentaron afectación cardíaca en comparación con el 0.4% del grupo tratado sin antraciclinas<sup>113</sup>. Posteriormente, un metaanálisis que incluyó 6 ensayos clínicos donde se valoró el potencial efecto cardiotoxico de 12 meses de trastuzumab en comparación con una duración más corta (6 meses o 9 semanas en función de los ensayos) observó que existía una mayor probabilidad de presentar un evento cardíaco si el tratamiento de trastuzumab era de 12 meses con una incidencia de disfunción cardíaca clínica del 8.2% (95% IC 7.5% - 8.9%) en comparación con 4.8% (95% IC 4.3% - 5.4%) en el de corta duración. En cuanto al descenso de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) fue del 8.7% (95% IC 7.8% - 9.6%) y 6.3% (95% IC 5.5% - 7.1%) en el grupo de larga y corta duración de trastuzumab respectivamente<sup>114</sup>.

La preocupación por este efecto secundario aumentó de nuevo con la llegada del doble bloqueo anti-HER2, con un nuevo anticuerpo monoclonal potencialmente cardiotoxico, el pertuzumab.

Diferentes estudios empezaron a valorar la potencial actividad cardiotoxica de la combinación de pertuzumab, trastuzumab y antraciclinas, observando que la afectación cardíaca era mayoritariamente asintomática en el brazo de la combinación anti-HER2 con antraciclinas<sup>115,116</sup>, siendo observada aproximadamente en un 3% de las pacientes<sup>102</sup>.

A pesar de que en general, la disfunción cardíaca es reversible (al menos parcialmente) y no muy frecuente, los efectos a largo plazo del descenso asintomático de la FEVI o de la combinación son todavía desconocidos e impredecibles, por lo que hay que tener en cuenta este dato a la hora de realizar el tratamiento, principalmente en pacientes jóvenes<sup>115</sup>.

Además, son bien conocidos los diferentes efectos secundarios y tóxicos que genera la quimioterapia afectando a prácticamente todos los niveles y siendo potencialmente graves. Pueden llegar a afectar las actividades básicas de la vida diaria con un descenso de la calidad de vida importante ya que, además, algunos de ellos, pueden llegar a ser permanentes<sup>117</sup> (Figura 11).



**Figura 11.** Principales efectos secundarios del tratamiento con quimioterapia (Adaptado de Kuderer M., et al; *Nat. Rev.*, 2022).

## 2.4 ESTRATEGIAS DE DESESCALADA

Con la aparición de nuevos fármacos y diferentes combinaciones de tratamiento, aproximadamente el 80-90% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ precoz estarán potencialmente curadas<sup>86</sup>. Este dato plantea el interrogante de si realmente todas las pacientes se beneficiaran del tratamiento con poliquimioterapia (basada en antraciclinas y taxanos) asociado al doble bloqueo HER2. Los resultados del estudio APHINITY han demostrado que añadir un año de pertuzumab adyuvante al tratamiento con trastuzumab en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER2+ sin afectación ganglionar, no aporta beneficio ni en SLE ni en SG<sup>86</sup> planteando si realmente se está realizando un sobretratamiento en algunas situaciones. Individualizar tratamiento valorando el riesgo y beneficio aportado, será clave para poder realizar el mejor abordaje terapéutico.

Con esta idea en mente se han estudiado diversas estrategias de desescalada:

#### » 2.4.1 Estadios I

En los diferentes ensayos de (neo)adyuvancia, los estadios II y III son los que se encuentran más representados y serán, además, los que presentarán un mayor beneficio al tratamiento. En relación con los tumores más pequeños, estadios I principalmente, series retrospectivas han observado que hasta un 5-30% de éstos recurrirán en los siguientes años, lo que justifica que, la mayoría sean considerados también candidatos a tratamiento sistémico adyuvante<sup>118-120</sup>. No obstante, el beneficio que llegará a tener este subgrupo al tratamiento estándar en relación con los estadios II/III es menor dado su mejor pronóstico. Por este motivo, este grupo fue uno de los primeros en los que se planteó la posibilidad de desescalada de tratamiento.

Para ello, se realizó un estudio fase II de un solo brazo de tratamiento con trastuzumab más paclitaxel por 12 semanas en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2+ menores de 3 cm sin afectación ganglionar o pN1mic (únicamente el 1.5%)<sup>121</sup>. Este estudio, a 10 años de seguimiento, ha observado un excelente pronóstico con una SLE invasiva de 91.3% y una SG de 94.3%<sup>122</sup>. Por lo que realizar tratamiento de 12 semanas con paclitaxel más trastuzumab es una opción válida en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ con tumores <2cm y ganglios negativos. Si bien es cierto que en tumores pT1a se recomienda individualizar el tratamiento<sup>123</sup>.

Con los resultados obtenidos a raíz de este ensayo se han diseñado otros estudios que han intentado realizar una desescalada de quimioterapia también en estadios I con el objetivo cada vez más acertado de reducir las toxicidades del tratamiento con quimioterapia. Entre ellos se encuentra el estudio ATEMPT donde se exploró si el tratamiento mediante T-DM1 podía substituir al régimen de trastuzumab más paclitaxel, con el objetivo de reducir las toxicidades de la quimioterapia. Sin embargo, a pesar de que el brazo de T-DM1 mostró un beneficio similar a trastuzumab más paclitaxel, la toxicidad observada también fue similar<sup>124</sup>.

Por este motivo el estudio ATEMPT 2.0 (NCT04893109), todavía en reclutamiento, intentará explorar si una menor duración del tratamiento con T-DM1 (únicamente por 6 ciclos, seguido de trastuzumab) podría mejorar el perfil de toxicidad manteniendo el beneficio.

#### » 2.4.2 Omisión de antraciclinas en el tratamiento (neo)adyuvante

Otro intento de desescalada es la omisión de las antraciclinas en el esquema de tratamiento (neo)adyuvante. La mayoría de los estudios pivotaes con trastuzumab combinaron esquemas de poliquimioterapia que contenían antraciclinas, pero dada la potencial cardiotoxicidad de éstas a corto y largo plazo y tratándose de pacientes con objetivo curativo, varios estudios han evaluado la posibilidad de poder prescindir de su uso.

Se han realizado diversos estudios donde se han incluido pacientes con cáncer de mama HER2+, estadios II y III, asociando el doble bloqueo HER2 con trastuzumab más pertuzumab en combinación con poliquimioterapia sin antraciclinas tanto a nivel adyuvante (**Tabla 3**) como neoadyuvante (**Tabla 4**). Se ha observado que las tasas de pCR se mantienen, igual que la buena supervivencia utilizando el esquema libre de antraciclinas, asociado a una potencial menor cardiotoxicidad<sup>106,115,125-129</sup>.

Sin embargo, a pesar de que parece bastante evidente que evitar el tratamiento con antraciclinas puede llegar a ser una opción válida, hay que tener en cuenta que los estudios no demostraron claramente la no-inferioridad en los esquemas de desescalada. Además, los tumores de alto riesgo (T3-4 o >N2) se encuentran poco representados y el esquema que se utiliza en algunas ocasiones como el carboplatino y paclitaxel en la práctica clínica habitual en el contexto de enfermedad HER2+ no se considera como una desescalada real. Con todo ello, es razonable el uso de un esquema de 6 ciclos de carboplatino más docetaxel en combinación con trastuzumab (+/- pertuzumab) en aquellas pacientes que no se consideren candidatas al régimen estándar con antraciclinas, esquema empleado en el estudio NeoSphere, con una tasa reportada de pCR elevada, y sin diferencias en SLE a 5 años respecto a los otros esquemas<sup>99,100</sup>.

Contemplando todos estos datos, es importante tener en cuenta que el poder o no seleccionar pacientes que realmente acabaran beneficiándose del tratamiento con o sin antraciclinas queda todavía abierto. Al final el único biomarcador disponible y que permitirá guiar a la toma de decisiones

ESTUDIO	NÚM. DE PACIENTES	CRITERIOS INCLUSIÓN	TRATAMIENTO	SLE
BCIRG-006 (FASE III) <sup>125</sup>	1,075	Estadios II/III HER2+	6 ciclos de C+P+TTZ	73% a 10 años de seguimiento
APHINITY (FASE III) <sup>128</sup>	1,062	Estadios II/III HER2+	6 ciclos de D+C+TTZ+PTZ	91% a 6 años de seguimiento

Tabla 3. Estudios de desescalada de tratamiento en neoadyuvancia. D+C+TTZ+PTZ = Docetaxel, Carboplatino, Trastuzumab, Pertuzumab; P= Paclitaxel; TTZ = Trastuzumab; PTZ=Pertuzumab. (Adaptado de Tarantino P., Tolaney S., et al; *ASCO daily News*, 2022).

ESTUDIO CLÍNICO	NÚM. DE PACIENTES	CRITERIOS INCLUSIÓN	TRATAMIENTO	pCR	SUPERVIVIENTES
TRYPHAENA (FASE II) <sup>129</sup>	77	Estadios II/III HER2+	6 ciclos de D+C+TTZ+P TZ	66%	SLE de 90% a 3 años de seguimiento
TRAIN-2 (FASE III) <sup>115</sup>	219	Estadios II/III HER2+	9 ciclos de D+C+TTT+ PTZ	68%	SLE de eventos 93.6% a 3 años de seguimiento
WSG- AD-PAT-HR- / HER2+ (FASE II) <sup>126</sup>	42	Estadios II/III HER2+ y RRRH- negativos	Paclitaxel por 12 semanas, TTZ +PTZ	90%	SLE invasiva 98% a 5 años de seguimiento
DAPHNE (FASE II) <sup>127</sup>	98	Estadios II/III HER2+	Paclitaxel por 12 semanas, TTZ+PTZ	57%	00% a 1 año de seguimiento
KRISTINE (FASE III) <sup>106</sup>	221	Estadios II/III HER2+	D+C+TTZ+P TZ	56%	SLE invasiva 92% a 3 años de seguimiento

Tabla 4. Estudios de desescalada de tratamiento en neoadyuvancia. D+C+TTZ+PTZ = Docetaxel, Carboplatino, Trastuzumab, Pertuzumab; P= Paclitaxel; TTZ = Trastuzumab; PTZ=Pertuzumab. (Adaptado de Tarantino P., Tolaney S., et al; *ASCO daily News*, 2022).

en el momento de escoger un tratamiento es el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la expresión de RRHH.

### » 2.4.3. Desescalada en duración de trastuzumab adyuvante

Ya hace más de una década que el estudio fase III HERA determinó 1 año como la duración estándar de tratamiento con trastuzumab adyuvante con una mejoría clara en SLE<sup>84</sup>. A partir de entonces, múltiples estudios han intentado valorar la posibilidad de disminuir el tiempo de administración de éste, ya sea con esquemas de 6 meses o incluso más cortos con 9 semanas<sup>130–134</sup>. Los resultados obtenidos hasta la fecha no han podido concluir de forma clara que realizar un acortamiento del tiempo de trastuzumab sea una opción segura en estas pacientes, por lo que el tratamiento con trastuzumab administrado durante un año sigue siendo el estándar. En aquellas pacientes de menor riesgo se recomienda valorar la desescalada de la quimioterapia u otras terapias antes de reducir el tiempo de administración de trastuzumab.

ESTUDIO CLÍNICO	NÚM. DE PACIENTES	DURACIÓN TRASTUZUMAB ADYUVANTE A ESTUDIO	OBJETIVO PRIMARIO	RESULTADOS
PERSEPHONE (FASE III) <sup>130</sup>	4,088	6 meses	SLE a 4 años	Beneficio 0.4% brazo TTZ 1 año
PHARE (FASE III) <sup>131</sup>	3,384	6 meses	SLE a 2 años	Beneficio 2.6% brazo TTZ 1 año
HORG (FASE II) <sup>132</sup>	481	6 meses	SLE a 3 años	Beneficio 2.4% brazo TTZ 1 año
SOLD (FASE III) <sup>133</sup>	2,174	9 meses	SLE	Beneficio 2.5% brazo TTZ 1 año
SHORT-HER (FASE III) <sup>134</sup>	1,254	9 meses	SLE a 5 años	Beneficio 3.0% brazo TTZ 1 año

Tabla 5. Estudios que compararon la duración del tratamiento con trastuzumab adyuvante (Adaptado de Metzger Filho O. and Burstein H.J, *Ann. Oncol.*, 2018).

### » 2.4.4. Identificar tumores adictos a la vía de señalización de HER2

Un área que está generando mucho interés es la posibilidad de identificar tumores que son adictos a la vía de HER2 ya que son potencialmente aquellos que presentan una alta sensibilidad a tratamientos anti-HER2. Se hipotetiza que este tipo de tumores podrían presentar un pronóstico excelente únicamente con tratamientos anti-HER2 sin necesidad de quimioterapia.

Varios estudios han llegado a identificar un subgrupo de tumores HER2+ que pueden alcanzar la pCR únicamente con doble bloqueo HER2 sin necesidad de realizar quimioterapia (Tabla 6). De los diferentes estudios neoadyuvantes que exploraron la combinación de doble bloqueo HER2, tanto con trastuzumab más lapatinib como con trastuzumab más pertuzumab se llegaron a alcanzar unas tasas de pCR de aproximadamente entre un 20% - 30% sin la necesidad de quimioterapia<sup>25,99,126,135–138</sup>. Más recientemente, también se exploró la posibilidad de “desescalada” mediante T-DM1. El estudio

WGS-ADAPT-TP y el estudio KRISTINE reportaron tasas de pCR de 41% en monoterapia y 36% en combinación con pertuzumab respectivamente<sup>105,139</sup>.

En cuanto a supervivencia, diversos de estos estudios también reportaron datos donde no se observaron diferencias en cuanto a SLE<sup>100,106,126,139</sup> en función del brazo del tratamiento. Únicamente se observaron diferencias en función de si se alcanzaba la pCR o no, independientemente del brazo de tratamiento recibido<sup>126</sup>.

Finalmente, se han realizado ensayos clínicos con selección de pacientes mediante biomarcadores dinámicos. Es decir, seguir únicamente con tratamiento libre de quimioterapia si se observaba una respuesta inicial utilizando un biomarcador posterior al tratamiento. En el ensayo PerELISA, se inició el tratamiento con letrozol y únicamente se seguía con esquema libre de quimioterapia (mediante trastuzumab y pertuzumab) si el tumor presentaba un descenso relativo del Ki67 >20% posterior a las dos semanas de letrozol<sup>138</sup>. En el estudio PHERGain se utilizó una estrategia diferente, en este caso se inició tratamiento directamente mediante trastuzumab y pertuzumab y a las 6 semanas

ENSAYO CLÍNICO	NÚM. DE PACIENTES	CRITERIOS INCLUSIÓN	TRATAMIENTO REALIZADO	DURACIÓN TRATAMIENTO	TASAS DE pCR
TBCRC 006 (FASE II) <sup>135</sup>	64	Estadio II-III (HER2+)	TTZ+ Lapatinib	12 semanas	28%
TBCRC 023 (FASE II) <sup>136</sup>	64	T <sub>≥</sub> 2 cm any N (HER2+)	TTZ+Lapatinib	24 semanas	28%
	33			12 semanas	12%
NEOSPHERE (FASE II) <sup>99</sup>	107	T2-3, N0-1; T2-3, N2-3; T4a-c, any N (HER2+)	TTZ+ PTZ	12 semanas	17%
PAMELA (FASE II) <sup>25</sup>	151	Estadio II-IIIa (HER2+)	TTZ+ Lapatinib	18 semanas	30%
KRISTINE (FASE III) <sup>105</sup>	223	cT2-T4/cN0 to N3 (HER2+)	T-DM1+ PTZ	6 ciclos	36%
WGS-ADAPT-TP (FASE II) <sup>139</sup>	117	Estadio I-III (RRHH+/HER 2+)	T-DM1	12 semanas	41%
	120		T-DM1 + ET		41%
	117		TTZ + ET		15%
WGS-ADAPT-HER2+/HR- (FASE II) <sup>126</sup>	92	Estadio I-III (RRHH+/HER 2+)	TTZ+ PTZ	12 semanas	34%
PHERGAIN* (FASE II) <sup>137</sup>	227	Estadio I-IIIa (HER2+)	TTZ + PTZ*	6 ciclos	38%
PERELISA** (FASE II) <sup>138</sup>	44	Estadio II-IIIa (RRHH+/HER 2+)	TTZ + PTZ+ letrozol**	5 ciclos	21%

**Tabla 6.** Ensayos clínicos neoadyuvantes en cáncer de mama HER2+ que utilizaron esquemas libres de quimioterapia. TTZ = Trastuzumab; PTZ= Pertuzumab.

\* Tras observar respuesta con 18-F-FDG-PET tras dos ciclos de pertuzumab más trastuzumab.

\*\* Tras realizar respuesta (descenso relativo del Ki67 >20% tras dos semanas de letrozol 2.5 mg/24h.

aquellas pacientes cuyos tumores alcanzaron una respuesta metabólica medida por 18-F-FDG-PET seguían tratamiento con doble bloqueo únicamente. Estos dos ensayos alcanzaron tasas de pCR de 21% y 38% respectivamente en los brazos de pacientes que se consideraron respondedoras<sup>137</sup>.

Este pequeño grupo de tumores sigue generando un importante interés biológico y clínico, dado que las pacientes podrían estar curadas sin necesidad de realizar tratamiento con quimioterapia. Es de vital importancia poder determinar que tumores van a presentar esta adicción a la vía de HER2 para poder realizar un tratamiento adecuado con la menor toxicidad posible para las pacientes.

## 2.5 BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA PARA OPTIMIZAR LA DESESCALADA.

Con toda la información previamente mencionada, está claro que existe mucha heterogeneidad clínica y biológica entre las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama HER2+. Lo que implica que no todos los tumores van a presentar la misma sensibilidad a los tratamientos propuestos ni el mismo pronóstico, incluyendo hasta un 20-30% de pacientes que van a estar curadas sin necesidad de quimioterapia (Tabla 6). Sin embargo, hoy en día, el estadiaje tumoral (el tamaño y la afectación ganglionar) así como la expresión de RRHH, siguen siendo los principales factores que ayudarán a seleccionar el tratamiento adecuado.

Poder identificar las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama HER2+ que presenten un mejor pronóstico de forma segura y precoz es clave, ya que se podrían plantear tratamientos más adecuados, por ejemplo, realizar esquemas más cortos e incluso plantear la desescalada de la quimioterapia, garantizando el máximo beneficio, evitando potenciales efectos secundarios innecesarios y mejorando en la calidad de vida de las pacientes. Con este objetivo, a lo largo de los años, se han explorado algunos potenciales biomarcadores para identificar aquellos tumores con un mejor pronóstico y que podrían beneficiarse de la desescalada de tratamiento.

De todos ellos es importante remarcar que ninguno ha sido validado para demostrar un valor predictivo de respuesta ni beneficio en SLE a regímenes de terapia sin quimioterapia.

De entre ellos destacan:

### » 2.5.1 Subtipos intrínsecos del cáncer de mama y expresión del gen ERBB2

Dentro del cáncer de mama HER2+ se encuentran representados todos los subtipos intrínsecos (Luminal A, Luminal B, HER2-E and Basal-like), siendo el subtipo HER2-E el más frecuente, representando aproximadamente entre un 30-75% de los tumores, dependiendo de la expresión de los RRHH<sup>140</sup> (Figura 12).

El subtipo HER2-E se caracteriza por tener una alta expresión del gen *ERBB2*, *ERBB2*-amplicon (ej. *GRB7*) y receptores de la TK como *FGFR4* y *EGFR*.

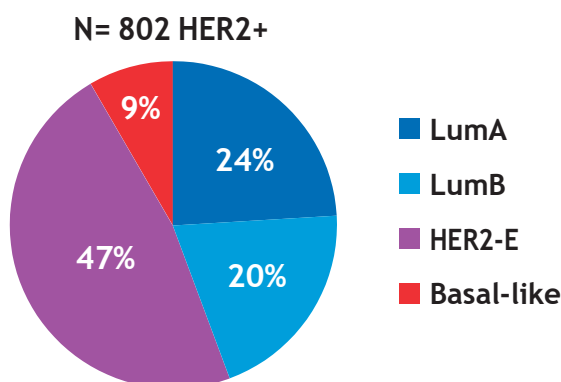
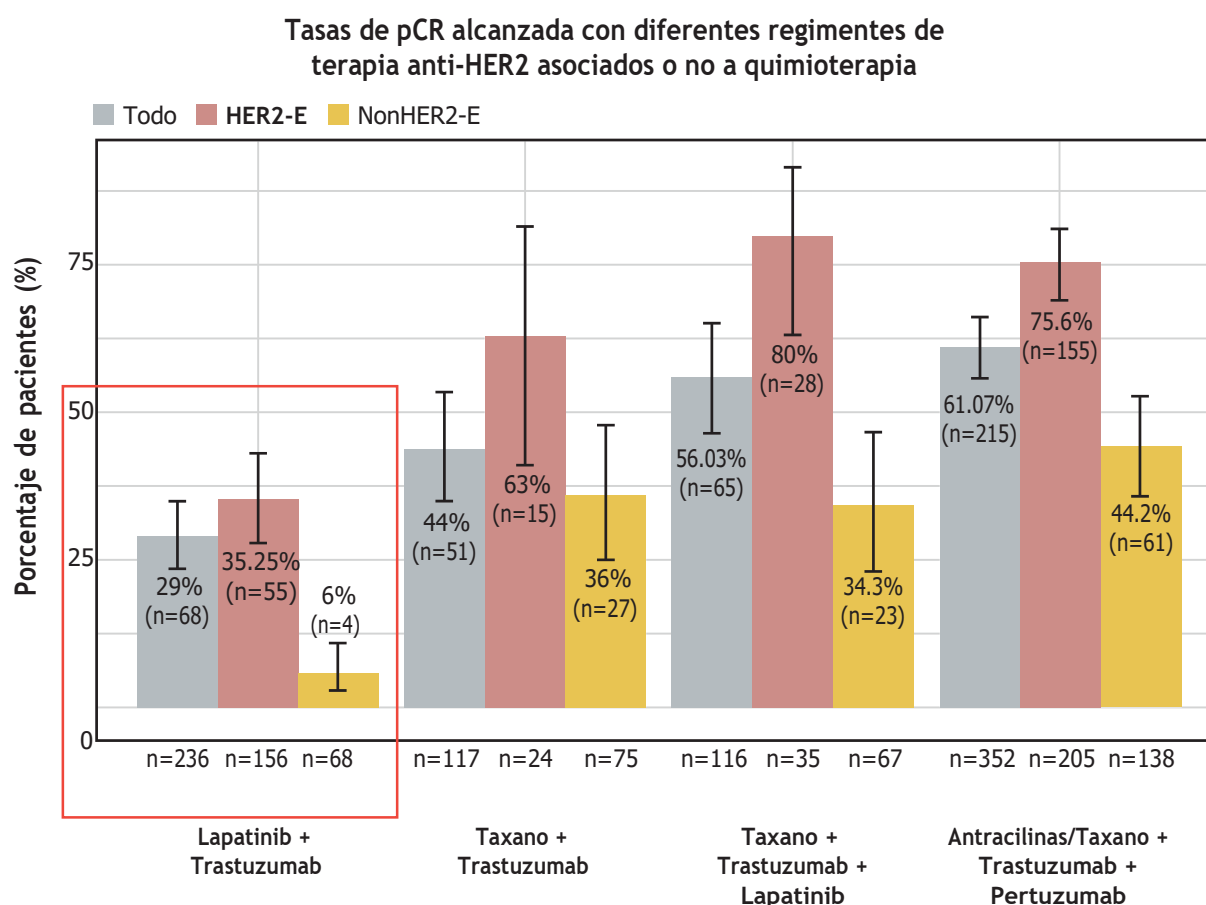


Figura 12. Diferentes subtipos intrínsecos representados en el cáncer de mama HER2+. (Adaptado de Prat A, Pascual T. y Adamo B., *Oncotarget*, 2017).



Además, se ha observado que el subtipo HER2-E es más propenso a tener una mayor activación de los genes EGFR y/o la vía HER2<sup>30,141</sup>. El valor clínico del subtipo HER2-E dentro del cáncer de mama HER2+, ha demostrado tener una alta sensibilidad a los tratamientos anti-HER2 respecto a los otros subtipos intrínsecos siendo un biomarcador consistente de respuesta a tratamiento neoadyuvante. La determinación del subtipo intrínseco HER2-E ofrece la posibilidad de identificar aquellos tumores que tendrán una mayor probabilidad de alcanzar una pCR tras tratamiento anti-HER2 con o sin quimioterapia<sup>25,97,138,142-144</sup> independientemente del estatus de RRHH<sup>145</sup> (Figura 13).



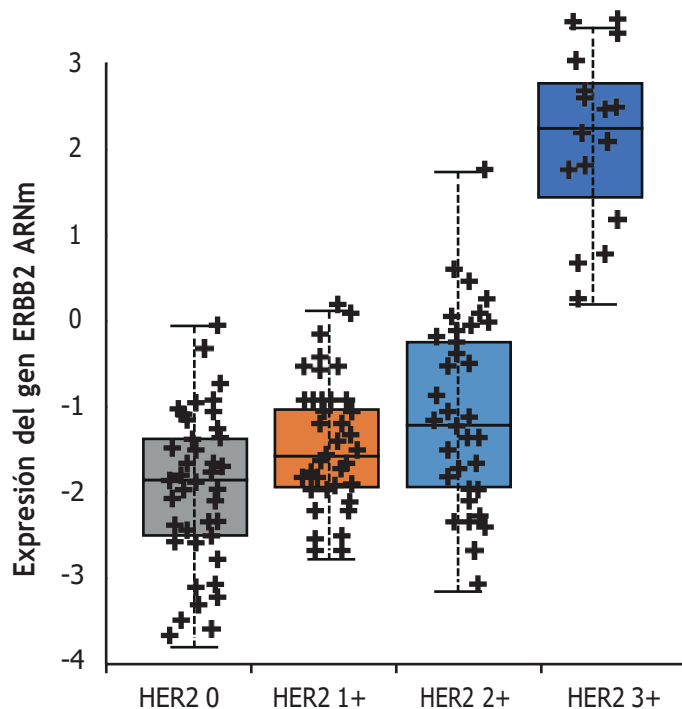
**Figura 13.** Porcentaje de pCR alcanzado tras realizar tratamiento neoadyuvante anti-HER2 con o sin quimioterapia en función de subtipos intrínsecos (Adaptado de Cejalvo JM., et al; *Cancer Treat. Rev.*, 2018).

Se ha observado que a medida que aumenta la expresión IHQ del receptor HER2, también incrementa la expresión del gen *ERBB2*<sup>146</sup> (Figura 14). Se ha valorado el papel predictivo y/o pronóstico de la expresión por ARNm del gen *ERBB2* en el cáncer de mama HER2+ en diferentes pacientes tratadas con terapia anti-HER2, con o sin quimioterapia. Se ha observado que altos niveles de expresión del gen *ERBB2* están relacionados con respuesta al tratamiento neoadyuvante basado en terapia anti-HER2, con una mayor tasa de pCR al tratamiento en combinación con doble bloqueo<sup>97,143,147</sup>. Además, presentar una baja expresión de *ERBB2* se correlaciona con un peor pronóstico<sup>59,148</sup>.

De los diferentes subtipos intrínsecos, el HER2-E es el que presenta una mayor expresión del gen

*ERBB2*<sup>30</sup>. Además, se ha observado que cuando se combinan los subtipos intrínsecos con la expresión

de *ERBB2*, los tumores HER2-E y con alta expresión del gen *ERBB2* presentan mejores tasas de pCR que el resto de los grupos (no-HER2-E y nivel de expresión *ERBB2* alto o bajo; HER2-E y nivel de expresión de *ERBB2* bajo) así como un aumento de SLP y SG tras un tratamiento únicamente con terapia anti-HER2 y sin quimioterapia<sup>149</sup>. Esta combinación de los dos biomarcadores (subtipo intrínseco HER2-E y expresión de *ERBB2*) podría ayudar a identificar los tumores con una alta adicción a la vía de HER2 y especialmente sensibles a los tratamientos anti-HER2, y así seleccionar a aquellas pacientes candidatas a tratamientos menos intensivos o de desescalada.



Determinación IHQ de HER2

Figura 14. Niveles del gen ERBB2 por ARNm según el estado IHQ de HER2 (Adaptado de Schettini F. y Prat A., *The Breast*, 2021).

### » 2.5.2 TILs y expresión de firmas inmunes

El cáncer de mama HER2+ es de los

tumores que presenta una mayor infiltración por TILs juntamente con el cáncer de mama TN. El mecanismo de acción de muchas terapias anti-HER2 implican una interacción con el sistema inmune<sup>150</sup>, por lo que no es de extrañar que el porcentaje de infiltración por TILs se haya relacionado con un factor predictivo y pronóstico en este subtipo.

En general, se ha observado que aquellos tumores que presentan una mayor infiltración por TILs basales tienen una mayor probabilidad de alcanzar una pCR tras realizar un tratamiento neoadyuvante con esquemas basados en quimioterapia y terapia anti-HER2 (ya sea en monoterapia o mediante doble bloqueo o incluso en doble bloqueo sin tratamiento con quimioterapia) en particular cuando la infiltración por TILs es superior al 60%<sup>55,57,142</sup>. Aunque esta asociación no ha sido confirmada en el análisis multivariado en todos los estudios<sup>151,152</sup>. Su valor pronóstico también ha sido reportado en diferentes estudios, identificando que aquellos tumores que presentan una mayor infiltración por TILs presentan un mejor pronóstico tanto si son tumores que han recibido tratamiento con quimioterapia asociada a trastuzumab o doble bloqueo HER2 (ya sea con pertuzumab o lapatinib) o incluso con tratamiento sin quimioterapia, únicamente con doble bloqueo<sup>50,58,60,152,153</sup>. Recientemente, un análisis realizado en el ensayo clínico, ShortHER ha demostrado que aquellos tumores que presentaron una infiltración por TILs previa al tratamiento del  $\geq 20\%$  presentaban una mejor tasa de SLE a 5 años, además, también se observó que un incremento del 10% de la infiltración por TILs se encontraba relacionado con un aumento en la SLE<sup>61</sup>.

También se ha valorado la expresión de genes inmunes en este subtipo de cáncer de mama. Varios estudios han relacionado la alta expresión de genes y firmas inmunes a un efecto pronóstico y

predictivo en cáncer de mama HER2+ precoz. En análisis realizados en dos estudios fases III (NeoALTTO y CALGB 40601) se observó que la expresión de firmas inmunes relacionadas con linfocitos T y B estaban asociadas a una mayor tasa de pCR<sup>143,154</sup>.

Posteriormente, se ha observado como la expresión de diferentes firmas inmuno-relacionadas están asociadas no solo a tasas de pCR sino también a un mejor pronóstico. En concreto la firma de inmunoglobulina G (IgG) presentó una mejor supervivencia libre de recurrencia en pacientes con enfermedad residual posterior al tratamiento neoadyuvante<sup>98</sup> y firmas de expresión génica relacionadas con linfocitos B y células plasmáticas también se relacionaron con una mejor supervivencia libre de eventos<sup>155</sup>.

#### » 2.5.4 Mutación en PIK3CA

El gen *PIK3CA* codifica por la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la proteína PI3K. Este gen está muy relacionado en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR implicada en la supervivencia, proliferación y migración celular<sup>156</sup>. En concreto la frecuencia de mutaciones en *PIK3CA* en cáncer de mama HER2+ es del 30-40%<sup>30,157</sup>.

En estadios precoces diferentes estudios, que han llegado a incluir alrededor de 1,000 pacientes, han observado que presentar una mutación en *PIK3CA* está asociado a una menor probabilidad de alcanzar una pCR tras tratamiento neoadyuvante, especialmente en la población con RRHH+<sup>158,159</sup>.

En cuanto a estudios adyuvantes la información es más contradictoria, mientras en el estudio APHINTY se observó que las alteraciones en la vía PI3K/Akt/mTOR están asociadas a peor pronóstico<sup>59</sup>, otros grandes estudios (como ExteNET y KATHERINE) no observaron diferencias pronósticas en función del estado mutacional de *PIK3CA*<sup>160,161</sup>. Además, existen otros datos que sugieren que esta mutación tiene implicaciones pronósticas en función del subtipo intrínseco, donde presentar el subtipo HER2-E, y la mutación se relaciona con un mejor pronóstico en comparación con los subtipos no HER2-E(162). Considerando que la mutación de *PIK3CA* se encuentra en aproximadamente en un tercio de los tumores HER2+ y que parece ser que está asociada a peor respuesta a tratamiento anti-HER2, está claro que deberemos realizar un tratamiento más específico para este subtipo<sup>163</sup>.

#### » 2.5.3 Pérdida de PTEN

*PTEN* es un gen supresor implicado en la progresión del ciclo celular, crecimiento y supervivencia de la célula tumoral. En concreto, el gen *PTEN*, se encarga de regular a la baja la vía de las proteínas PI3K/Akt y está implicado en la reparación del ADN y la inestabilidad genómica<sup>164</sup>. Existen datos que podrían indicar que una baja o nula expresión de *PTEN* podría estar asociado a un peor pronóstico<sup>165</sup> y a resistencia a tratamientos anti-HER2(166), aunque la evidencia disponible es un poco contradictoria<sup>167,168</sup>. No queda claro que la alteración de *PTEN* haya presentado efectos negativos en cuanto al pronóstico ni a nivel precoz ni metastásico<sup>169</sup>. Sin embargo, un análisis realizado en el ensayo fase III APHINITY reveló que presentar alteraciones en la vía PI3K/Akt/PTEN ocasionaba un peor pronóstico en términos de SLE en los dos brazos de tratamientos<sup>59</sup>. A pesar de que ha sido un biomarcador estudiado tanto a nivel predictivo como pronóstico los datos de los que disponemos siguen siendo difíciles de interpretar.

### » 2.5.5 Expresión de la proteína truncada p95HER2

Aproximadamente un 30% de los tumores HER2+ co-expresaran la proteína truncada p95HER2+. Esta proteína está asociada a resistencia a trastuzumab y además a mal pronóstico en cuanto a SG y SLP. Algunos datos han sugerido que la expresión de esta proteína en el tumor significaría tener que realizar otro tipo de tratamiento (aparte de trastuzumab) y que puede presentar cierta sensibilidad a lapatinib más capecitabina<sup>170,171</sup>.

### » 2.5.6 Biomarcadores combinados

Intentar determinar el valor pronóstico y/o predictivo de un tumor con un único biomarcador parece ser insuficiente para el cáncer de mama HER2+. Es evidente que se trata de una enfermedad muy heterogénea y compleja donde entran en juego diferentes factores que pueden afectar a su probabilidad de respuesta al tratamiento y a su pronóstico.

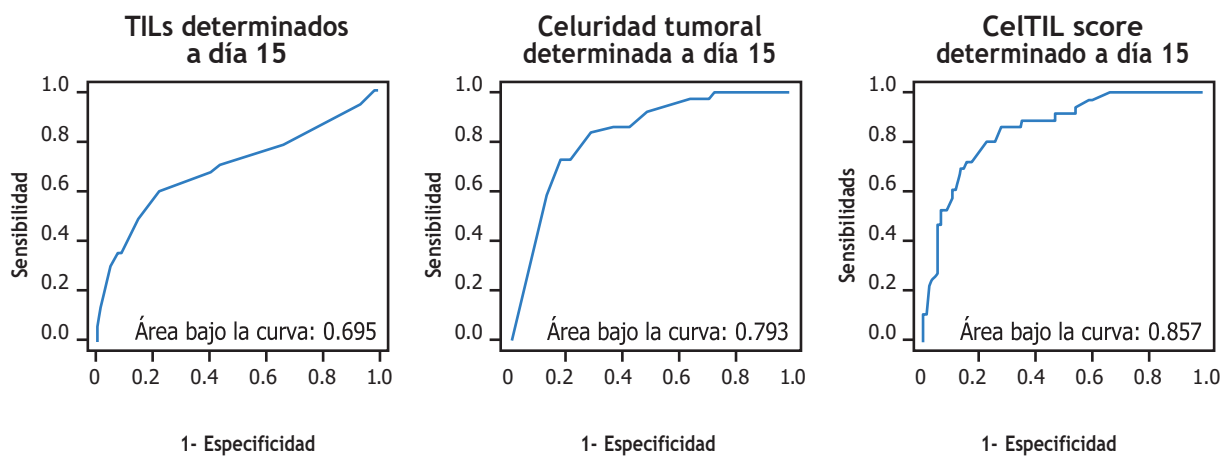
Por tanto, al igual que con otros subtipos, se han empezado a desarrollar scores. Por un lado, se está valorando como afecta el tratamiento a alguno de estos biomarcadores y si su variación, posterior a la terapia, puede ayudar a establecer un valor pronóstico y/o predictivo, como en el caso del CelTIL score<sup>172</sup>. Otro enfoque es combinar diversos marcadores para poder realizar una estratificación más precisa del cáncer de mama HER2+ como el HER2DX<sup>173</sup>.

#### • 2.5.6.1 CelTIL score

Como se ha descrito con anterioridad, la determinación de los TILs basal juega un papel importante en cuanto a predicción de pCR tras realizar un tratamiento con quimioterapia asociado a terapia anti-HER2 (ya se en monoterapia o mediante doble bloqueo) así como sin quimioterapia, si bien es cierto que no todos los estudios son igual de consistentes. Mientras que existen estudios que observaron una relación clara entre la infiltración por TILs previa al tratamiento de forma continua y la capacidad de alcanzar la pCR<sup>55-57</sup>, otros estudios, en cambio, no encontraron esta relación<sup>151,152</sup>. Por este motivo, se exploró si la variación de los TILs posterior a tratamiento podía ser un mejor predictor de respuesta.

Para ello, se utilizaron las muestras de pacientes incluidas en el ensayo clínico PAMELA y se analizaron las muestras de biopsias obtenidas a nivel basal, día 14( $\pm$ 2) y a la cirugía y se realizó la determinación de infiltración por TILs para valorar la capacidad predictiva de respuesta a terapia anti-HER2 sin quimioterapia. Durante el estudio se valoró no solo la capacidad de los TILs sino también diferentes características clínico-patológicas del tumor, entre ellas, la celularidad tumoral ya que cambios en la celularidad tumoral han demostrado previamente estar relacionados también con respuesta a tratamiento en cáncer de mama RRHH+/HER2+<sup>138</sup>.

El estudio observó que la determinación de la celularidad tumoral y la determinación de infiltración por TILs, por si solos, a día 14( $\pm$ 2) (posterior al tratamiento con trastuzumab más lapatinib) tenía un mejor efecto predictivo incluso que su determinación basal. Con estos datos, se realizó un score, para valorar la capacidad de los dos biomarcadores combinados en predecir pCR. La combinación de estos dos datos se denominó CelTIL score (**Figura 15**).



**Figura 15.** Capacidad de predicción de pCR de A. TILs determinados a día 15. B. Celularidad tumoral determinada a día 15. C. CelTIL score determinado a día 15. (Adaptado de Nuciforo P., et al; *Ann. Oncol.*, 2018).

El CelTIL score es un biomarcador que integra la determinación de la infiltración por TILs y la celularidad tumoral posterior a un ciclo de tratamiento anti-HER2. La forma de calcularlo fue descrita ya en 2018 en el estudio PAMELA(172) y consiste en:  $\text{CelTIL score} = -0.8 \times \text{celularidad tumoral (\%)} + 1.3 \times \text{TILs (\%)}$ , posteriormente la puntuación obtenida se escala para ofrecer un resultado que variará entre 0-100%.

Se observó que presentar un CelTIL score alto a día 15 del inicio de tratamiento estaba relacionado con un aumento de probabilidad de alcanzar pCR en pacientes que realizaban tratamiento neoadyuvante mediante doble bloqueo HER2 exclusivo. Su capacidad pronóstica todavía no está establecida<sup>172</sup>.

#### • 2.5.6.2 HER2DX

Se trata del primer test en cáncer de mama precoz HER2+ que integra tanto datos clínicos como datos genómicos para intentar capturar la complejidad biológica del subtipo HER2+. El HER2DX proporciona dos scores en base a dos objetivos clínicos diferentes: probabilidad de recaída a largo plazo y probabilidad de alcanzar una pCR. El algoritmo está compuesto por 27 genes y cuatro procesos biológicos implicados en el cáncer de mama (infiltración inmunológica, la proliferación, la diferenciación luminal y expresión de HER2) asociado a datos clínicos como el tamaño tumoral y la afectación ganglionar. Este algoritmo proporciona tanta información pronóstica, probabilidad de recaída a 7 años, y predictiva de respuesta, la probabilidad de alcanzar la pCR al tratamiento neoadyuvante, además de determinar los niveles de expresión del gen *ERBB2*. Desde enero de 2022, este test se encuentra disponible de forma comercial. Los datos obtenidos hasta ahora indican que el HER2DX permite identificar un grupo de pacientes en estadios precoces que presentaran muy buen pronóstico y que no necesitaran terapias adicionales y viceversa, aquellos que necesitaran una escalada de tratamiento<sup>173-176</sup>.

## 3. CÁNCER DE MAMA RRHH+ Y HER2 NEGATIVO

### 3.1 BASES BIOLÓGICAS DEL CÁNCER DE MAMA RRHH+/HER2-

El cáncer de mama RRHH+/HER2- representa aproximadamente el 70% de todos los cánceres de mama diagnosticados y es el responsable de la mayoría de las recurrencias y muertes debido a esta enfermedad<sup>177</sup>. Este subtipo se caracteriza por presentar expresión de RE y/o RP de al menos el 1% en la célula tumoral determinado por IHQ<sup>5</sup>.

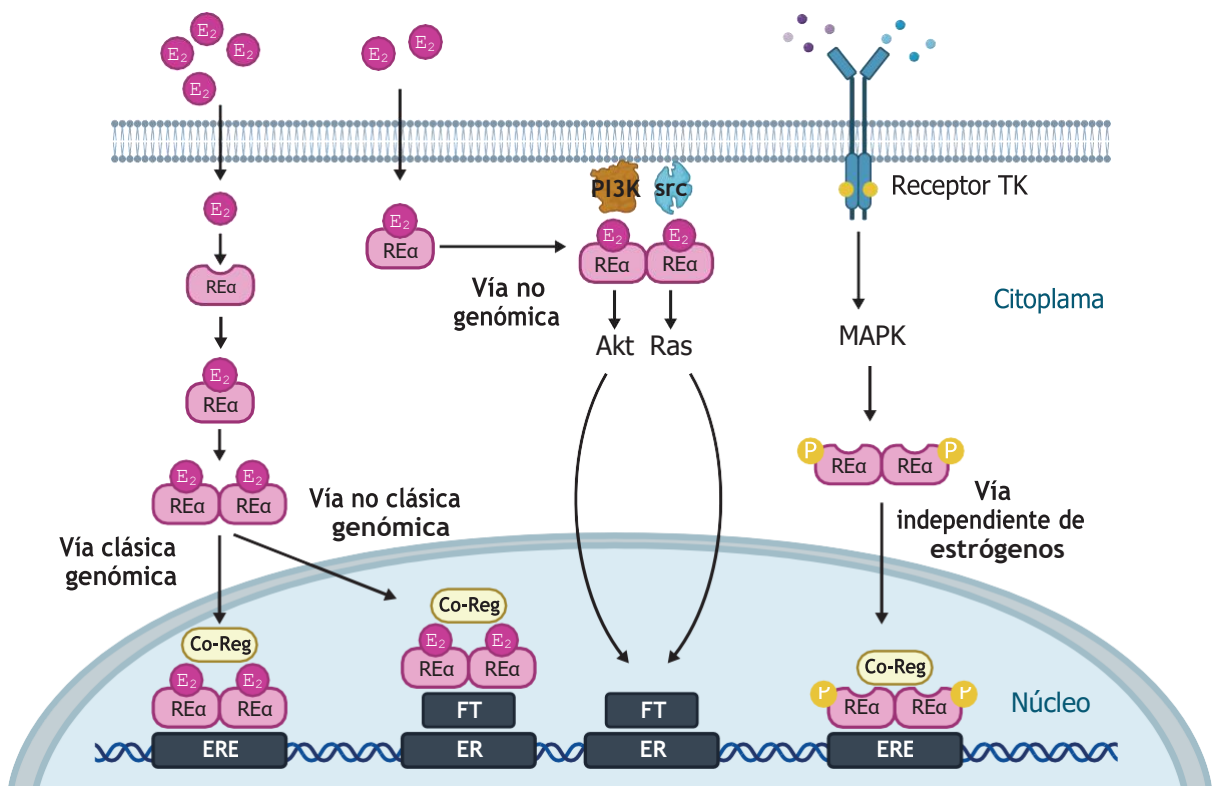
La activación de la vía del RE está implicada de forma directa en la carcinogénesis del cáncer de mama RRHH+ por lo que su inhibición ha sido clave para mejorar la supervivencia de las pacientes. El RE es una proteína nuclear que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y actúa como factor de transcripción activando diversos genes principalmente implicados en la proliferación celular. Existen dos isoformas del RE, la RE $\alpha$  y la isoform RE $\beta$ , cada una de ellas codificada por un gen diferente, el *ESR1* (cromosoma 6q) y *ESR2* (cromosoma 14q), respectivamente. En unión a su ligando natural y en respuesta a la señalización estrogénica, RE $\alpha$  normalmente promueve la proliferación, mientras que RE $\beta$  en general tiene un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico. La implicación de RE $\beta$  en el cáncer de mama es menos conocida que el RE $\alpha$ <sup>178</sup>.

El RE tiene dos dominios de activación transcripcional: el independiente de ligando (también conocido como AF-1) situado en el extremo N-terminal, y el dependiente de ligando (o AF-2) situado en el C-terminal juntamente con el dominio de unión a ligando. La vía del RE puede activar sus diferentes vías de señalización mediante 3 diferentes mecanismos (Figura 16)<sup>179</sup>:

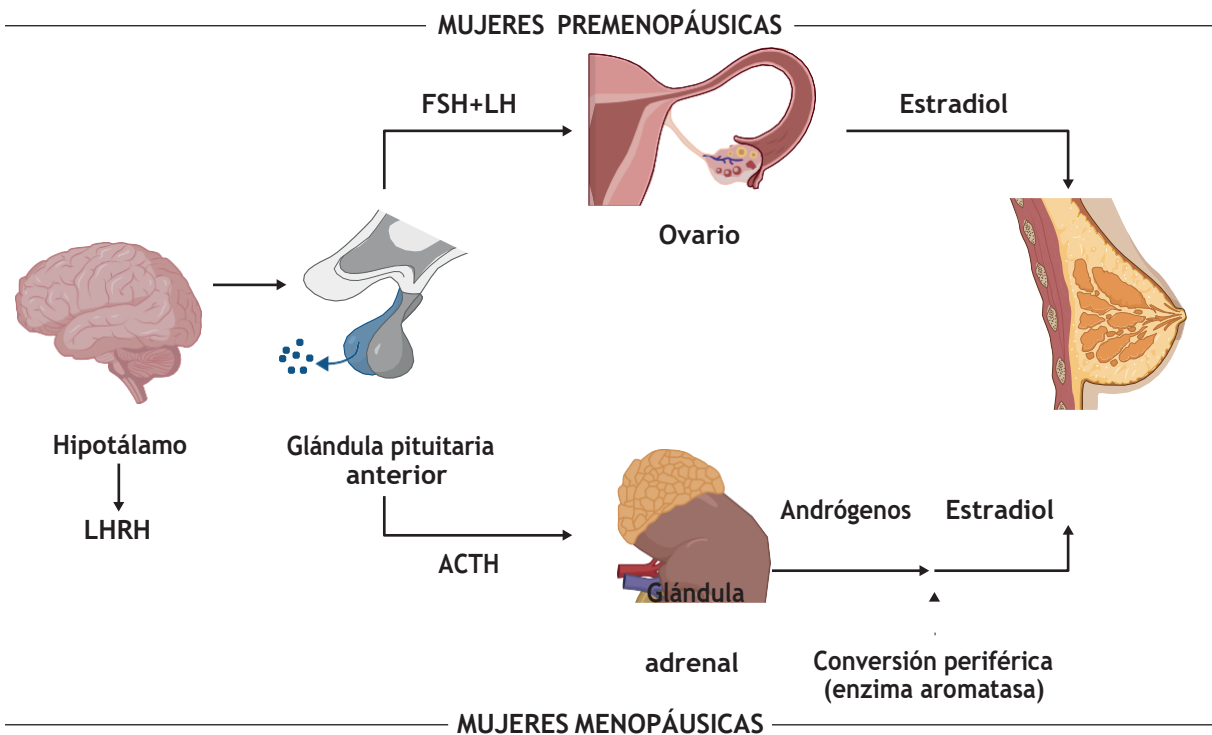
1. La vía genómica clásica: El estrógeno difunde a través de la membrana al citosol, una vez allí se une al RE y el complejo se transloca al núcleo celular. Es en este momento donde el RE se une al ADN, el dominio de unión al ADN se encuentra en la zona central de la proteína, mediante unas zonas conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) que junto a diferentes proteínas coactivadores y coinhibidoras, regularan la transcripción de diferentes genes.
2. La vía genómica no clásica: Se trata cuando el complejo estrógeno-RE traslocado al núcleo se une a otros factores de transcripción (p.e., AP-1 o NF- $\kappa$ B) para mediar la señalización independientemente de las zonas ERE regulando actividad transcripcional de estos factores.
3. La vía no genómica: Una pequeña parte de RE está localizado cerca de la membrana plasmática. Los dímeros de RE activaran múltiples cascadas de señalización mediante interacciones directas de RE con varias proteínas como PI3K o la TK src.

Finalmente existe la vía independiente de ligando, esta vía activa los RE sin necesidad de estrógeno, serán diferentes factores de transcripción los que se encargaran de fosforilar el RE que translocará al núcleo.

Es bien conocida la dependencia que presenta el cáncer de mama RRHH+ por la vía de RE. Por lo que la inhibición de este receptor mediante ET se ha convertido en el pilar fundamental del tratamiento de este subtipo en prácticamente todas las etapas de la enfermedad.



**Figura 16.** Vía de señalización del receptor de estrógeno (RE $\alpha$ ). A. Vía clásica/genómica. B. vía no-clásica/genómica. C. Vía no genómica. D. Vía independiente de estrógenos. E2 = 17 $\alpha$ -estradiol; Co-Reg= proteínas co-reguladoras (pueden ser coactivadores o o coinhibidoras); FT= Factor de transcripción; P = Fosforilación; ER = Elementos de respuesta a otros factores de transcripción. (Adaptada de Le Romancer M., et al; *Endocrine Reviews*, 2011).



**Figura 17.** Mecanismo de generación de estradiol tanto en pacientes premenopáusicas como menopáusicas (Adaptado de Fallowfiel L., *Eur. J. Oncol. Nurs.*, 2004).



### » 3.1.1 Fisiología de la vía hormonal en pacientes pre y postmenopáusicas

En el momento de realizar tratamiento con ET es importante tener en cuenta la diferente fisiología hormonal que existe dependiendo el estado menopáusico de las pacientes ya que ésta tendrá implicaciones terapéuticas importantes. En las pacientes premenopáusicas la producción principal de estrógenos se realiza en los ovarios a través la estimulación ovárica. Esta estimulación es realizada a raíz de la producción de FSH y LH en la glándula pituitaria anterior por la LHRH generada en el hipotálamo. Mientras que las pacientes menopáusicas, dado que existe un déficit en la función ovárica, la gran mayoría de la producción estrogénica se realizará a raíz de la aromatización de los andrógenos a nivel de la grasa periférica<sup>180</sup> (Figura 17).

## 3.2 TRATAMIENTO ESTÁNDAR DEL CÁNCER DE MAMA RRHH+/HER2- ESTADIO PRECOZ

Aproximadamente el 90% de los tumores RRHH+/HER2- serán diagnosticados en estadios precoces, por lo que es en este momento donde se debe realizar el máximo esfuerzo terapéutico para curar a las pacientes<sup>2</sup>. El abordaje multidisciplinar será clave para poder alcanzar el máximo beneficio terapéutico implicando tratamientos locales, como la cirugía y radioterapia asociado a tratamientos sistémicos como la ET y la quimioterapia.

Sin embargo, no todas las pacientes van a presentar el mismo beneficio al tratamiento con quimioterapia y por tanto la decisión de utilizarla vendrá determinada en función de diferentes factores clínicos-patológicos y recientemente genómicos que aportan información pronóstica de las pacientes.

### » 3.2.1 Factores pronósticos

Existen diferentes características que pueden estar implicadas en el pronóstico de la paciente. Entre ellas: Factores patológicos, factores clínicos y, recientemente, factores genómicos.

- Los factores clínico-patológicos han sido y son utilizados clásicamente para establecer el pronóstico:

- **Estadificación tumoral:** se incluyen el tamaño tumoral y la afectación ganglionar, a mayor estadiaje tumoral peor pronóstico. El sistema más utilizado para realizar el estadiaje es el TNM (publicado por la American Joint Committee on Cancer o AJCC)<sup>181</sup>.
- **Tipo histológico:** existen diferentes tipos histológicos de cáncer de mama siendo el más frecuente el ductal (o no especial) con un 70-75%. Un 10-15% de ellos presentan histología lobular con una peor respuesta a tratamiento con quimioterapia-ET. Existen otras histologías menos frecuentes y en función de éstas el pronóstico y la sensibilidad a tratamientos puede variar<sup>182</sup>.
- **Grado histológico:** está basado en características de las células tumorales gradándose en 3 niveles (del 1 al 3). A mayor grado histológico menos diferenciación celular y peor pronóstico<sup>183</sup>.
- **Afectación o invasión linfovascular:** la presencia de invasión linfovascular peritumoral está correlacionada con afectación ganglionar y recurrencias locales<sup>184</sup>.

- La expresión de RE y RP: el porcentaje de expresión de éstos puede ser utilizado como factor pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento con ET (9). Asimismo, se ha observado que tumores con baja expresión de RE (1-10%) presentan poca sensibilidad a tratamientos con ET y un perfil más agresivo<sup>185</sup>.
- Índice de proliferación Ki67: puede ayudar a determinar la proliferación de las células tumorales. Se ha relacionado el Ki67 con un peor pronóstico (a más proliferación peor pronóstico)<sup>12,13</sup> y con una mayor quimiosensibilidad del tumor<sup>14</sup>.
- Edad: la edad al diagnóstico es un factor importante por diversos motivos: por un lado, tumores diagnosticados antes de los 40 años presentan con más frecuencia subtipos no-luminales, un mayor grado histológico, una menor expresión de RE y a veces mutaciones germinales asociadas<sup>186</sup>. Por otro lado, diferentes estudios observaron que el beneficio de la quimioterapia adyuvante a 10 años es mayor en las pacientes con diagnóstico de la neoplasia de mama menores de 50 años en comparación con aquellas con diagnóstico  $\geq 50$  años<sup>187</sup>.

- Los **factores genómicos** han sido incorporados recientemente en la práctica clínica habitual y están siendo de gran utilidad para complementar a los factores clínico-patológicos en establecer el pronóstico y realizar un mejor abordaje terapéutico:

- Subtipos intrínsecos: dentro del subtipo RRHH+/HER2- se encuentran representados todos los subtipos intrínsecos del cáncer de mama. Hasta un 10% aproximadamente de los tumores en estadio precoz RRHH+/HER2- por IHQ serán, por expresión génica, subtipos no-Luminales (Basal-like o HER2-E). No todos los subtipos tendrán el mismo pronóstico ni la misma sensibilidad a tratamientos hormonales. Mientras que los subtipos no-Luminales presentan una peor sensibilidad a ET y peor pronóstico, los subtipos Luminales presentan una mayor afinidad al tratamiento hormonosensible con un mejor pronóstico<sup>140,188,189</sup>.
- Plataformas genómicas: otro factor importante para añadir en la estadificación del cáncer de mama es la incorporación de los paneles multigenes como: Oncotype Dx, MammaPrint, Prosigna y Endopredict. Estos test nos informaran del pronóstico y del subtipo intrínseco (en caso del Prosigna)<sup>190,191</sup>.

La integración de los diferentes factores clínicos, patológicos y genómicos ayudará a elucidar mejor el pronóstico dentro del amplio espectro del cáncer de mama RRHH+/HER2- y por tanto realizar un tratamiento dirigido a las pacientes optimizando el beneficio sin aumentar los riesgos.

### » 3.2.2 Tratamiento de quimioterapia

A pesar de que el cáncer de mama RRHH+/HER2- es considerado clásicamente como el subtipo con mejor pronóstico, éste se encuentra compuesto por una gran heterogeneidad clínica y biológica, presentando diferentes sensibilidades a tratamientos y diferentes pronósticos<sup>20,192</sup> (**Figura 18**).

Hace ya más de 2 décadas que se observó el beneficio del tratamiento con poliquimioterapia en este subtipo, con una disminución del riesgo de recurrencia de hasta un 12% y una disminución

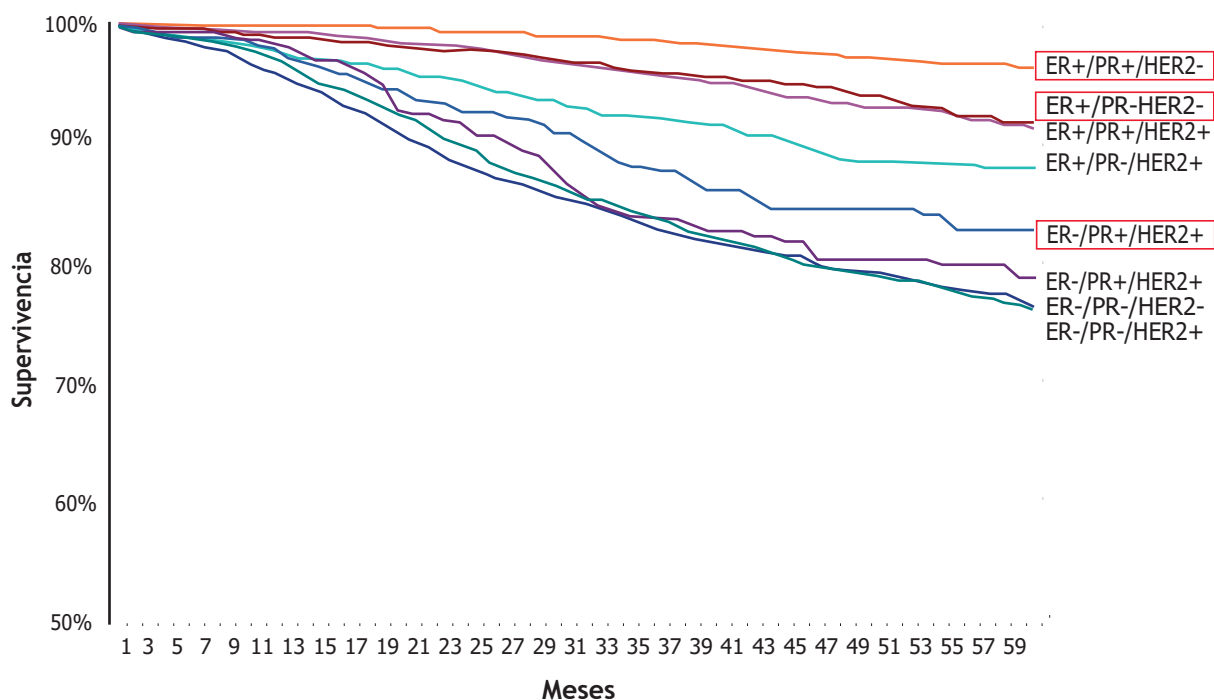
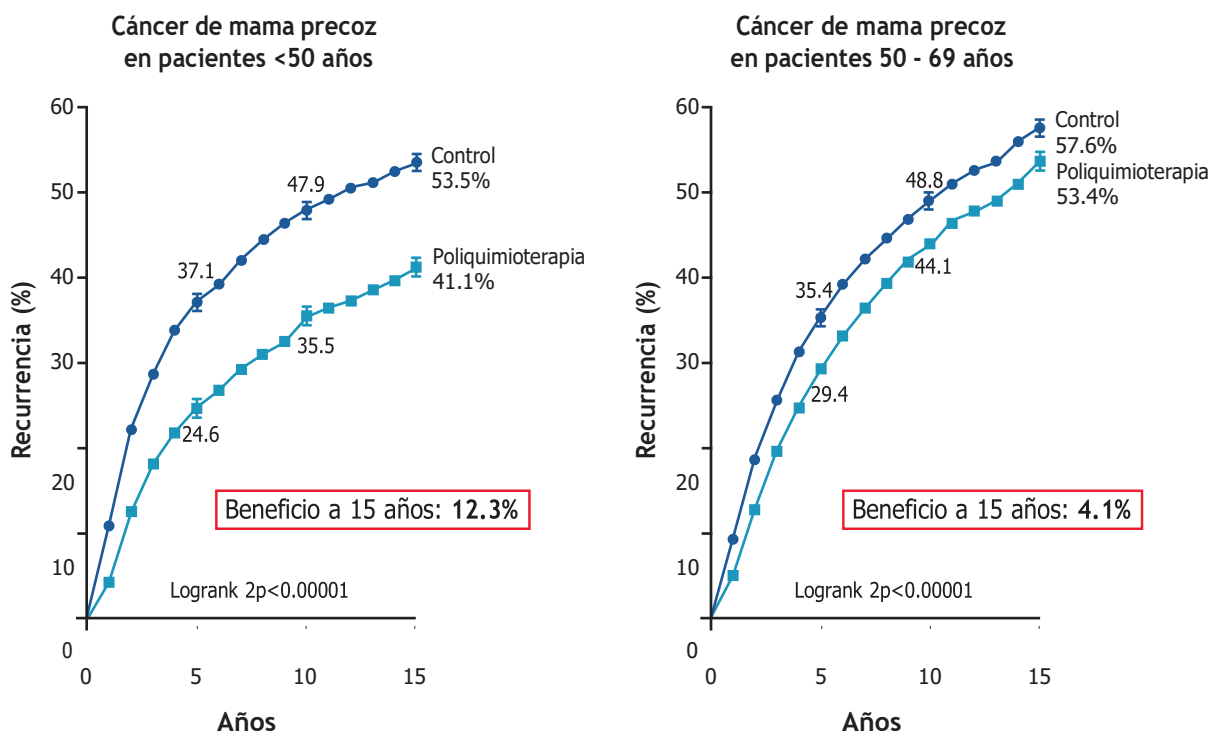


Figura 18. Supervivencia de los diferentes subtipos determinados por IHQ del cáncer de mama. (Adaptado de Parise C., et al; *The Breast Journal*, 2009).

de la mortalidad por esta enfermedad de hasta en un 10% a 15 años de seguimiento. El beneficio observado es mayor cuando mayor es el estadiaje tumoral y en pacientes más jóvenes (< 50 años) (Figura 19). En este subtipo, no es infrecuente diagnosticar recaídas más allá de los 5 o 10 años<sup>192</sup>, por lo que el tratamiento con quimioterapia asociada a ET ha sido una opción muy utilizada<sup>193</sup>.



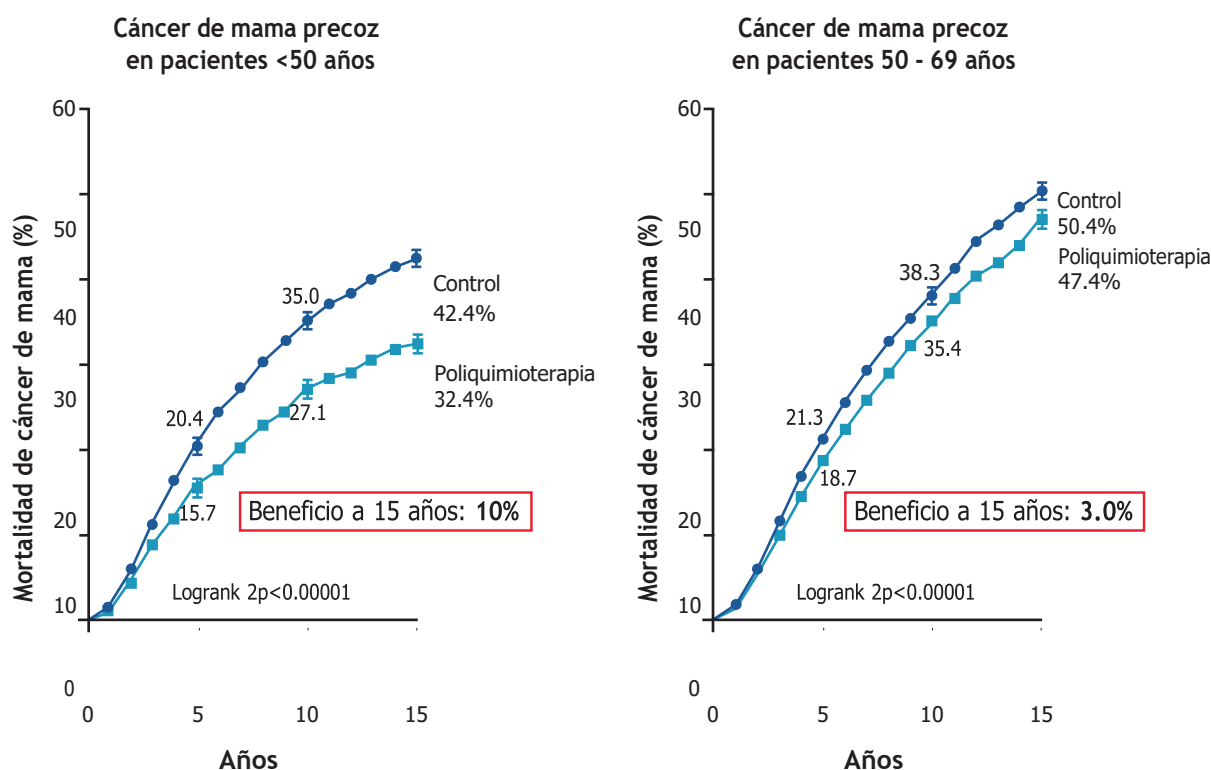


Figura 19. Recurrencia (a distancia, local o contralateral) y mortalidad del cáncer de mama por edades (<50 o 50-69 años) en función de tratamiento con o sin quimioterapia (Adaptado de EBCTCG, *The Lancet*, 2005).

De los diferentes esquemas que se pueden llegar a utilizar de quimioterapia, en general, se ha observado que los regímenes basados en antraciclinas y taxanos de forma secuencial generan un mayor beneficio en cuanto a disminución de recurrencia y mortalidad. Si bien es cierto que existen otros regímenes utilizados como esquemas basados en ciclofosfamida más docetaxel que ha demostrado presentar un beneficio en determinadas situaciones<sup>187,194</sup>.

En general la recomendación de utilizar tratamiento con quimioterapia se realizará siempre y cuando se estime que el riesgo de recaída a 10 años es superior a 10%. Los esquemas preferidos serán aquellos que incluyan antraciclinas y taxanos de forma secuencial<sup>195</sup>, aunque también existen otras combinaciones que podrán ser de utilidad en situaciones particulares como, por ejemplo, comorbilidades por cardiotoxicidad o riesgos intermedios<sup>194,196</sup>. Recientemente, se ha observado que realizar un esquema en dosis densas reduce la mortalidad sin añadir más toxicidad<sup>197</sup>.

La decisión de realizar tratamiento con quimioterapia (neo)adyuvante debe estar basada en la potencial sensibilidad del tumor al tratamiento y el beneficio de ésta con el riesgo individual de la paciente. Hay que tener en cuenta, además, las toxicidades a corto y largo plazo, la biología del tumor, la edad y las diferentes comorbilidades y preferencias.

### » 3.2.3 Tratamiento hormonal adyuvante

Dado que el RE es un *driver* oncogénico y un factor pronóstico, la ET será un pilar fundamental en el tratamiento del cáncer de mama RRHH+. A lo largo de décadas múltiples estudios han podido demostrar como el tratamiento ET adyuvante es crucial para estas pacientes ofreciendo un beneficio incluso en tumores infracentimétricos<sup>9,198</sup>. Por lo que hoy en día realizar una adyuvancia

de entre 5 y 10 años con ET será una estrategia primordial en el tratamiento de este subtipo de cáncer de mama<sup>199</sup>.

Existen diferentes tipos de tratamientos hormonales utilizados en adyuvancia según su mecanismo de acción. De entre los principales hay que destacar: el tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM), y los inhibidores de la aromatasa (IA) como el anastrozol, letrozol y exemestano<sup>200</sup>.

Durante años, el tratamiento con tamoxifeno, por un mínimo de 5 años, ha sido la terapia hormonal adyuvante estándar, observándose un beneficio en cuanto a disminución de recurrencias y mortalidad. Este beneficio se observó tanto en tumores luminales A y B (por IHQ), independientemente del estado menopáusico, de la afectación ganglionar y del tratamiento con quimioterapia<sup>9</sup>. Incluso tumores <1cm y sin afectación ganglionar presentaron un beneficio a este tratamiento<sup>201</sup>. Los beneficios de 5 años de tratamiento adyuvante con tamoxifeno tuvieron repercusión a largo plazo, disminuyendo las tasas de recurrencia (tanto local, contralateral o a distancia) a 15 años en aproximadamente un 13% (pasando de 46.2% a 33% sin y con tamoxifeno respectivamente; RR 0.61 (95% IC 0.57 – 0.65),  $p < 0.00001$ ), así como una reducción de la mortalidad por cáncer de mama en un 9% aproximadamente (de 33.1% y 23.9% sin y con tamoxifeno; RR 0.70, 95% IC 0.94 – 0.75,  $p < 0.00001$ )<sup>9</sup>.

Posteriormente, la aparición de los IA consiguió reducir los niveles de estrógeno en mujeres menopáusicas en más de un 90%<sup>198</sup>, por lo que se valoró su utilización en este grupo de pacientes. El tratamiento con IA en pacientes menopaúsicas durante 5 años ha conseguido reducir en un 3% las tasas de recurrencia (local, contralateral y a distancia) a 10 años en comparación con el tamoxifeno, pasando de 22.7% con tamoxifeno a 19.1% con IA (RR=0.80, 95% IC 0.73 – 0.88;  $p < 0.00001$ ) y disminuir en un 2% las tasas de mortalidad por cáncer de mama a 10 años pasando de 14.2% a 12.1% con tamoxifeno e IA respectivamente (RR = 0.85, 95% IC 0.75 – 0.96;  $p < 0.00001$ ). Por lo que hoy en día se ha convertido en el tratamiento de elección en pacientes menopáusicas<sup>202</sup>.

En pacientes premenopáusicas el principal origen de los estrógenos se encuentra en la producción ovárica (**Figura 17**), por lo que, la forma más eficaz de realizar una disminución del estrógeno periférico se observó mediante la realización del bloqueo de la función ovárica mediante análogos de GnRH/LHRH asociado a ET (**Tabla 7**).

Uno de los estudios realizados más grandes fue el estudio fase III SOFT, un estudio en adyuvancia que aleatorizó más de 3,000 pacientes a recibir tratamiento con tamoxifeno, tamoxifeno más supresión de la función ovárica (SFO) o exemestano más SFO<sup>205</sup>. Tras 8 años de seguimiento se observó un claro beneficio en la adición de SFO al tratamiento frente a tamoxifeno en monoterapia con un SLE invasiva de 78.9%, 83.2% y 85.9% con tamoxifeno, tamoxifeno más SFO y exemestano más SFO ( $p=0.009$  de tamoxifeno en comparación con tamoxifeno más SFO) y en SG a 8 años de 91.5% con tamoxifeno, 93.3% con tamoxifeno más SFO y 92.1% con exemestano más SFO ( $p=0.01$  de tamoxifeno en comparación con tamoxifeno más SFO). Este beneficio fue particularmente acusado cuando se realizó el análisis en pacientes <35 años, donde se observó una SLE de 82.4% añadiendo SFO más exemestano, 77.5% con tamoxifeno más SFO y 73.8% con tamoxifeno en monoterapia<sup>205</sup>.

	ASTRA <sup>203</sup> (FASE III)	SOFT204 (FASE III)
NÚM. PACIENTES	1,282	2,033*
AÑOS DE DURACIÓN DE SFO	2 años	5 años
SLE CON TAMOXIFENO EN MONOTERAPIA	80.2% (8 años de seguimiento)	71.9% (12 años de seguimiento)
SLE CON SFO + TAMOXIFENO	85.4% (8 años de seguimiento)	76.1% (12 años de seguimiento)
HR (95% IC)	0.67 (0.51–0.87)	0.82 (0.69 – 0.98)
SG CON TAMOXIFENO EN MONOTERAPIA	95.3% (8 años de seguimiento)	86.8% (12 años de seguimiento)
SG CON SFO MÁS TAMOXIFENO	96.5% (8 años de seguimiento)	9.0% (12 años de seguimiento)
HR (95% IC)	0.78 (0.49 – 1.25)	0.78 (0.60 – 1.01)

**Tabla 7.** Diferentes ensayos clínicos que añadieron SFO a tratamiento con tamoxifeno en monoterapia y su asociación con SLE y SG. SFO= Supresión de la función ovárica. HR = Hazard ratio.

\*Número de pacientes incluidos en el brazo de tamoxifeno en monoterapia y tamoxifeno más SFO.

Recientemente, el seguimiento publicado a 12 años del estudio SOFT ha confirmado este beneficio con casi un 4% y 7% en tasas de SLE con la adición de SFO a tamoxifeno y exemestano respectivamente y unas tasas de SG de 86.8%, 89.0% y 89.4% con tamoxifeno en monoterapia, tamoxifeno más SFO y exemestano más SFO respectivamente<sup>204</sup>. Remarcar que se persistió observando el máximo beneficio en pacientes más jóvenes (<35 años) donde se observó un beneficio de > 7% en SG en el grupo con adición de SFO<sup>204</sup>.

A pesar de la implementación del tratamiento mediante 5 años de ET ( $\pm$  SFO) tanto en pacientes pre como menopáusicas, el riesgo de recaída a 5 y 20 años se puede llegar a situar entre el 10% y el 40% dependiente del estadiaje inicial. Por lo que en los últimos años está siendo muy debatida la opción de alargar la duración del tratamiento ET adyuvante más allá de los 5 años considerados estándares. Se han llevado a cabo múltiples estudios con deferentes combinaciones, esquemas y duración de tratamiento, con resultados controvertidos en cuanto al beneficio observado. Lo que si se observó es que el beneficio de la extensión del tratamiento hormonal es mayor a más características riesgo clínico-patológicas y genómicas.

Como conclusión, las guías recomiendan utilizar ET en todos los casos de cáncer de mama RRHH+ independientemente del estadio y del estatus menopáusico durante 5 años. En el caso de pacientes premenopáusicas el tamoxifeno sigue siendo una opción de elección y añadir SFO a tamoxifeno o IA mediante análogos de la GnRH/LHRH si hay criterios de alto riesgo. En cuanto a pacientes menopáusicas utilizar un IA será la opción de elección, pudiendo realizar tratamiento secuencial con tamoxifeno. En cuanto a la extensión más allá de los 5 años, la recomendación general es realizar una extensión en pacientes presenten criterios de alto riesgo<sup>206</sup>.

### 3.3 SOBRETAMIENTO DE LAS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA RRHH+/HER2- PRECOZ

Con todas las estrategias terapéuticas de las que disponemos hoy en día, las tasas de curación de este subtipo de cáncer de mama son muy altas, situándose por encima del 80-90%, por lo que muchas veces se corre el riesgo de sobre tratar a las pacientes, en especial aquellas más jóvenes<sup>191</sup>. El objetivo final en el tratamiento del cáncer de mama es la curación, por lo que el riesgo de realizar un tratamiento excesivo es muy alto.

Intentar realizar todos los tratamientos disponibles en estas pacientes puede llegar a ser contraproducente y acabar ocasionando morbilidades potencialmente permanentes provocando una clara disminución en la calidad de vida sin alcanzar un claro beneficio (**Figura 11**)<sup>117</sup>. Por todo ello, realizar una correcta estratificación de riesgo y saber que pacientes se van a beneficiar del tratamiento con quimioterapia es clave para no realizar una toxicidad inaceptable.

Clásicamente los únicos factores pronósticos utilizados eran los clínico-patológicos<sup>187</sup>. Sin embargo, en la última década diferentes datos de expresión génica han sido implementados en diferentes plataformas genómicas siendo utilizados en la práctica clínica habitual para valorar el riesgo<sup>191</sup>. Recientemente, estos paneles están siendo utilizados en la clínica para valorar la desescalada de tratamiento incluso en pacientes con afectación ganglionar<sup>19,198</sup>.

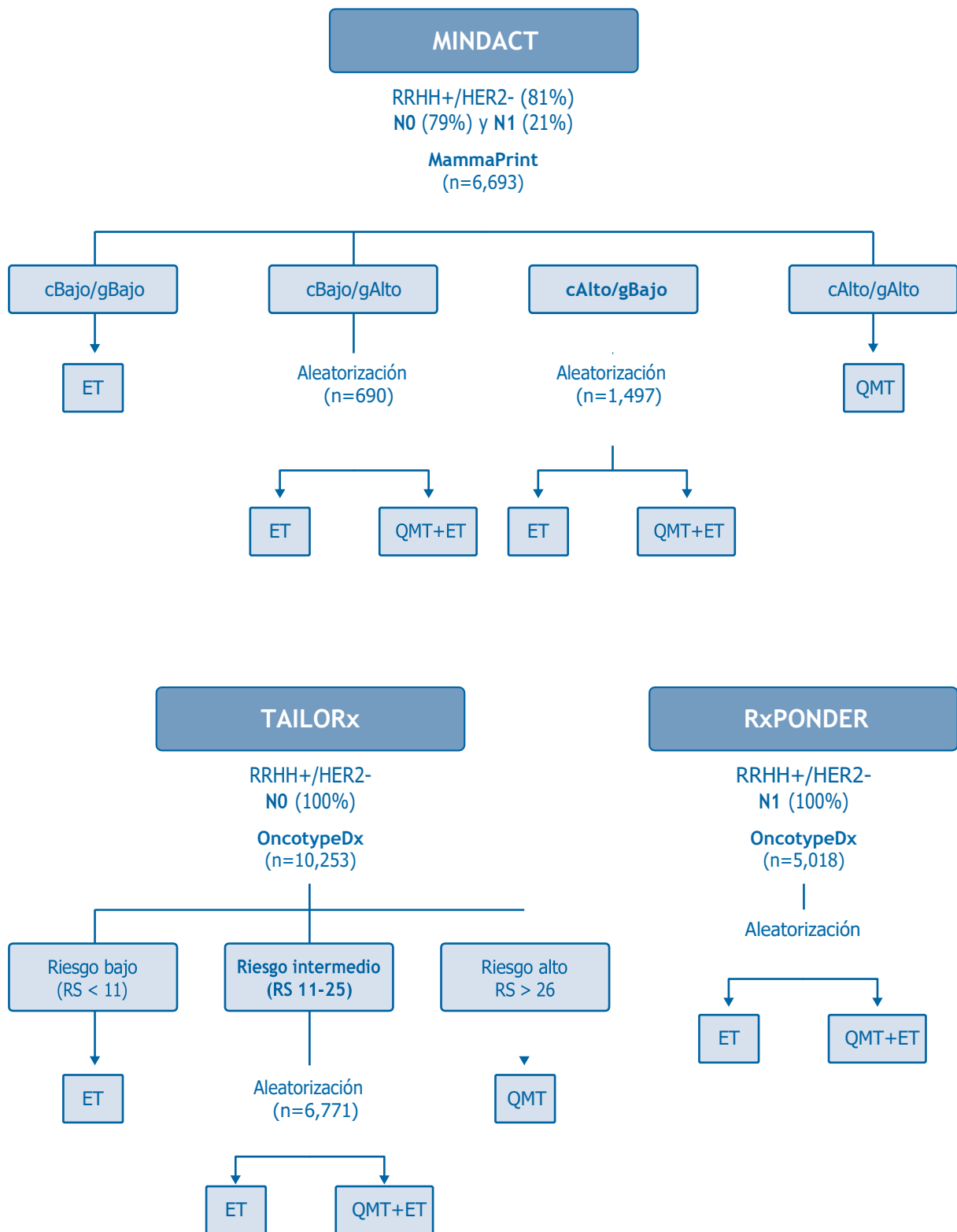
#### » 3.4 Uso de plataformas genómicas en el cáncer de mama RRHH+/HER2-

La incorporación de las plataformas genómicas en el abordaje terapéutico del cáncer de mama hormonodependiente en estadio precoz ha permitido identificar pacientes que pueden evitar el tratamiento con quimioterapia adyuvante. Mediante análisis de expresión génica definen categorías de riesgo de recurrencia a partir de las cuales se tomarán decisiones terapéuticas, proporcionando información complementaria a los parámetros clínico-patológicos tradicionales.

Las cuatro plataformas génicas disponibles en la práctica clínica habitual hoy en día son: las de primera generación – firma de 21 genes que indica el *Recurrence Score* (RS), Oncotype Dx (Genomic Health, Exact Science, Madison, WI, US)<sup>207,208</sup>, y la firma de 70 genes MammaPrint (Agendia, Inc., Irvine, CA, US)<sup>209</sup>, - y las de segunda generación - PAM50-*Risk of recurrence* (ROR) Prosigna (Veracyte, San Francisco, CA, US)<sup>210,211</sup> y Endopredict (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, US)<sup>212</sup>. Todas ellas aportarán información pronóstica y el subtipo intrínseco en el caso del Prosigna. El desarrollo de estas plataformas ha permitido obtener información adicional para poder realizar un tratamiento adyuvante más personalizado. El empleo de estas plataformas genómicas ha sido incorporado en las guías clínicas nacionales e internacionales<sup>19,104,213</sup>.

##### » 3.4.1 Desescalada de tratamiento

La desescalada de tratamiento en pacientes con cáncer de mama RRHH+/HER2- en estadios precoces ha sido uno de los objetivos más buscados en el tratamiento personalizado desde hace ya más de una década. La incorporación de las diferentes plataformas génicas a la práctica clínica habitual ha sido un avance clave ya que ha permitido realizar una mejor estratificación de riesgo de las pacientes, pudiendo llegar a identificar aquellos tumores que no se beneficiaran de tratamiento con quimioterapia.



**Figura 20.** Diseños de los 3 estudios fases III, MINDACT, TAILORx y RxPONDER (Adaptado de Piccart M., et al; *Ann. Oncol.*, 2021).



Hoy en día, dos firmas génicas, la de 21 genes-RS Oncotype Dx y la de 70 genes MammaPrint han alcanzado a tener nivel 1A de evidencia a través de 3 grandes ensayos clínicos prospectivos fases III: TAILORx<sup>214</sup>, RxPONDER<sup>208</sup>, y MINDACT<sup>209</sup> respectivamente (**Figura 20**).

La firma de 70 genes - MammaPrint-, es una firma génica que permite clasificar los tumores en dos grupos: alto o bajo riesgo de recaída<sup>215</sup>. Esta firma fue valorada en el estudio prospectivo fase III MINDACT. Este estudio incluyó pacientes con cáncer de mama precoz, un 81% de los tumores incluidos fueron RRHH+/HER2- y el 19% restante HER2+ o TN. Se incluyeron tumores con estadios T1, T2 y T3 operables, la mayoría sin afectación ganglionar (N0) con un 21% de pacientes incluidas con afectación de 1 a 3 ganglios (N1)<sup>216</sup>.

Las pacientes incluidas se clasificaron en función de dos criterios de riesgo: el riesgo clínico y el riesgo genómico. Los criterios que definieron el alto riesgo clínico fueron: 1) afectación ganglionar (N1) excepto si eran grado histológico 1 o tenían un diámetro < 2 cm; 2) N0 asociando a alguna de las siguientes características: grado histológico 3 y tamaño > 1 cm o grado histológico 2 y tamaño > 2cm o grado histológico 1 y tamaño > 3 cm. El criterio genómico fue establecido en función del resultado de la prueba MammaPrint.

Una vez establecidos los dos criterios se realizaron 4 grupos: 1) alto riesgo clínico y alto riesgo genómico (cAlto/gAlto); 2) bajo riesgo clínico y bajo riesgo genómico (cBajo/ gBajo) y finalmente los grupos discordantes: 3) alto riesgo clínico y bajo riesgo genómico (cAlto/gBajo) y 4) bajo riesgo clínico y alto riesgo genómico (cBajo/gAlto).

El grupo de pacientes clasificadas como cAlto/gAlto recibieron tratamiento con quimioterapia más ET mientras que el grupo cBajo/ gBajo recibió tratamiento sistémico con ET. En los 2 grupos discordantes se aleatorizaron las pacientes a recibir tratamiento con ET o quimioterapia más ET (**Figura 20**). El objetivo primario fue determinar que la supervivencia libre de metástasis (SLM) a 5 años era > 92% en el grupo de cAlto/gBajo que no recibió tratamiento con quimioterapia<sup>216</sup>.

Fue un estudio positivo para su objetivo primario con una tasa de SLM a 5 años de 94.7% (95% CI, 92.5 - 96.2) en el grupo cAlto/gBajo que no recibió tratamiento con quimioterapia, sin observar diferencias significativas en cuanto a SLM a 5 años en función brazo de tratamiento y se mantuvo a 8 años de seguimiento con una SLM de 95.1%<sup>216</sup>.

Sin embargo, se si observó un pequeño beneficio a favor de la quimioterapia más ET en comparación con ET con SLM 92% y 89.4% respectivamente (HR 0.66, 95% IC 0.48 – 0.92) a 8 años de seguimiento. Esta diferencia se mantuvo en el grupo de N0 con una SLM a 8 años de 91.7% versus 89.2% en el grupo de quimioterapia más ET y ET respectivamente (HR 0.60; 95% IC 0.38 – 0.96), pero no se observó en el grupo con afectación ganglionar<sup>209</sup>.

En conclusión, la firma de 70 genes MammaPrint es capaz de identificar pacientes RRHH+/HER2- mayores de 50 años con afectación de hasta tres ganglios y clasificados como alto riesgo clínico y que presentan un bajo riesgo genómico donde el tratamiento con quimioterapia no aporta un beneficio significativo.

El Oncotype Dx es una prueba que determina la expresión de 21 genes ofreciendo un resultado expresado con el RS mediante un valor de 0-100. En función del resultado, la prueba clasifica los tumores en 3 grupos, bajo riesgo (0-10), intermedio (11-25) y alto riesgo ( $\geq 26$ )<sup>217</sup>. Estudios previos han demostrado que presentar un RS de alto riesgo (definido como RS  $>31$  y posteriormente modificado a  $>26$ ) es predictivo de respuesta a tratamiento con quimioterapia<sup>218,219</sup>. Mientras que presentar un RS de bajo riesgo (entre 0-10) es un factor de buen pronóstico, presentando con una tasa de recurrencia a distancia del 2% a 10 años con tratamiento ET en monoterapia, por lo que es muy improbable que realizar tratamiento con quimioterapia aporte algún beneficio adicional<sup>218,219</sup>.

El grupo de tumores clasificados como riesgo intermedio, situado entre el 11-25 fue valorado en el gran estudio fase III TAILORx<sup>220</sup>.

El estudio TAILORx incluyó más de 10,000 pacientes con cáncer de mama precoz RRHH+/HER2-, todas ellas sin afectación ganglionar (N0). En este estudio se clasificaron las pacientes en diferentes grupos en función del resultado de RS obtenido a raíz de la prueba Oncotype Dx y se asignó un tratamiento acorde al RS. El grupo de bajo riesgo (RS 0-11) recibieron tratamiento con ET dado su buen pronóstico, mientras que el grupo de alto riesgo (RS  $\geq 26$ ) recibieron tratamiento con quimioterapia más ET, dado su mal pronóstico. El grupo de pacientes con tumores clasificados con un riesgo intermedio (RS 11-25) se aleatorizaron a recibir tratamiento con ET o quimioterapia más ET (Figura 20). El objetivo primario del estudio fue demostrar la no inferioridad del tratamiento de ET en SLE invasiva a 5 años en el grupo de riesgo intermedio.

Fue un estudio positivo por su objetivo primario, observando que las pacientes diagnosticadas con tumores clasificados con RS entre 11-25 que no recibieron tratamiento con quimioterapia, el intervalo libre de enfermedad invasiva no era inferior al grupo que recibió tratamiento con quimioterapia más ET con unas tasas de SLE invasiva de 92.8% en el brazo de ET y 93.1% en el de quimioterapia más ET a 5 años y de 83.3% y 84.3 % a 9 años respectivamente.

Además, se confirmó que el grupo de bajo riesgo RS  $\leq 10$  tratados únicamente con ET presentaban un pronóstico excelente con una tasa de recurrencia a distancia del 1% a 5 años y 3% a 9 años<sup>207</sup>. Una reciente actualización a 12 años de seguimiento corroboró que no se observaron diferencias significativas en los brazos de tratamiento en el grupo a estudio (RS 11-25), con una SLE invasiva de 76.8% y 77.4% con ET y quimioterapia más ET respectivamente y con una SG de aproximadamente del 90% en los dos grupos<sup>221</sup>.

Al asociar los factores clínico-patológicos al algoritmo se observó que añadían un valor pronóstico al RS, pero no predictivo de respuesta a quimioterapia. Este valor pronóstico asociado se observó principalmente en el grupo de alto riesgo, que, a pesar de ser tratado con quimioterapia, el riesgo de recurrencia era mayor si presentaban un riesgo clínico alto<sup>214</sup>.

Con todo ello, se puede llegar a concluir que pacientes diagnosticadas con cáncer de mama RRHH+/HER2- sin afectación ganglionar, y que presenten un RS entre 0-25 pueden ahorrarse tratamiento con quimioterapia independientemente de los factores clínico-patológicos. Esta afirmación será así en pacientes  $>50$  años, sin embargo, habrá que tener en cuenta otros aspectos para poder

establecer el beneficio de la quimioterapia en pacientes más jóvenes (se entrará en detalle en el apartado 3.4.2).

Posteriormente se evaluó el efecto pronóstico de la firma de 21-genes Oncotype Dx en pacientes con cáncer de mama precoz RRHH+/HER2- con afectación ganglionar N1 (1-3 ganglios afectados). Se realizó a través del ensayo clínico prospectivo fase III RxPONDER<sup>208</sup>.

El objetivo primario de este estudio fue determinar el efecto de la quimioterapia en SLE invasiva a 5 años y determinar si el beneficio relativo de la quimioterapia aumentaba con el RS. Dado que ya se había determinado que el grupo de alto riesgo (RS >26) presentaba mal pronóstico incluso con quimioterapia, el estudio RxPONDER incluyó únicamente tumores de riesgo bajo e intermedio (RS 0-25). En este estudio todas las pacientes incluidas fueron aleatorizadas a recibir tratamiento con ET asociado o no a quimioterapia.

El estudio no observó diferencias significativas en cuanto a SLE invasiva a 5 años entre los dos brazos de tratamiento con una SLE invasiva en la población total de 92.2% en el brazo de quimioterapia seguido de ET y 91% en el brazo de ET. Cuando se realizó un subestudio por edades se observó que en pacientes menopáusicas (o  $\geq$  50 años) se seguía sin observar un beneficio en la adición de quimioterapia al régimen de ET (con una SLE invasiva de 91.9% y 91.3% en el grupo sin quimioterapia respecto al grupo con quimioterapia más ET respectivamente). En cambio, si se observó un beneficio de la quimioterapia en el grupo de pacientes premenopáusicas (o < 50 años) (como se entrará en detalle en el apartado 3.4.2)<sup>208</sup>.

En conclusión, tanto el estudio TAILORx como el estudio RxPONDER nos informan que en pacientes menopáusicas la quimioterapia no ofrece un beneficio cuando el RS se sitúa <25 incluso con afectación ganglionar, N1. El RS ofrece información pronóstica independiente de los factores clínico-patológicos.

### » 3.4.2 Uso de las plataformas genómicas en pacientes premenopáusicas

Aproximadamente entre un 4-7% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama serán < 40 años<sup>222</sup>. Clásicamente se ha relacionado el cáncer de mama en edades jóvenes con un subtipo más agresivo, con un mayor riesgo de recurrencia y un mayor riesgo de muerte por esta enfermedad<sup>222,223</sup>.

Un mayor estadiaje tumoral al diagnóstico, mayor grado histológico, menor expresión de RE y RP y una mayor expresión de genes relacionados con proliferación y de resistencia endocrina, son diferentes factores patológicos y moleculares que pueden llegar a condicionar que las pacientes diagnosticadas en edades más jóvenes presenten un peor pronóstico. Sin embargo, es importante destacar que en la mayoría de los estudios no estratificaron por subtipo de cáncer de mama<sup>186,224</sup>.

Este peor pronóstico en comparación con pacientes de mayor edad es especialmente patente en el subgrupo de pacientes con subtipo luminal-like (RRHH+/HER2-)(186,224). Se ha observado que en pacientes más jóvenes existe un mayor porcentaje de tumores luminales B-like en comparación con tumores luminales A-like, así como un mayor porcentaje de mutaciones en *GATA3* y menor en *PIK3CA*, en comparación con pacientes mayores, mutaciones que se han asociado a resistencia

endocrina y buen pronóstico respectivamente<sup>225</sup>. Además, en un análisis combinado publicado recientemente, se ha observado que, en pacientes con edad  $\leq 40$  años, existe una mayor proporción de tumores clasificados como riesgo intermedio-alto por plataforma genómica en comparación con el grupo  $>40$  años<sup>226</sup>.

Recientemente, datos del estudio SOFT han observado que en pacientes  $< 40$  años existe un mayor porcentaje de tumores clasificados como alto riesgo (por ROR score determinado por PAM50/Prosigna), siendo del 36% y 14% (en  $< 40$  años y  $\geq 40$  años respectivamente) en el grupo sin afectación ganglionar y del 80% en comparación con 66% en el grupo con afectación ganglionar respectivamente. En cuanto al pronóstico, las pacientes que presentaron tumores clasificados como ROR score de bajo riesgo presentaron un intervalo de recurrencia libre de enfermedad a distancia a 10 años similar (94.1% en  $<40$  años y 96.6%  $\geq 40$  años). Sin embargo, en el grupo de tumores clasificado como alto riesgo se observó un intervalo libre de recurrencia de enfermedad a distancia a 10 años del 69.1% en  $< 40$  años y  $\geq 40$  años de 81.7% (Brown L., et al; Abstract 504, *ASCO annual meeting 2023*).

Todo ello, acaba generado que el tratamiento de quimioterapia en contexto (neo)adyuvante siga siendo una de las terapias favoritas en este subgrupo de pacientes sin tener la certeza que ésta aporte un beneficio real.

Con el desarrollo de los diferentes estudios de plataformas genómicas, la idea de desescalada de tratamiento de quimioterapia ha sido muy valorada y una opción para múltiples pacientes. Sin embargo, se observaron diferencias en cuanto al beneficio de la quimioterapia en función del estado menopáusico, ello ha condicionado que la desescalada de tratamiento en estas pacientes sea todavía difícil de posicionar.

En el estudio MINDACT en el grupo de pacientes con diagnóstico de RRHH+/HER2- con cAlto/gBajo, se observó que mientras que el grupo de  $> 50$  años no presentaba diferencias estadísticamente significativas entre los dos brazos de tratamiento (quimioterapia más ET versus ET) en cuanto a SLM a 8 años de seguimiento, si se observó un beneficio claro del tratamiento con quimioterapia más ET en el grupo de pacientes  $\leq 50$  años con un aumento absoluto de aproximadamente el 5%, pasando de 88.6% en el grupo de ET a 93.6% en el grupo de quimioterapia más ET (HR 0.54; 95% IC 0.30 -0.9)<sup>209</sup>.

Estas diferencias también se observaron en los ensayos realizados con la prueba Oncotype Dx en los estudios TAILORx y RxPONDER. En relación con el subgrupo de pacientes con tumores clasificados como riesgo intermedio (RS 11-25) del estudio TAILORx, mientras que las pacientes de  $>50$  años no obtenían un beneficio significativo con la adición de quimioterapia al tratamiento de ET, si se observó una diferencia significativa en el grupo de pacientes  $\leq 50$  años. En este subgrupo ( $\leq 50$  años y RS 11-25) se observó un beneficio de la quimioterapia respecto a ET en cuanto a SLE de 0.8% y 1.6% a 5 y 9 años respectivamente si presentaban un RS 16-20 (siendo la SLE 92.0 % $\pm$  1.3 y 94.7%  $\pm$  1.1 a 5 años y 80.6 % $\pm$  2.5 y 89.6% $\pm$  1.7 a 9 años con ET respecto a quimioterapia seguido de ET). Esta diferencia fue mayor en el grupo de RS 21-25 con una SLE a 5 años de 86.3% con ET y 92.1% con quimioterapia más ET respectivamente y esta diferencia aumentó a 6.5% de beneficio de quimioterapia más ET

ENSAYO CLÍNICO	PLATAFORMA GENÓMICA UTILIZADA	POBLACIÓN A ESTUDIO	GRUPO DE RIESGO ESTUDIADO	BENEFICIO REPORTADO DE QMT RESPECTO A ET
MINDACT <sup>209</sup>	MammaPrint	Pacientes ≥50 años N0 – N1	cAlto/gBajo	No diferencias
MINDACT <sup>209</sup>	MammaPrint	Pacientes <50 años N0-N1	cAlto/gBajo	SLM a 8 años $\uparrow$ 5% en el brazo de QMT
TAILORx <sup>214</sup>	Oncotype Dx	Pacientes >50 años N0	RS 11-25	No diferencias
TAILORx <sup>214</sup>	Oncotype Dx	Pacientes ≤50 años N0	RS 11-25	↓ 1.6% en tasas de recurrencia a distancia en brazo de QMT a 9 años Criterios clínicos de alto riesgo: 6.5% tasas de recurrencia a distancia en el brazo de QMT a 9 años
			RS 21-25	↓ 6.5% en tasas de recurrencia a distancia en el brazo de QMT a 9 años, independientemente del riesgo clínico
RxPONDER <sup>208</sup>	Oncotype Dx	Pacientes ≥50 años (o menopáusicas) N1	RS < 26	No diferencias a 5 años
RxPONDER <sup>208</sup>	Oncotype Dx	Pacientes < 50 años (o premenopáusicas) N1	RS < 26	SLEi de 5.2% en brazo de QMT a 5 años

**Tabla 8.** Diferencias entre las plataformas MammaPrint y Oncotype en cuanto su objetivo primario en función de la edad (pacientes > 50 años o ≤ 50 años) o . SLEi = Supervivencia libre de enfermedad invasiva; QMT = quimioterapia.

respecto a la terapia ET a 9 años de seguimiento (SLE 85.5% ± 3.0 y 79.2% ± 3.3 respectivamente). Sin embargo, la SG fue similar en los diferentes grupos(214) (Tabla 8). A 12 años de seguimiento este beneficio de la quimioterapia se mantuvo en el grupo RS 16 a 25<sup>221</sup>.

Cuando se analizó en el grupo de pacientes de ≤ 50 años con los grupos de RS extremo, bajo (RS ≤ 10) y alto (RS ≥ 26) se mantuvieron como los grupos de mejor y peor pronóstico con una SG de 98.6% y 92.4% a 9 años respectivamente<sup>214</sup>.

Al asociar los factores clínico-patológicos al algoritmo de Oncotype DX se observó un mayor beneficio del tratamiento de quimioterapia en el grupo con RS intermedio (11-25) y factores clínicos de alto riesgo, con una probabilidad de 12.3% de recurrencia a distancia en el grupo de ET y 6.1% en el

grupo de quimioterapia más ET a 9 años. En cambio, estas diferencias no fueron tan significativas en el grupo de bajo riesgo clínico con un 4.7% con ET y 3.9% con quimioterapia más ET. Esta diferencia en el beneficio fue más evidente en el subgrupo con RS entre 16-20 donde se observó un beneficio de la quimioterapia en pacientes con criterios de alto riesgo de aproximadamente un 6.5% que no se observó con criterios de bajo riesgo clínico. En cambio, cuando se obtenía un RS entre 21-25 el beneficio de la quimioterapia se observaba independientemente de los criterios clínicos con un beneficio de 6.4% en bajo riesgo y 8.7% en alto riesgo (Tabla 8)<sup>214</sup>.

En conclusión, en pacientes premenopáusicas, con diagnóstico de cáncer de mama RRHH+/HER2- sin afectación ganglionar la quimioterapia aporta un beneficio en cuanto al riesgo de recaída a distancia de entre el 6% y 8% en el grupo de RS 21-25 independientemente del riesgo clínico y de un 6.5% en el grupo de RS 16-20 cuando el tumor presente criterios de alto riesgo.

Posteriormente, cuando se analizaron los datos del estudio RxPONDER en pacientes premenopáusicas, se observó un claro beneficio del tratamiento con quimioterapia que resultó en un descenso relativo de la SLE invasiva en un 40% y un 42% de la supervivencia libre de recurrencia a distancia a 5 años. En este estudio se observó que la quimioterapia ofrecía un beneficio en todos los subgrupos tanto bajo como de riesgo intermedio (RS 0-25). La SLE invasiva a 5 años aumentó en un 5.2% con tratamiento con quimioterapia más ET en comparación con ET en monoterapia (94.2% y 89.0% respectivamente; HR 0.54, p=0.0004).

Además, también se observó un aumento significativo de la SG en las pacientes que recibieron tratamiento con quimioterapia con una SG de 98.6% y 97.3% respectivamente con HR = 0.47, p= 0.032)<sup>208</sup>.

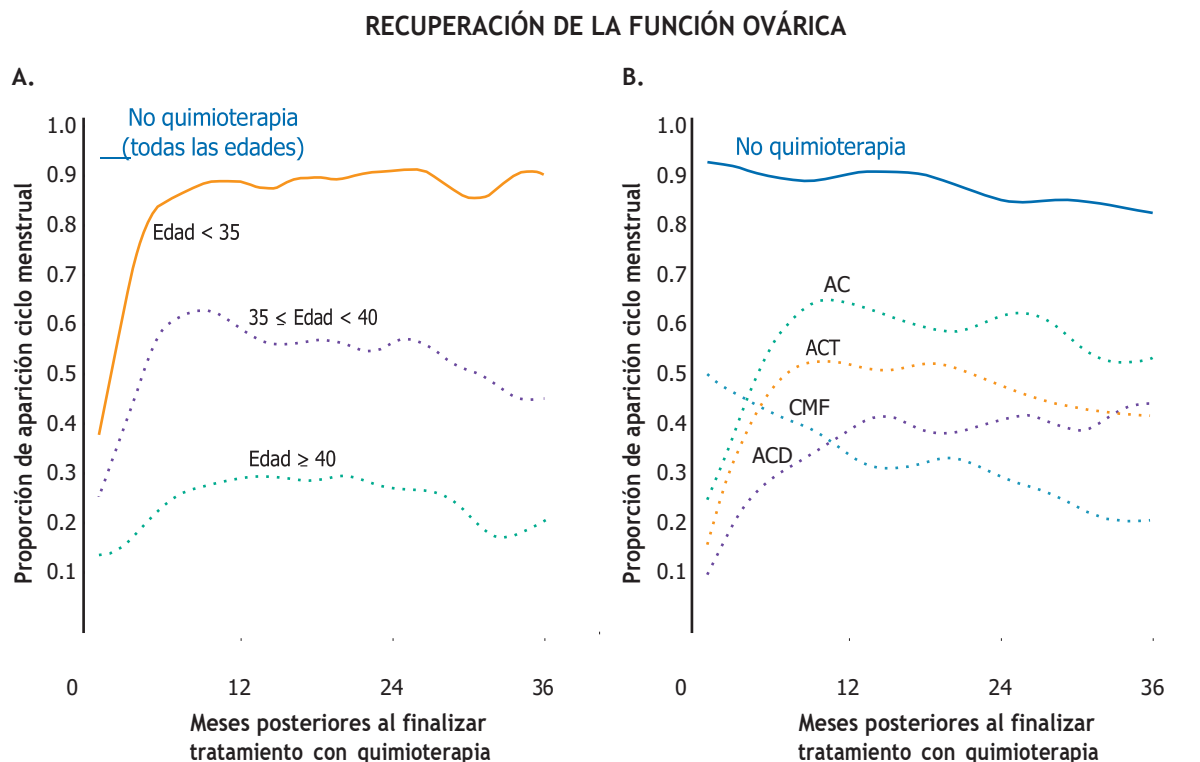
Estos resultados fueron en consonancia con los reportados en el estudio MINDACT donde se observó un beneficio del 5% al tratamiento de quimioterapia más ET en cuanto a SLM a 8 años de seguimiento en pacientes < 50 años con afectación ganglionar<sup>209</sup>.

### » 3.4.3 Implicaciones de la inhibición de la función ovárica en pacientes premenopáusicas

Para poder explicar el beneficio de la quimioterapia en pacientes premenopáusicas respecto a pacientes menopáusicas, existen dos hipótesis principales. Por un lado, las características biológicas relacionadas con el tumor y su sensibilidad al tratamiento con quimioterapia. Como se ha comentado con anterioridad, las pacientes más jóvenes presentan una mayor proporción de tumores con subtipo luminales B-like y una mayor proporción de tumores clasificados como riesgo intermedio-alto por plataforma genómica que genera que sean tumores más sensibles a tratamiento con quimioterapia<sup>224,225</sup>. Por otro, el beneficio indirecto que genera la quimioterapia actuando sobre la función ovárica<sup>227</sup>.

El efecto citotóxico que realiza la quimioterapia sobre la capacidad funcional ovárica es clásicamente conocido. La aparición de amenorrea inducida por quimioterapia se asocia a un descenso de nivel de estradiol periférico por lo que podría considerarse casi como una maniobra de supresión hormonal<sup>228</sup>. La amenorrea inducida por la quimioterapia está ampliamente influenciada por el tipo de tratamiento utilizado, el esquema de fármacos y la duración de éste<sup>229-231</sup>(Figura 21).

Otro factor importante es la edad, siendo ésta un factor predictivo de recuperación de la función ovárica. La probabilidad de amenorrea permanente aumenta con la edad: la probabilidad de recuperar la función ovárica a dos años tras finalizar el tratamiento con quimioterapia en pacientes <40 años es de un 40-50%. A partir de los 40 años este porcentaje desciende a un 10% y en pacientes premenopáusicas con edad > 50 años la probabilidad de recuperación es inferior al 5%<sup>232,233</sup> (Figura 21).



**Figura 21.** Recuperación de la función ovárica **A.** En función de la edad. **B.** En función del tipo de quimioterapia. AC = doxorubicina más ciclofosfamida; ACT= doxorubicina más ciclofosfamida más palictaxel; CMF= ciclofosfamida más metotrexate más fluorouracilo; ACD = doxorubicina más ciclofosfamida más docetaxel (Adaptado de Petrek J.A et al ; *J Clin Oncol.*,2006).

Estos datos se han visto reforzados en los grandes estudios de tratamiento hormonal adyuvante como el estudio SOFT, donde se observó un mayor beneficio de supervivencia cuando se realizaba una maniobra de SFO mediante análogos de la GnRH/LHRH asociado a ET en pacientes <35 años<sup>205</sup>. A 12 años de seguimiento en el estudio SOFT se observó que las pacientes <35 años presentaron un beneficio al añadir SFO al tratamiento de ET en SG de hasta un 16% (Tamoxifeno monoterapia: 68.7%, Tamoxifeno más SFO: 77.8% y exemestano más SFO: 85.2%), siendo este beneficio menor del 5% en pacientes >45 años (tamoxifeno en comparación con tamoxifeno o exemestano más SFO)<sup>204</sup>.

Con estos datos, a lo largo de los años, múltiples estudios han intentado valorar el impacto de la SFO generada por la quimioterapia en relación con la SLE y SG. Un estudio publicado en 2010, donde se incluyeron pacientes con cáncer de mama precoz, con afectación ganglionar a recibir tratamiento con quimioterapia adyuvante, se realizó un subanálisis en más de 2,000 pacientes premenopáusicas para valorar el impacto de la amenorrea en la supervivencia. Este estudio observó que aquellas pacientes con cáncer de mama RE+ que presentaron amenorrea posterior al tratamiento de

quimioterapia (definida como no menstruación por al menos 6 o más meses en los 24 meses de seguimiento), presentaron una mejor SLE (riesgo relativo 0.70;  $p < 0.001$ ) y SG (riesgo relativo 0.76;  $p = 0.04$ )<sup>227</sup> (Figura 22).

En un análisis posterior se observó que pacientes diagnosticadas con tumores RE+ y amenorrea asociada presentaron un pronóstico más favorable en comparación con el mismo subgrupo histológico de pacientes que no presentaron amenorrea (HR para muerte de 0.52;  $p = 0.002$ ). En cambio, no se observaron diferencias significativas en el subgrupo de pacientes con cáncer de mama RE-negativo en función de si presentaban o no amenorrea<sup>234</sup>.

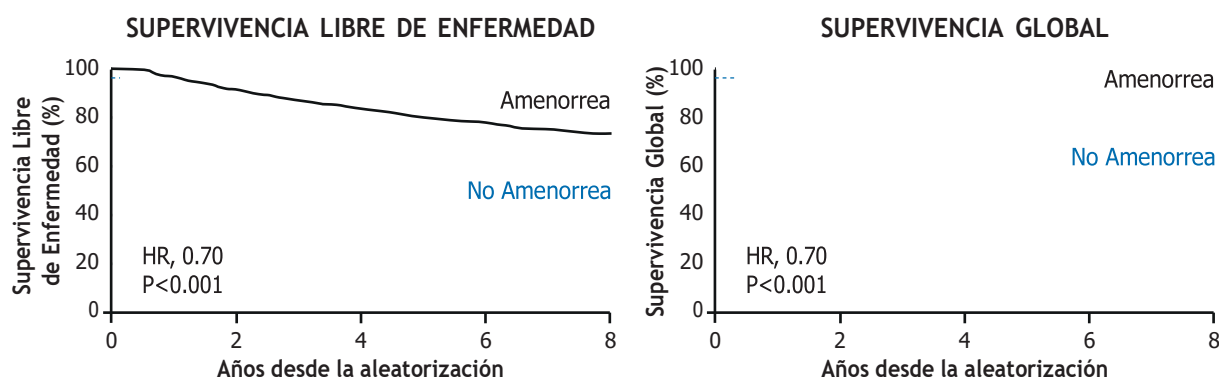


Figura 22. Supervivencia libre de enfermedad y Supervivencia global y en función de la recuperación de la función ovárica tras recibir tratamiento con quimioterapia adyuvante (Adaptado de Swain S., et al; *N Engl J Med.*,2010).

Esta hipótesis también se puede ver reflejada en los resultados del estudio RxPONDER, donde se observó que en el grupo con RS situado entre 21-25, si se analiza el grupo que no recibió quimioterapia, las pacientes más jóvenes presentaron un peor pronóstico con una SLE invasiva a 5 años de 80% en el grupo de  $\leq 50$  años y 86.9% en el grupo de  $> 50$  años. Esto podría ser explicado en parte por el déficit de pacientes que realizaron SFO en el ensayo RxPONDER, ya que solo un 16% de las pacientes realizaron tratamiento con SFO<sup>208</sup>.

Sin embargo, si el tratamiento con SFO de estas pacientes, puede llegar a substituir el tratamiento con quimioterapia en algunas ocasiones queda todavía pendiente de definir.

### » 3.4.4 Conclusiones

Hoy en día, el uso de las plataformas genómicas está contemplado en guías nacionales e internacionales con el objetivo de obtener información adicional pronóstica que va a complementar a las características clínico-patológicas y finalmente valorar el beneficio de la quimioterapia en el contexto adyuvante<sup>19,104,213</sup>. Actualmente, las recomendaciones de la ASCO aconsejan tanto el uso de MammaPrint como Oncotype Dx en pacientes con tumores RRHH+/HER2- precoz con afectación de hasta 3 ganglios, junto con otras variables clínico-patológicas para guiar decisiones sobre quimioterapia adyuvante en base a su capacidad pronóstica<sup>19</sup>.

Tanto MammaPrint como Oncotype Dx han demostrado la ausencia de beneficio de la quimioterapia en las pacientes menopáusicas que presenten riesgo bajo o riesgo intermedio determinado con la



plataforma, incluso en afectación ganglionar. Sin embargo, en las pacientes premenopáusicas, la quimioterapia sigue aportando un beneficio en relación con el tratamiento exclusivo con ET. Existen varias hipótesis para explicar este beneficio entre el cual se encuentra la función indirecta de la quimioterapia sobre la alteración de la función ovárica con el descenso del estradiol periférico.

Este dato podría tener relevancia teniendo en cuenta que muy pocas pacientes recibieron tratamiento con SFO. Únicamente un 13% en el TAILORx<sup>214</sup>, un 19% (en el grupo de pacientes que recibieron ET) en RxPONDER<sup>208</sup> y un 21% en el estudio MINDACT<sup>209</sup> fueron tratadas con SFO. Poder llegar a discernir si el aumento de beneficio observado en este grupo de pacientes podría ser alcanzado igual si en lugar de tratamiento con quimioterapia se realizara una correcta inhibición de la función ovárica es una pregunta todavía difícil de responder.

Es importante destacar que en pacientes premenopáusicas los datos que existen hoy en día son insuficientes para poder utilizar Oncotype Dx en el caso de que presente afectación de ganglios positiva o si presenta alto riesgo clínico en el caso de MammaPrint.

### 3.5 TRATAMIENTO (NEO)ADYUVANTE CON INHIBIDORES DE CDK4/6

En los últimos años, los inhibidores de CDK4/6 (iCDK4/6), palbociclib, abemaciclib y ribociclib, en combinación con ET han demostrado un aumento claro en SLP<sup>235–238</sup> así como en SG<sup>239–242</sup> en pacientes con cáncer de mama RRHH+/HER2- metastásico. El gran beneficio observado en los diferentes estudios fases III, así como el aumento en calidad de vida respecto al tratamiento con quimioterapia, ha convertido estos fármacos en una de las estrategias más utilizadas en primera línea de cáncer de mama luminal metastásico<sup>79</sup>.

Con estos datos, se han empezado a desarrollar varios estudios para valorar el potencial beneficio de los iCDK4/6 a nivel (neo)adyuvante. Existen 4 grandes estudios fases III que exploraron el potencial beneficio de los diferentes iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+ y HER2- precoz en adyuvancia: PENELOPE-B<sup>243</sup>, PALLAS<sup>244</sup> y monarchE<sup>245</sup> y el estudio NATALEE<sup>246</sup> que ha presentado los resultados recientemente (Slamon D.J., et al; Abstract LBA5000, ASCO anual meeting 2023) (247).

Todos ellos aleatorización más de 5,000 pacientes, excepto por el estudio PENELOPE-B que incluyó alrededor de 1,000 pacientes. Las principales características de los diferentes ensayos, así como los resultados del objetivo primario se encuentran resumidos en la **Tabla 9**. Todos los estudios utilizaron tratamiento con ET estándar en combinación con el iCDK4/6 correspondiente incluyendo combinaciones con análogos GnRH/LHRH (en el caso de pacientes premenopáusicas). Los resultados observados fueron contradictorios, probablemente por las diferencias que existen en los diseños de los estudios, los criterios de inclusión/exclusión y el esquema y la duración del tratamiento, además, las tasas de discontinuación también podrían haber contribuido a las diferentes respuestas observadas.

En resumen, los estudios PALLAS y PENELOPE-B, utilizaron palbociclib como iCDK4/6, el estudio monarchE utilizó abemaciclib y el estudio NATALEE ribociclib. El estudio PENELOPE-B requería que las pacientes tuvieran enfermedad residual posterior al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante mientras que el estudio monarchE incluyó pacientes con afectación ganglionar y algún otro factor

	<b>PENOLPE-B</b> (Fase III) <sup>243</sup>	<b>PALLAS</b> (Fase III) <sup>244</sup>	<b>monarchE</b> (Fase III) <sup>245</sup>	<b>NATALEE</b> (Fase III) <sup>246</sup>
<b>iCDK4/6 UTILIZADO Y ESQUEMA DE TRATAMIENTO</b>	Palbociclib 125mg/24h (3 semanas si 1 de descanso)	Palbociclib 125mg/24h (3 semanas si 1 de descanso)	Abemaciclib 150mg continuado	Ribociclib 400 mg cada/24h (3 semanas si 1 de descanso)
<b>NÚM. PACIENTES</b>	1,250	5,761	5,637	5,101
<b>TIPO DE PACIENTES</b>	Menopáusicas y premenopáusicas	Menopáusicas y premenopáusicas	Menopáusicas y premenopáusicas	Menopáusicas y premenopáusicas
<b>FASE</b>	Fase III, aleatorizado, controlado con placebo	Fase III, aleatorizado, abierto	Fase III, aleatorizado, abierto	Fase III, aleatorizado, abierto
<b>PRINCIPALES CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>	Alto riesgo: CPS- EG score $\geq 3$ o 2 con ypN+	Estadios II y III	>4 ganglios afectados o de 1-3 ganglios afectados con grado 3 o tumor >5 cm o de 1-3 ganglios afectados con Ki67 $\geq 20\%$	Estadios II y III
<b>PUNTO DE CORTE DEL Ki67</b>	No punto de corte. El 75% de los tumores tenían ki67 < 15%	No punto de corte	20% o más	No punto de corte
<b>TIEMPO DEL TRATAMIENTO CON iCDK4/6</b>	1 año	2 años	2 años	3 años
<b>OBJETIVO PRIMARIO</b>	SLE invasiva	SLE invasiva	SLE invasiva	SLE invasiva
<b>RESULTADOS</b>	SLEi a 3 años fue de 81.2% vs 77.7% p = 0.525	SLEi a 3 años de 88.2% vs 88.5% p= 0.51	SLEi a 4 años de 85.8% vs 79.4%, HR 0.66 (0.58 – 0.76), p<0.0001	SLEi a 3 años de 90.4 vs 87.1; HR 0.748 (0.618 – 0.908), p=0.0014

**Tabla 9.** Estudios adyuvantes con diferentes esquemas de tratamiento con iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2-. SLEi = intervalo supervivencia libre de enfermedad invasiva. (Adaptada de Agostinetti E., et al; *ESMO open*, 2021).

de riesgo como: tamaño >5 cm, grado histológico 3 o un Ki67  $\geq 20\%$ . En el estudio NATALEE se podían incluir pacientes sin afectación ganglionar siempre y cuando cumplieran algún criterio de alto riesgo: grado histológico 3 o grado 2 y asociar Ki67  $\geq 20\%$  o presentar criterios de alto riesgo por alguna plataforma génica. El 100% de las pacientes del estudio PENELOPE-B habían recibido quimioterapia, el 95% en el monarchE, el 88% en el estudio NATALEE y solo el 83% de las pacientes incluidas en el PALLAS.

Tanto PENELOPE-B como PALLAS fueron ensayos negativos para su objetivo primario, mientras que el estudio monarchE mostró un aumento absoluto en la tasa de SLE invasiva de aproximadamente

un 6.4% a cuatro años de seguimiento, pasando de 79.4% en el brazo control a 85.8% en el brazo de abemaciclib (HR = 0.66, 95% IC 0.58 – 0.76;  $p < 0.0001$ )<sup>245</sup>.

Basándose en los resultados del monarchE, en octubre de 2021 la FDA aprobó el tratamiento con abemaciclib más ET como tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama luminal de alto riesgo, definido como: afectación de  $\geq 4$  o más ganglios a nivel patológico o afectación de 1-3 ganglios más uno de los siguientes: tamaño  $\geq 5$  cm o grado histológico 3 o Ki67  $\geq 20\%$ (248). En marzo de 2023 la FDA retiró el criterio de Ki67 para la utilización de abemaciclib dejando los criterios de alto riesgo(249). Hoy en día la guías ASCO recomiendan el uso de abemaciclib más ET adyuvante durante 2 años en pacientes con cáncer de mama precoz RRHH+/HER2- de alto riesgo<sup>250</sup>.

Recientemente, se han comunicado los resultados del ensayo NATALEE observando un beneficio a 3 años en SLE invasiva de 90.4% en el brazo de ribociclib versus 87.1% en el brazo de placebo.

Es importante remarcar que, en todos los casos, la definición de alto riesgo ha sido realizada mediante criterios clínico-patológicos y está claro que en los últimos años la incorporación de las plataformas genómicas ha ayudado a aportar información adicional y más fiable en cuanto a la estratificación del riesgo de los tumores. Por este motivo se encuentran en marcha diferentes ensayos clínicos en estadios precoces donde también van a incluir criterios genómicos en la selección de pacientes de alto riesgo (ej. ADAPTcycle NCT04055493).

Está ya más que demostrado que los iCDK4/6 generan un importante descenso en la proliferación celular<sup>251-253</sup>. Esto es debido a que CDK4 y CDK6 están implicados en la regulación de la proliferación promoviendo la progresión de fase G1 a fase S<sup>254</sup>. Por lo que, los iCDK4/6 evitan la progresión de la célula, quedándose en fase G1<sup>255,256</sup>.

Determinar el efecto biológico de los iCDK4/6 en la célula tumoral está siendo clave para poder plantear esquemas libres de quimioterapia, incluso en tumores con alta proliferación. El descenso en el índice de proliferación Ki67 posterior a tratamiento con ET previo a cirugía, ha mostrado tener un beneficio predictivo y pronóstico<sup>257-259</sup>, por lo que ha sido uno de los objetivos principales a valorar en la combinación de iCDK4/6 a nivel neoadyuvante.

Los tres estudios fases II principales que valoraron este esquema de tratamiento fueron: el estudio NeoPalAna<sup>253</sup> y PALLET<sup>251</sup> que utilizaron combinaciones con palbociclib y el estudio neoMONARCH con abemaciclib<sup>252</sup>. Las características principales de éstos están reportadas en la **Tabla 10**. El objetivo de estos estudios fue principalmente biológico, utilizando el descenso del índice Ki67 como biomarcador de beneficio a tratamiento<sup>260</sup>, con determinación del porcentaje de tumores que alcanzaron un arresto celular completo (*Complete Cell Cycle Arrest* en inglés con las siglas CCCA), definido como determinación del Ki67  $\leq 2.7\%$  posterior al tratamiento.

En general se observó que el tratamiento con iCDK4/6 (ya fuera en monoterapia o en combinación con ET) conseguía un claro descenso en la proliferación tumoral, alcanzando unas tasas de CCCA de más del 80% en algunos estudios (**Tabla 10**). También se exploró el efecto anti-proliferativo de palbociclib a nivel de expresión génica con un descenso significativo de la firma de proliferación por

ESTUDIO	NEOPALANA (Fase II) <sup>253</sup>	PALLET (Fase II) <sup>251</sup>	NeoMONARCH (Fase II) <sup>252</sup>
iCDK4/6 UTILIZADO Y ESQUEMA DE TRATAMIENTO	Anastrozol (± goserelina) 1-4 semanas y posteriormente se añadía palbociclib 125mg/24h (3 semanas si 1 de descanso) por 4 ciclos	<u>Brazo A:</u> letrozol por 14 semanas.  <u>Brazo B:</u> letrozol por 2 semanas y posterior  <u>Brazo C:</u> palbociclib por 2 semanas y posterior letrozol hasta 14 semanas  <u>Brazo D:</u> palbociclib más letrozol por 14 semanas	Abemaciclib 150 mg/12h más anastrozol  Anastrozol en monoterapia durante 2 semanas seguido de abemaciclib más anastrozol por 14 semanas
NÚM. PACIENTES	50	307	224
FASE	Fase II, un solo brazo de tratamiento	Fase II, aleatorizado	Fase II aleatorizado
PRINCIPALES CRITERIOS DE INCLUSIÓN	Estadios II y III Premenopáusicas y menopáusicas	Estadios II y III Menopáusicas	Estadio I (≥ 1 cm) -IIIB Menopáusicas
OBJETIVO PRIMARIO	Valorar el CCCA (Ki67 ≤ 2.7%): cambio del Ki67 a C1D15 (tras dos semanas de palbociclib)	Cambio de Ki 67 a las 2 semanas y a las 14 semanas Respuesta clínica	Cambio del Ki67 a las 2 semanas
RESULTADOS	CCCA a C1D15 fue de 87%	CCCA a la semana 14: 90% versus 59%. p<0.001 en los grupos de palbociclib versus letrozol en monoterapia	CCCA 14% (anastrozol)vs 58% (abemaciclib) vs 68% (abemaciclib + anastrozol); p<0.001

Tabla 10. Estudios neoadyuvantes con diferentes esquemas de tratamiento con iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2- en comparación con ET. CCCA = arresto celular completo.

PAM50 a los 15 días de iniciar el tratamiento con palbociclib con una correlación significativa entre el porcentaje de Ki67 y la firma de proliferación<sup>253</sup>. Curiosamente tanto el Ki67 como la proliferación aumentaban una vez finalizado el tratamiento con iCDK4/6 confirmando el efecto biológico anti-proliferativo que generan estos fármacos en el tumor<sup>252</sup>.

Sin embargo, saber si la combinación puede llegar a sustituir el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante se encuentra todavía por valorar. Hasta la fecha, se han realizado dos estudios fases II que intentaron responder esta pregunta, realizando una comparación directa entre tratamiento con iCDK4/6 más ET y quimioterapia (Tabla 11).

Por un lado, el estudio NeoPAL<sup>261</sup> un estudio fase II que incluyó pacientes menopáusicas con diagnóstico de cáncer de mama precoz de alto riesgo: estadios II-III A, Luminal B o Luminal A con afectación ganglionar por criterios PAM50, a recibir tratamiento neoadyuvante con palbociclib y letrozol durante 19 semanas en comparación con quimioterapia convencional (esquema basado en antraciclinas seguido de taxanos). El objetivo primario fue determinar el porcentaje de tumores que alcanzaban una carga tumoral residual (*Residual Cancer Burden* en inglés con siglas RCB) de 0-I en el brazo de tratamiento dirigido en comparación con quimioterapia y si éste podía observarse en el 20% o más de los tumores tratados con palbociclib más letrozol. El RCB determina el porcentaje de células tumorales posterior a un tratamiento neoadyuvante. Este score incluye la determinación del área tumoral, la celularidad tumoral residual, así como el porcentaje de tumor in situ más la afectación ganglionar. Este score se expresa en una puntuación de 0-III y se ha asociado una mejor supervivencia cuanto menor es el RCB<sup>262,263</sup>.

ESTUDIO	NEOPAL (Fase II) <sup>261</sup>	CORALLEEN (Fase II) <sup>265</sup>
iCDK4/6 UTILIZADO Y ESQUEMA DE TRATAMIENTO	Palbociclib 125mg/24h (3 semanas si 1 de descanso) + letrozol por 19 semanas  FEC por 3 ciclos seguido de docetaxel por 3 ciclos	Ribociclib 400 mg cada/24h (3 semanas si 1 de descanso) + letrozol por 6 ciclos  Doxorrubicina + ciclofosfamida por 4 ciclos, seguido de 12 semanas de paclitaxel
NÚM. PACIENTES	106	106
FASE	Fase II, aleatorizado	Fase II, aleatorizado
PRINCIPALES CRITERIOS DE INCLUSIÓN	Estadios II y III, Luminal B o Luminal A con afectación ganglionar determinado por Prosigna Menopáusicas	Estadios I-III A y Luminal B por Prosigna Menopáusicas
OBJETIVO PRIMARIO	RCB 0-1 después de 19 semanas de tratamiento	% PAM50/Prosigna ROR score-bajo a la cirugía
RESULTADOS	RCB 0-1: 7.6% (Ribociclib más letrozol) vs 15.7% (quimioterapia)	PAM50/Prosigna ROR score bajo: 46.9% vs 46.1%

Tabla 11. Estudios neoadyuvantes con diferentes esquemas de tratamiento con iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2- en comparación con ET. CCCA = arresto celular completo.

El estudio mostró un porcentaje de RCB 0-I menor en el grupo de la combinación del tratamiento dirigido respecto al brazo de quimioterapia con un similar descenso en el Ki67. Si bien es cierto que datos actualizados a 40 meses de seguimiento observaron que no hubo diferencias en los dos brazos de tratamiento en cuanto a SLE invasiva<sup>264</sup>.

Finalmente, el ensayo clínico CORALLEEN<sup>265</sup>. Se trata de un ensayo prospectivo, fase II, aleatorizado donde también se incluyeron un total de 106 pacientes menopáusicas con cáncer de mama RRHH+/HER2- de alto riesgo, definido como Luminal B por Prosigna, estadios I-III A. Las pacientes se aleatorizaron a recibir tratamiento con ribociclib más letrozol o tratamiento con quimioterapia convencional (esquema basado en antraciclinas más taxanos) durante 24 semanas (**Tabla 11 y Figura 24**). El objetivo primario de este estudio fue también biológico. En este caso la determinación del porcentaje de pacientes que alcanzaban un score ROR de bajo riesgo determinado por la plataforma Prosigna.

El test PAM50, denominado Test Prosigna en su forma comercial, es un test que utiliza un algoritmo con la combinación de datos genómicos basados en el subtipo intrínseco del tumor (el conjunto de los 50 genes anteriormente descritos) y cierta información clínica que incluye: el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la proliferación. Este algoritmo, además de proporcionar el subtipo intrínseco, indica también un índice ROR (*Risk of Recurrence*) score, un valor que va de 0 a 100, y permite asignar una categoría de riesgo: riesgo bajo, riesgo intermedio o riesgo alto, que se correlaciona con la probabilidad de riesgo de recaída a distancia en los próximos 10 años. Este score integra la biología y la carga tumoral en una única herramienta validada y asociada de forma independiente del tratamiento recibido a pronóstico a largo plazo<sup>266</sup>.

El estudio observó que existía un porcentaje similar de tumores que alcanzaban un ROR-bajo en el brazo de quimioterapia como en el brazo de tratamiento con ribociclib más letrozol (**Figura 24**).

Con todos los datos observados y los resultados obtenidos en los diferentes estudios que realizaron tratamiento neoadyuvante con iCDK4/6 en monoterapia o en combinación con ET, se ha podido observar que los iCDK4/6 generan un efecto biológico en el tumor, como un descenso en la proliferación celular (ya sea con la determinación del Ki67 por IHQ o por expresión de diferentes genes individuales como el propio *MIK167* o con la expresión de firma de proliferación por Prosigna) mayor en comparación con tratamiento hormonal y, lo más interesante, similar al tratamiento con quimioterapia en pacientes de alto riesgo.

Hoy en día, esta terapia se encuentra todavía en fase de ensayo clínico no siendo una terapia estándar en la práctica clínica habitual.

### » 3.5.1 Ensayo clínico CORALLEEN

Se trata de un estudio fase II, donde se incluyeron pacientes menopáusicas con cáncer de mama RRHH+/HER2- estadios I-III, Luminal B por Prosigna. En este estudio se planteó explorar si pacientes menopáusicas con criterios de alto riesgo (ya que todas ellas presetaban un tumor con subtipo intrínseco Luminal B), podían realizar una desescalada de tratamiento mediante la combinación de iCDK4/6 asociado a ET en lugar de poliquimioterapia (el tratamiento estándar). Para ello todas las pacientes incluidas se aleatorizaron a recibir tratamiento mediante poliquimioterapia estándar (antraciclinas más ciclofosfamida por 4 ciclos seguido de paclitaxel semanal por 12 semanas) o el tratamiento a estudio con ribociclib 600 mg/24gh (3 semanas si y 1 semanas de descanso) más letrozol 2,5 mg/24h continuado durante 24 semanas (**Figura 23**).

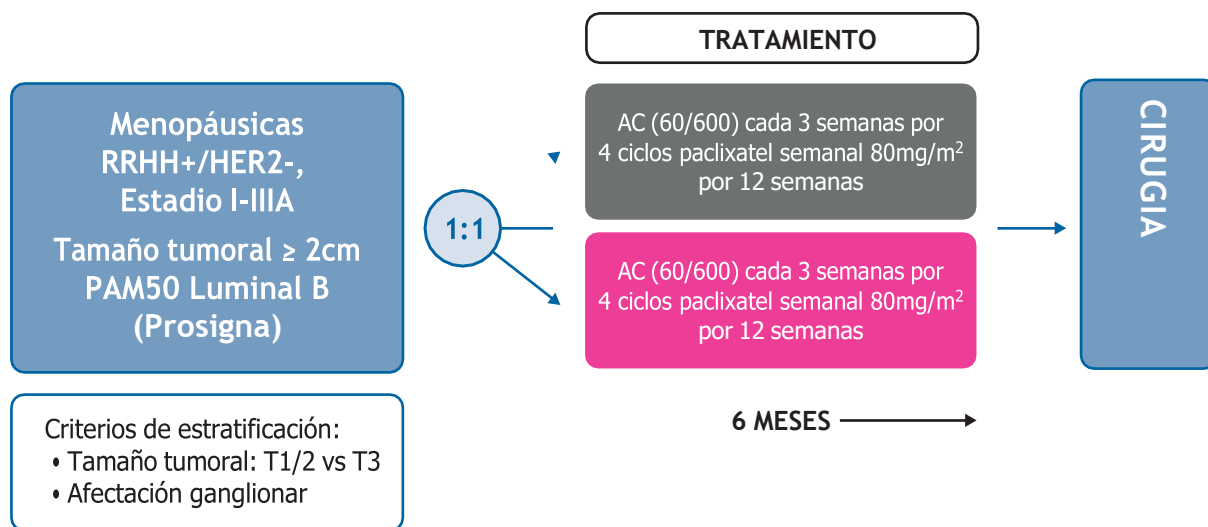


Figura 23. Diseño del estudio fase II CORALEEN (NCT03248427).

El objetivo primario del estudio fue evaluar el porcentaje de pacientes que alcanzaron un ROR score (por Prosigna) de bajo riesgo en la muestra quirúrgica posterior a recibir 24 semanas de tratamiento (ya fuera con ribociclib más letrozol o quimioterapia).

Los resultados del estudio observaron que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos brazos de tratamiento, observando que un 46.9% y un 46.1% de pacientes en el brazo de ribociclib más letrozol y de poliquimioterapia estándar respectivamente alcanzaron un ROR score de bajo riesgo a la cirugía (Figura 24).

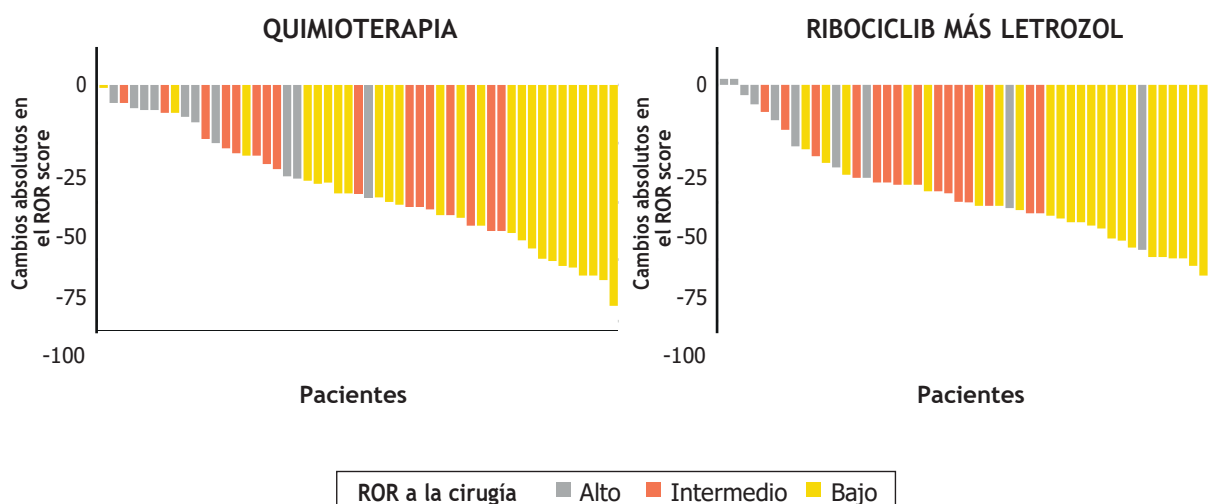


Figura 24. Resultados del objetivo primario del ensayo clínico CORALLEEN(NCT03248427), mediante el descenso de ROR por Prosigna en los dos brazos de tratamiento (Adaptado de Gavilà JM., et al; SABCS oral presentation, 2019).

Es importante destacar que, dado que todas las pacientes incluidas en el estudio eran Luminales B por Prosigna, la gran mayoría presentaban un ROR score de alto riesgo al inicio del tratamiento. Concretamente un 85% en el brazo de ribociclib más letrozol y un 89% en el brazo de poliquimioterapia eran tumores clasificados con un ROR de alto riesgo y un 15% y un 11% fueron clasificados como riesgo intermedio. Además, también se observó un cambio en el subtipo intrínseco a uno menos

agresivo, con un 87.8% y en el 82.7% de tumores Luminal A a la cirugía en el brazo de terapia dirigida más letrozol y quimioterapia, respectivamente.

En conclusión, el estudio CORALLEEN sugiere que es posible realizar una terapia sin quimioterapia en pacientes menopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama Luminal B de alto riesgo por subtipo intrínseco y abre la puerta a realizar estudios para poder testar en un futuro esta hipótesis. Para ello, una correcta identificación de biomarcadores es necesaria para poder seleccionar que pacientes se van a beneficiar de esta terapia de desescalada, ya que hoy en día es incierta.



## 4. NECESIDAD DE IDENTIFICAR BIOMARCADORES DE DESESCALADA PARA UNA ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN

---

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado en mujeres en el mundo. En concreto, en España, se estima que en 2023 se diagnosticaran aproximadamente 35,000 nuevos casos, siendo la principal causa de mortalidad en mujeres en 2021 con un total de 6,528 muertes<sup>1</sup>.

En las últimas décadas se ha observado un aumento considerable en la supervivencia del cáncer de mama gracias a grandes avances en el diagnóstico, el desarrollo de nuevos fármacos y en el aumento de conocimiento del cáncer de mama a un nivel molecular. Todo ello ha permitido establecer que el cáncer de mama no es una única enfermedad, sino un complejo grupo heterogéneo compuesto por diferentes subtipos con sus propias características clínicas y biológicas y que, en consecuencia, presentaran diferente sensibilidad a los tratamientos y diferente pronóstico<sup>267</sup>.

El desarrollo de métodos para poder identificar y clasificar el riesgo individual de cada paciente ha sido una de las preguntas clave en la última década. Tradicionalmente, se han utilizado los diferentes marcadores clínico-patológicos para estratificar el pronóstico y guiar el tratamiento de las pacientes, entre ellos destacan: el estadio tumoral (tamaño tumoral y afectación ganglionar), grado histológico, expresión de RRHH, la determinación de HER2 y la determinación del marcador Ki67<sup>268,269</sup>. Sin embargo, gracias al estudio del microambiente tumoral, así como al avance en el conocimiento a nivel molecular y firmas genómicas, se han conseguido desarrollar diferentes paneles de genes que han permitido una mejor estratificación de riesgo de las pacientes. En consecuencia, el tratamiento de cáncer de mama ha sufrido enormes cambios consiguiendo un abordaje multidisciplinar cada vez más personalizado<sup>208,209,270</sup>.

En el cáncer mama HER2+ se ha identificado grupo de tumores con un pronóstico excelente, con una supervivencia mayor del 90% a 10 años de seguimiento únicamente con 12 semanas de tratamiento con paclitaxel y trastuzumab (Estadios I)<sup>122</sup>. Así como un pequeño grupo de tumores, entre un 20-30% de ellos, especialmente sensibles a terapia anti-HER2 que podrían estar curados sin necesidad de quimioterapia, únicamente con terapia dirigida anti-HER2<sup>25,100,136,137,271</sup>.

A pesar de los múltiples avances realizados en cuanto a la búsqueda de factores pronósticos y predictivos, todavía existen muchas pacientes que recibirán tratamiento de poliquimioterapia sin tener muy claro el beneficio que ésta puede llegar a aportar. Un ejemplo son las pacientes premenopáusicas, consideradas de alto riesgo debido a una biología tumoral más agresiva y la frecuencia de encontrar mutaciones germinales, por lo que en la mayoría de los casos la poliquimioterapia será la opción principal con las consecuencias que esto conlleva<sup>117</sup>, aunque no siempre aporte beneficio.

Por lo tanto, es necesario entender la biología tumoral para perfeccionar el proceso de toma de decisiones e identificar a las pacientes jóvenes que podrían ahorrarse el tratamiento de quimioterapia adyuvante de forma segura. De la misma forma, todavía no se ha conseguido identificar que pacientes podrían no estar beneficiándose del tratamiento con quimioterapia en el cáncer de mama HER2+.

Por este motivo, el esfuerzo de seguir identificando nuevos biomarcadores que permitan clasificar y seleccionar que pacientes van a presentar un beneficio al tratamiento sistémico con poliquimioterapia es crucial. Por lo que en este trabajo se propone identificar una serie de potenciales biomarcadores a raíz de una mejor comprensión biológica tumoral que podrá ayudar a identificar pacientes con un buen pronóstico y que por tanto podrían beneficiarse de una desescalada, o directamente la no necesidad de quimioterapia en diferentes grupos de alto riesgo: identificar ese grupo de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ que presentaran una gran afinidad a terapia anti-HER2 sin necesidad de quimioterapia, pacientes premenopáusicas donde el bloqueo hormonal per se, podría ser igual de beneficioso que el tratamiento de quimioterapia o explorar la biología tumoral de pacientes menopáusicas Luminal B tratadas mediante terapia dirigida (iCDK4/6 más ET) neoadyuvante.



## **II. HIPÓTESIS**



# HIPÓTESIS

---

En el cáncer de mama precoz, una reducción en el uso de la quimioterapia (neo)adyuvante, o incluso su completa eliminación, es posible para ciertos subgrupos de pacientes gracias a nuevos biomarcadores y a nuevas estrategias terapéuticas. Para esta tesis se han planteado 3 hipótesis específicas:

1. En pacientes con cáncer de mama precoz HER2-positivo, la combinación de la celularidad tumoral y los linfocitos infiltrantes de tumor (llamado CelTIL) tras terapia corta basada en fármacos anti-HER2 sin quimioterapia aporta información pronóstica.
2. En mujeres premenopáusicas con cáncer de mama RRHH-positivo/HER2-negativo, la actividad total o parcial de la quimioterapia se explica por un efecto anti-estrogénico indirecto mediante la supresión de la función ovárica.
3. En pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama RRHH-positivo/HER2-negativo de alto riesgo, el estudio biológico de los tumores antes, durante y tras el tratamiento neoadyuvante con ribociclib en combinación con tratamiento endocrino podrá permitir identificar pacientes que no necesiten quimioterapia adyuvante.



## **III. OBJETIVOS**





## OBJETIVO GENERAL

---

Realizar una caracterización molecular mediante expresión génica, así como la determinación de linfocitos infiltrantes de tumor en diferentes cohortes de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz RRHH-positivo y/o HER2-positivo previo y posterior al tratamiento para identificar biomarcadores que puedan ayudar a la desescalada de tratamiento (neo)adyuvante.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

---

1. Determinar los linfocitos infiltrantes de tumor y la celularidad tumoral (así como cálculo del CelTIL score) en muestras de pacientes con cáncer de mama precoz HER2- positivo tratadas con doble bloqueo HER2 incluidas en el ensayo clínico NeoALTTO a día 0 y a día 14 ( $2\pm$ ) del tratamiento.
2. Validar la capacidad del CelTIL score, medido en el día 14 ( $22\pm$ ), de predecir respuesta patológica completa (pCR) en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo tratadas en el estudio NeoALTTO.
3. Determinar la capacidad pronóstica del CelTIL score en el estudio NeoALTTO.
4. Identificar cambios de expresión génica asociados al efecto del tratamiento endocrino en pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama Luminal B (por PAM50/Prosigna que participaron en el ensayo clínico CORALLEEN).
5. Validar la firma endocrina de expresión génica observada en el estudio CORALLEEN en líneas celulares de cáncer de mama RRHH-positivo/HER2-negativo.
6. Validar la firma endocrina de expresión génica observada en el estudio CORALLEEN en diferentes ensayos clínicos en pacientes menopáusicas tratadas con hormonoterapia.
7. Validar la firma endocrina de expresión génica en otras cohortes de pacientes premenopáusicas tratadas con quimioterapia.
8. Identificar alteraciones genómicas y/o vías de señalización asociadas con la resistencia al tratamiento después de letrozol más ribociclib o quimioterapia en pacientes con cáncer de mama Luminal B que participaron en el ensayo clínico CORALLEEN.
9. Definir las características genómicas, con especial atención al sistema inmunológico, en enfermedad residual en pacientes tratadas con ribociclib y tratamiento endocrino, versus quimioterapia.
10. Determinar los linfocitos infiltrantes de tumor en la enfermedad residual en muestras de cáncer de mama tratadas con ribociclib y tratamiento endocrino, en comparación con quimioterapia, y su relación con la respuesta anti-proliferativa en las células tumorales.



## **IV. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS**



## PRIMER ARTÍCULO

---

### **Tumor cellularity and infiltrating lymphocytes as a survival surrogate in HER2-positive breast cancer**

Núria Chic, Stephen J Luen, Polo Nuciforo, Roberto Salgado, Degbora Fumagalli, Florentine Hilbers, Yingbo Wang, Evandro de Azambuja, Itsván Láng, Serena Di Cosimo, Cristina Saura, Jens Houbler, Aleix Prat and Sherene Loi.





*Journal of the National Cancer Institute, Volume 114, Issue 3, March 2022, Pages 467–470*

Factor de impacte JCR 2022: 11.816 (Q1)

## RESUMEN DEL PRIMER ARTICULO

En los últimos años, el cáncer de mama HER2-positivo (HER2+) ha experimentado significativos avances en términos de supervivencia y calidad de vida. Gracias al desarrollo de nuevos fármacos y la combinación de diversas terapias, muchas pacientes han obtenido beneficios al incorporar tratamientos dirigidos anti-HER2 a poliquimioterapia. No obstante, se estima que entre un 20-30% de estos tumores presentan un pronóstico excelente únicamente con terapia dirigida anti-HER2. Para identificar que tumores no obtendrán un beneficio adicional al tratamiento con quimioterapia resulta imprescindible investigar biomarcadores específicos. El CelTIL score es un nuevo biomarcador que combina la determinación de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y la celularidad tumoral a día 14 ( $\pm 2$ ) en las muestras tumorales después de realizar terapia mediante doble bloqueo HER2 sin quimioterapia. El CelTIL score fue previamente identificando en el trabajo publicado en 2018 por Nuciforo P., y colaboradores, donde se valoró su papel predictivo de respuesta a terapia anti-HER2 exclusiva. En el actual trabajo se ha evaluado el papel pronóstico del CelTIL score en muestras de pacientes incluidas en el ensayo clínico fase III NeoALTTO. Este ensayo aleatorizó pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ en estadio precoz a recibir tratamiento neoadyuvante mediante terapia anti-HER2 con la posterior adición de quimioterapia. Se realizó la determinación del CelTIL score en la muestra obtenida posterior a la terapia anti-HER2 exclusiva en un total de 196 pacientes. Utilizando el cutoff del CelTIL score preestablecido, se observó que los tumores que presentaron un CelTIL score alto tenían una mejor supervivencia libre de eventos y una mejor supervivencia global a 5 años en comparación con el CelTIL score bajo 76.4% (95% IC 68.0% - 85.0%) versus 59.7% (95% IC 50.0% - 72.0%) HR 0.40 (95% IC 0.17 - 0.94;  $p=0.04$ ) y 86.4% (95% IC 80.0% - 94.0%) versus 73.5% (95% IC 64% - 84%) HR 0.43 (95% IC 0.20 - 0.92;  $p=0.03$ ). La significancia estadística se conservó después de ajustar por determinación de TILs basales, estado de receptores hormonales, tamaño tumoral y afectación ganglionar previa al tratamiento, tipo de cirugía realizada, tratamiento realizado y respuesta patológica completa (pCR). Además, se corroboró la capacidad predictiva del score, observando que las muestras tumorales situadas por encima del cutoff presentaban una mayor probabilidad de alcanzar una pCR con 37% y 18% de pCR en el grupo de alto y bajo CelTIL score respectivamente (Odds ratio 2.21, 95 IC 1.09 - 4.62;  $p=0.03$ ). Saber si finalmente el CelTIL score podrá llegar a ser implementado en la práctica clínica para ayudar a la desescalada de tratamiento deberá ser confirmado por más estudios.

# Tumor Cellularity and Infiltrating Lymphocytes as a Survival Surrogate in HER2-Positive Breast Cancer

Nuria Chic, MD,<sup>1,2,3,†</sup> Stephen J. Luen, MBChB,<sup>4,†</sup> Paolo Nuciforo , MD,<sup>5</sup> Roberto Salgado, MD,<sup>6,7</sup> Debora Fumagalli, MD,<sup>8</sup> Florentine Hilbers, MD,<sup>8</sup> Yingbo Wang, PhD,<sup>9</sup> Evandro de Azambuja , MD,<sup>10,11</sup> István Láng, MD,<sup>12</sup> Serena Di Cosimo, MD,<sup>3,13</sup> Cristina Saura, MD,<sup>3,14</sup> Jens Huober, MD,<sup>15</sup> Aleix Prat , MD,<sup>1,2,3,16,17,\*</sup> Sherene Loi , MD<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>3</sup>SOLTI Breast Cancer Research Group, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Sir Peter MacCallum Department of Oncology, University of Melbourne, Melbourne, Australia; <sup>5</sup>Molecular Oncology Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Division of Research, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia; <sup>7</sup>Department of Pathology, GZA-ZNA Hospitals, Antwerp, Belgium; <sup>8</sup>Breast International Group, Brussels, Belgium; <sup>9</sup>Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland; <sup>10</sup>Universite Libre de Bruxelles (U.L.B.), Brussels, Belgium; <sup>11</sup>Department of Medical Oncology, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium; <sup>12</sup>Istenhegyi Géndiagnosztika Private Health Center Oncology Clinic, Budapest, Hungary; <sup>13</sup>Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; <sup>14</sup>Department of Medical Oncology, Vall d'Hebron University Hospital and Breast Cancer Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain; <sup>15</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Ulm, Ulm, Germany; <sup>16</sup>Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain and <sup>17</sup>Institute of Oncology (IOB)-Quiron, Barcelona, Spain

<sup>†</sup>Authors contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Aleix Prat, MD, PhD, Hospital Clínic of Barcelona, Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, IDIBAPS, Villarroel 170, 08035, Barcelona, Spain (e-mail: alprat@clinic.cat) and Sherene Loi, MD, PhD, Sir Peter MacCallum Department of Oncology, University of Melbourne, 305 Grattan St, Melbourne, VIC 3000, Australia (e-mail: sherene.loi@petermac.org).

## Abstract

In early-stage HER2-positive breast cancer, biomarkers that guide deescalation and/or escalation of systemic therapy are needed. CelTIL score is a novel, combined biomarker based on stromal tumor-infiltrating lymphocytes and tumor cellularity and is determined in tumor biopsies at week 2 of anti-HER2 therapy only. We evaluated the prognostic value of CelTIL in 196 patients with early-stage HER2-positive disease treated with standard trastuzumab-based chemotherapy in the NeoALTT0 phase III trial. Using a prespecified CelTIL cutoff, a better 5-year event-free survival and overall survival was observed between CelTIL-high and CelTIL-low score with a 76.4% (95% confidence interval [CI] ¼ 68.0% to 85.0%) vs 59.7% (95% CI ¼ 50.0% to 72.0%) (hazard ratio ¼ 0.40, 95% CI ¼ 0.17 to 0.94) and 86.4% (95% CI ¼ 80.0% to 94.0%) vs 73.5% (95% CI ¼ 64.0% to 84.0%) (hazard ratio ¼ 0.43, 95% CI ¼ 0.20 to 0.92), respectively. Statistical significance was maintained after adjusting for baseline tumor-infiltrating lymphocytes, hormone receptor status, pretreatment tumor size and nodal status, type of surgery, treatment arm, and pathological complete response. Further studies to support CelTIL as an early readout biomarker to help deescalate or escalate systemic therapy in HER2-positive breast cancer seem warranted.

Use of (neo)adjuvant chemotherapy with at least 1 anti-HER2 agent is recommended for most patients with early-stage HER2-positive breast cancer (1). Several studies have explored strategies to improve HER2 blockade, such as adding 1 year of adjuvant pertuzumab (2), 1 year of neratinib after trastuzumab (3), or trastuzumab-emtansine (T-DM1) in patients who do not achieve a pathological complete response (pCR) (4). Despite such success, most patients are cured with chemotherapy and trastuzumab. Biomarkers to identify patients not requiring these anti-HER2 therapies are needed.

Various biomarkers determined on diagnosis have been explored for their predictive and/or prognostic value in early-stage HER2-positive disease, including T (tumor size) N (nodes) M (metastases) staging, hormone receptor status (5), stromal tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) (6,7), PAM50 subtypes (8,9), loss of PTEN (10), *PIK3CA* mutations (11), and p95HER2 expression (12). However, their clinical utility remains unknown, and further validation is needed. Biological information obtained after neoadjuvant therapy is gaining attention, because it measures individual response to specific therapies and



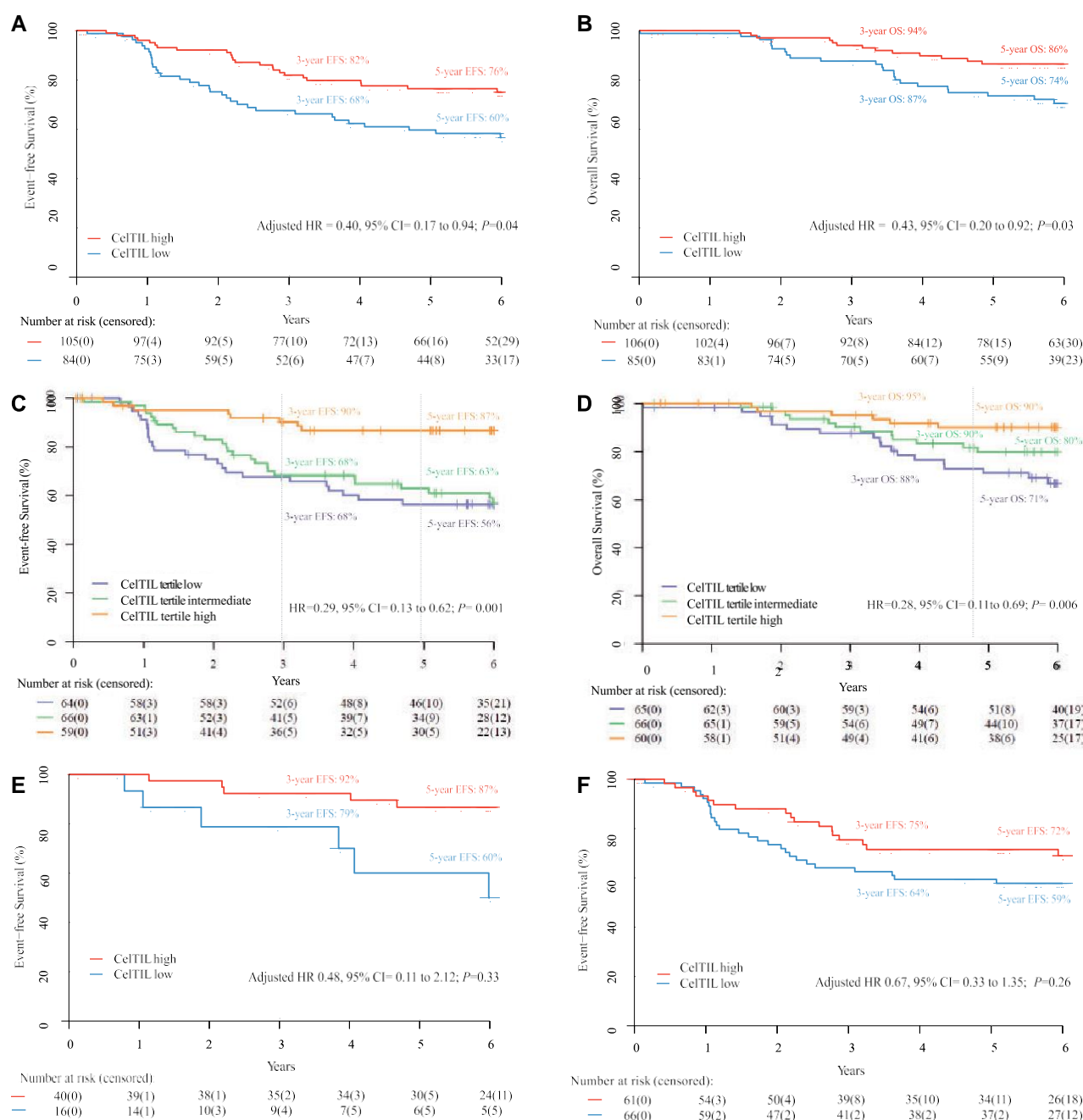


Figure 1. Survival outcomes in NeoALTTO based on CelTIL score. A) Event-free survival (EFS) based on the CelTIL prespecified cutoff score. B) Overall survival (OS). C) EFS based on CelTIL tertile groups. D) OS based on CelTIL tertile groups. E) EFS in patients with a pathological complete response (pCR). F) EFS in patients with a non-pCR. Estimates of EFS and OS were from Kaplan-Meier curves and tests of differences by Cox proportional hazards model. All statistical tests were 2 sided. CelTIL %score based on tumor cellularity and tumor infiltrating lymphocytes at day 14; CI % confidence interval; HR % hazard ratio.

can inform treatment strategies (4). Promising biomarkers being evaluated in residual tumors are PAM50 subtypes (13), TILs (14), and HER2 expression (15). One caveat is the 4- to 6-month wait until completion of neoadjuvant therapy.

We have shown the value of defining predictive and prognostic biomarkers after some weeks of anti-HER2 therapy (16). We developed the CelTIL score, a combined biomarker based on both TILs and tumor cellularity determined by a tumor biopsy after 14 days (6–2 days) of anti-HER2 therapy only in early-stage HER2-positive breast cancer (16). The CelTIL score was determined in

the PAMELA (17) and LPT109096 (18) neoadjuvant trials as an early readout of the probability of a pCR at surgery beyond baseline TILs, PAM50 subtypes, and main clinical-pathological characteristics. High CelTIL scores identify tumors that are highly immune infiltrated with reduced tumor cellularity (16).

The value of CelTIL as a biomarker for long-term survival is unknown. Here, we determined the CelTIL score after 2 weeks of anti-HER2 therapy in tumor samples from the neoadjuvant NeoALTTO phase III trial (19) that randomly assigned 455 patients to receive lapatinib, trastuzumab, or

Table 1. Association of CelTIL score with event-free survival and overall survival in NeoALTTO

Variable and type of analysis	Event-free survival		Overall survival	
	HR (95% CI)	<i>P</i> <sup>a</sup>	HR (95% CI)	<i>P</i> <sup>a</sup>
CelTIL high vs low				
Univariate	0.51 (0.30 to 0.85)	.01	0.43 (0.22 to 0.84)	.01
Multivariable	0.40 (0.17 to 0.94)	.04	0.43 (0.20 to 0.92)	.03
CelTIL as a continuous variable				
Univariate	0.83 (0.73 to 0.95)	.006	0.85 (0.72 to 1.01)	.06
Multivariable	0.78 (0.62 to 1.00)	.05	0.85 (0.71 to 1.03)	.09

<sup>a</sup>All statistical tests were 2-sided. CelTIL ¼ score based on tumor cellularity and tumor infiltrating lymphocytes at day 14; CI ¼ confidence interval; HR ¼ hazard ratio.

trastuzumab-lapatinib for 6 weeks followed by the addition of weekly paclitaxel for 12 weeks and adjuvant fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide. The lapatinib arm was excluded because of noninclusion of trastuzumab. The trial was approved by the ethics committee and relevant health authorities at each participating institution. All participating patients gave the written informed consent before the study entry.

TILs and tumor cellularity were centrally determined from formalin-fixed paraffin-embedded hematoxylin and eosin staining of tumor tissues obtained at day 14 (62 days) of the assigned anti-HER2 therapy. The CelTIL score was centrally evaluated as a continuous variable using a reported formula (CelTIL unscaled score ¼ 0.8 ¼ tumor cellularity [%] þ 1.3 ¼ TILs [%]; the score was scaled to reflect a 0-100 range) (16). The primary objective was to evaluate the association of CelTIL (using the predefined 33.59 scaled cutoff score identified in the PAMELA trial) (17) and event-free survival (EFS), defined as the time from randomization to first event (breast cancer relapse after surgery, second primary cancer, or death without recurrence). Secondary objectives were to evaluate the association of CelTIL and overall survival (OS) and pCR defined as ypT0/is ypN0 and assess the prognostic effect of CelTIL per pCR status. For associations with EFS and OS, multivariable Cox proportional hazards regression models using a landmark analysis (from 30-week post randomization) were performed, adjusting for baseline TILs, hormone receptor status, pretreatment tumor size and nodal status, planned type of surgery, pCR status, and assigned treatment arm. The proportionality assumption was tested through evaluation of Schoenfeld residuals. Univariate and multivariable Cox proportional regressions models were used to investigate the association of CelTIL with pCR, and odds ratios and 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Baseline TILs were analyzed as a continuous variable (per 10% increase) for association with EFS and OS and as low vs high for associations with pCR (¼5% vs >5%). In all Cox model analyses, the statistical significance level was a 2-sided alpha of .05.

A total 196 of 303 (64.7%) tumor samples were evaluated for CelTIL (108 from the trastuzumab arm and 88 from the trastuzumab-lapatinib arm). Patients' clinical-pathological characteristics were comparable with the original population in NeoALTTO (Supplementary Table 1, available online). Median age at diagnosis was 49 years, 59.7% of patients had T2 tumors, and 84.7% had clinical N0/N1. Per prespecified CelTIL cutoff, 45.4% of patients had CelTIL-low and 54.6% had CelTIL-high.

The CelTIL score was independently associated with EFS, OS, and pCR. Five-year EFS was 76.4% (95% CI ¼ 68.0% to 85.0%) and 59.7% (95% CI ¼ 50.0% to 72.0%) in patients with CelTIL-high and CelTIL-low, respectively (adjusted hazard ratio [HR] ¼ 0.40, 95% CI ¼ 0.17 to 0.94, *P*¼.04). Five-year OS rate was 86.4% (95% CI ¼ 80.0% to 94.0%) and 73.5% (95% CI ¼ 64.0% to 84.0%) in patients

with CelTIL-high and CelTIL-low, respectively (adjusted HR ¼ 0.43, 95% CI ¼ 0.20 to 0.92, *P*¼ .03). When CelTIL was evaluated by tertiles, the upper tertile showed better EFS and OS (EFS univariate HR ¼ 0.29, 95% CI ¼ 0.13 to 0.62, *P*¼ .001; OS univariate HR ¼ 0.28, 95% CI ¼ 0.11 to 0.69, *P*¼ .006). Patients with CelTIL-high disease had a higher pCR rate vs CelTIL-low group (37% vs 18%, adjusted odds ratio ¼ 2.21, 95% CI ¼ 1.09 to 4.62, *P*¼ .03) (Figure 1). All univariate and multivariable survival analyses are shown in Table 1 (Supplementary Table 2, available online). To note, only TILs determined at week 2 (as a continuous variable) were statistically associated with better EFS (Supplementary Table 3, available online).

This is the first report, to our knowledge, to show an independent association between an early, optimal on-treatment measurement of TILs and tumor cellularity and long-term survival outcome in early-stage HER2-positive breast cancer treated with anti-HER2-based therapy. The ability of CelTIL to predict survival benefit to specific drugs is currently unknown. However, with further validation, CelTIL could be used with other clinical-pathological variables as an early survival readout and to select patients in prospective clinical trials for escalation or deescalation of adjuvant regimens. For example, patients achieving pCR and being CelTIL-low may require additional adjuvant anti-HER2 treatments because of their poor prognosis. Additionally, CelTIL could help to identify patients who may do well with standard therapy and thereby not be candidates for adjuvant clinical trials. Determining the CelTIL score has the limitation that an additional biopsy at day 15 should be conducted, which is an invasive procedure. Moreover, the score was initially established for early HER2-positive breast cancer treated with a chemo-free regimen, and its value in other contexts, such as upfront anti-HER2-based chemotherapy, remains unknown. Our data suggest that CelTIL seemed to provide prognostic stratification in patients who did and did not achieve pCR, although this finding is underpowered and did not reach statistical significance (Supplementary Figure 1, available online); further data will be required for confirmation. The limited sample size is a limitation to determine the prognostic effect of 2 or more variables. Finally, CelTIL could be used in window-of-opportunity or preoperative trials to compare biological activity of anti-HER2 drugs and estimate potential survival advantages among strategies. More validations are warranted to draw robust conclusions.

## Funding

This work was supported by PhD4MD grant of "Department de Salut" exp SLT008/18/00122 (to NC) and the Breast Cancer Research Foundation (BCRF, grant No. 17-194 grant to RS).

## Notes

**Role of the funder:** The founders had no role in the design of the study; the collection, analysis and interpretation of the data; the writing of the manuscript; and the decision to submit the manuscript to publication.

**Disclosures:** Aleix Prat has declared personal honoraria from Pfizer, Novartis, Roche, MSD Oncology, Lilly and Daiichi Sankyo, travel, accommodations and expenses paid by Daiichi Sankyo, research funding from Roche and Novartis, consulting/advisory role for NanoString Technologies, Amgen, Roche, Novartis, Pfizer and Bristol-Myers Squibb and patent PCT/EP2016/080056: HER2 AS A PREDICTOR OF RESPONSE TO DUAL HER2 BLOCKADE IN THE ABSENCE OF CYTOTOXIC THERAPY. Evandro de Azambuja has declared honoraria and/or advisory board from Roche/GNE, Novartis, Seattle Genetics and Zodiac; travel grants from Roche/GNE and GSK/Novartis; research grants to his institution from Roche/GNE, AstraZeneca, GSK/Novartis and Servier. Florentine Hilbers declared that her institution received funding from GSK and later Novartis for the conduct of the NeoALTTO trial. Serena Di Cosimo declared honoraria and/or advisory board from Pierre-Fabre and Novartis. Paolo Nuciforo declared that his institution received funding from GSK and later Novartis for the conduct of the NeoALTTO trial. Debora Fumagalli declared that her institution received funding from GSK and later Novartis for the conduct of the NeoALTTO trial. Sherene Loi has declared non-remunerated consultant and research funding to institution of Bristol-Meyers Squibb, Roche Genentech, Puma Biotechnology, Pfizer, Seattle Genetics, Novartis, Merck and AstraZeneca, consulting fees to institution of Aduro Biotech and G1 Therapeutics. Cristina Saura has declared personal fees as consultant and advisory board of Celgene, Daiichi Sankyo, Genomic health, Novartis, Pierre Fabre, synthon biopharmaceuticals, Merck, Odonate therapeutics, Philips Healthwork, PRIME oncology and Sanofi Aventis. The other authors have nothing to declare travel grants.

**Author contributions:** Study design: N.C., S.L., A.P. and Sh.L. Acquisition of the data: S.L., P.N., R.S., D.F., F.H., Y.W., E.A., I.L., S.C., C.S., J.H., A.P. and Sh.L. Data analysis: S.L. and Sh.L. Interpretation of the data: N.C., S.L., A.P. and Sh.L. Writing of the manuscript: N.C., S.L., A.P. and Sh.L. Review of the manuscript: all authors.

**Acknowledgments:** We thank the patients and their families for participating in the study.

## Data Availability

The data underlying this article cannot be shared publicly due to the confidentiality of the patients that were included in the clinical trial. The data will be shared on reasonable request to the corresponding authors.

## References

1. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, et al; Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1541–1557.
2. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, et al; APHINITY Steering Committee and Investigators. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(2):122–131.
3. Martin M, Holmes FA, Ejlersen B, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(12):1688–1700.
4. von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2019;380(7): 617–628.
5. Brandão M, Caparica R, Malorni L, et al. What is the real impact of estrogen receptor status on the prognosis and treatment of HER2-positive early breast cancer? *Clin Cancer Res.* 2020;26(12):2783–2788.
6. Salgado R, Denkert C, Campbell 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: a secondary analysis of the NeoALTTO trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(4): 448–455.
7. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–271.
8. Prat A, Carey LA, Adamo B, et al. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(8):dju152.
9. Prat A, Pascual T, De Angelis C, et al. HER2-enriched subtype and ERBB2 expression in HER2-positive breast cancer treated with dual HER2 blockade. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(1):46–54.
10. Carbone L, Miglietta F, Paris I, et al. Prognostic and predictive implications of PTEN in breast cancer: unfulfilled promises but intriguing perspectives. *Cancers.* 2019;11(9):1401.
11. Loibl S, Majewski I, Guarneri V, 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):1519–1525.
12. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(8):628–638.
13. Brasó-Maristany F, Griguolo G, Pascual T, et al. Phenotypic changes of HER2-positive breast cancer during and after dual HER2 blockade. *Nat Commun.* 2020;11(1):385.
14. Kurozumi S, Inoue K, Matsumoto H, et al. Prognostic utility of tumor-infiltrating lymphocytes in residual tumor after neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab for HER2-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):1583.
15. Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, et al. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2013;24(12):2990–2994.
16. Nuciforo P, Pascual T, Cortés J, et al. A predictive model of pathologic response based on tumor cellularity and tumor-infiltrating lymphocytes (CelTIL) in HER2-positive breast cancer treated with chemo-free dual HER2 blockade. *Ann Oncol.* 2018;29(1):170–177.
17. Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18(4):545–554.
18. Holmes FA, Nagarwala YM, Espina VA, et al. Correlation of molecular effects and pathologic complete response to preoperative lapatinib and trastuzumab, separately and combined prior to neoadjuvant breast cancer chemotherapy. *JCO.* 2011;29(suppl 15):506–506.
19. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1137–1146.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

**Supplementary Table 1.** Clinical-pathological characteristics between the cohort of patients with CelTIL and the cohort of patients without the CelTIL data from the NeoALTTO trial<sup>a</sup>

	CelTIL evaluable (n=196)	CelTIL non- evaluable (n=107)	<i>P</i> (evaluable vs non- evaluable)
Age at diagnosis, median (range), years	49 (23-75)	50 (25-80)	0.526 (Man-Wilcoxon)
Pre-treatment tumor size			
T2	117 (59.7%)	67 (62.6%)	0.708 (Chi-square)
≥ T3	79 (40.3%)	40 (37.4%)	
Pre-treatment nodal status			
N0/1	166 (84.7%)	90 (84.1%)	1.000 (Chi-square)
≥ N2, Nx or missing	30 (15.3%)	17 (15.9%)	
Hormone receptor status			
Positive	106 (54.1%)	46 (43%)	0.084 (Chi-square)
Negative	90 (45.9%)	61 (57%)	
pCR status (note – some cases have unknown pCR status)			
Yes	56 (28.6%)	52 (48.6%)	0.001 (logistic regression stratified by hormone receptor status)
No	134 (68.4%)	51 (47.7%)	
Unknown	6 (3%)	4 (3.7%)	
EFS events	60 (30.7%)	24 (22.4%)	0.218 (log-rank)
Deaths	36 (18.4%)	17 (15.9%)	0.721 (log-rank)

<sup>a</sup>All cases from the lapatinib-only arm are excluded. EFS = event-free survival, pCR = pathological complete response.

**Supplementary Table 2.** Multivariate Cox proportional hazards models for event-free survival and overall survival<sup>a</sup>

	HR (95% CI)	<i>P</i>
Event-free survival		
CelTIL score	0.40 (0.17 – 0.94)	0.04
Baseline TILs (per 10%)	0.73 (0.57-0.94)	0.01
Pre-NAC tumor size	0.81 (0.46-1.44)	0.47
Pre-NAC nodal status	1.11 (0.45-2.69)	0.83
HR status	0.76 (0.43 – 1.35)	0.35
Planned surgery	1.05 (0.56-1.99)	0.87
pCR status	0.61 (0.3-1.23)	0.17
Treatment arm	0.82 (0.46-1.49)	0.52
Overall survival		
CelTIL score	0.43 (0.20-0.92)	0.03
Baseline TILs (per 10%)	0.85 (0.64-1.13)	0.26
Pre-NAC tumor size	0.46 (0.21-0.98)	0.04
Pre-NAC nodal status	0.8 (0.26-2.46)	0.70
HR status	0.67 (0.31-1.46)	0.32
Planned surgery	1.69 (0.63-4.58)	0.30
pCR status	0.38 (0.13-1.15)	0.09
Treatment arm	0.57 (0.25-1.3)	0.18

<sup>a</sup> CI = confidence interval; HR = hazard ratio; pCR = pathological complete response

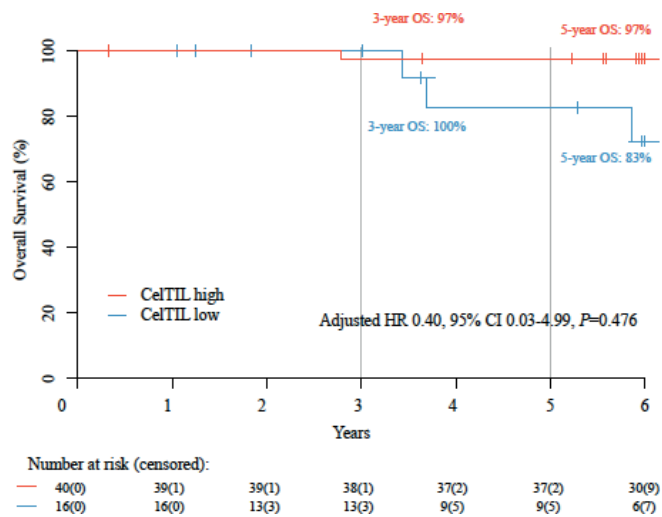
**Supplementary Table 3.** Relationship between tumor infiltrating lymphocytes (TILs) at week 2 and tumor cellularity at week 2 and outcome<sup>a</sup>

	Event-Free Survival		Overall Survival	
	HR (95% CI)	<i>P</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>
TILs (per 10% increment)	0.79 (0.68-0.92)	0.002	0.88 (0.75-1.03)	0.11
Tumor cellularity (per 1% increment)	1 (0.99-1.01)	0.60	1.01 (1-1.02)	0.16

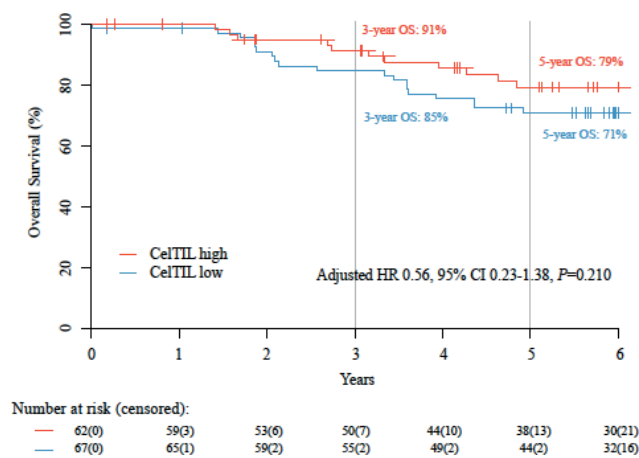
<sup>a</sup> HR = hazard ratio; CI = confidence interval

**Supplementary Figure 1.** Survival outcomes in NeoALTTO based on CelTIL score. **(A)** OS in patients with a pCR; **(B)** OS in patients with a non-pCR. Estimates of EFS and OS were from Kaplan-Meier curves and tests of differences by cox proportional hazard model. All statistical tests were two sided. EFS =Event-free survival; OS = Overall Survival; HR = Hazard Ratio; CI = Confident Interval.

A.



B.





## SEGUNDO ARTÍCULO

---

### **Oestrogen receptor activity in hormone-dependent breast cancer during chemotherapy**

**Nuria Chic**, Francesco Schettini, Fara Brasó-Maristany, Esther Sanfeliu, Barbara Adamo, Maria Vidal, Débora Martínez, Patricia Galvan, Blanca González-Farré, Javier Cortés, Joaquín Gavilá, Cristina Saura, Mafalda Oliveira, Sònia Pernas, Olga Martínez-Saez, Jesús Soberino, Eva Ciruelos, Lisa A Carey, Montserrat Muñoz, Charles M Perou, Tomás Pascual, Meritxell Bellet, Aleix Prat.

*EBioMedicine* Volume 69, July 2021, 103451

Factor de impacto JCR 2021: 11.205 (Q1)



## RESUMEN DEL SEGUNDO ARTICULO

El tratamiento con quimioterapia (neo)adyuvante tiene un papel relevante en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama con expresión de receptores hormonales positivos (RRHH+) especialmente en aquellas que se encuentran en la etapa premenopáusica. Los tres grandes ensayos clínicos prospectivos fase III observaron un beneficio adicional del tratamiento con quimioterapia adyuvante en pacientes premenopáusicas que no se observó en pacientes menopáusicas. La explicación biológica de esta disparidad en el beneficio se encuentra todavía pendiente de responder. En este trabajo se ha realizado una caracterización a nivel de expresión génica, mediante la plataforma nCounter, en muestras tumorales de diferentes cohortes de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama RRHH+, tanto premenopáusicas como menopáusicas, que recibieron terapia dirigida asociada a endocrinoterapia (ET), ET en monoterapia o quimioterapia, tanto antes como después del tratamiento. Primero se exploraron las muestras de 106 pacientes menopáusicas incluidas en el ensayo clínico fase II CORALLEEN. En este ensayo las pacientes fueron aleatorizadas a recibir tratamiento neoadyuvante mediante poliquimioterapia o ribociclib más letrozol. Se observó que existían un total de 19 genes relacionados con la vía de estrógenos que se encontraban sobreexpresados en el brazo de ribociclib más letrozol exclusivamente. Estos resultados fueron confirmados en otra cohorte independiente de 20 pacientes menopáusicas tratadas con letrozol en monoterapia, así como en la línea celular MCF7 (RRHH+/HER2-negativo) tratada con estradiol. Se observó que la expresión del gen *PGR* se encontraba infraexpresado a las 2 semanas de tratamiento mediante ET y terapia anti-HER2 tanto en pacientes pre- como menopáusicas en cáncer de mama RRHH+/HER2-positivo (HER2+). Mientras que tratamiento anti-HER2 en monoterapia aumentaba la expresión del gen *PGR* en cáncer de mama RRHH-negativo/HER2+. Posteriormente se valoró la misma firma de 19 genes en una cohorte de pacientes tanto pre- como menopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama RRHH+/HER2- tratadas con quimioterapia neoadyuvante, observándose que esta firma presentaba una disminución de su expresión solo en pacientes premenopáusicas. Además, en 40 pacientes tanto pre – como menopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama receptor de progesterona positivo (RP+) /HER2 negativo (HER2-) tratadas mediante quimioterapia neoadyuvante, el 69.2% de las pacientes premenopáusicas realizaron una negativización del RP mientras que solo lo alcanzaron el 14.8% de las pacientes menopáusicas ( $p = 0.001$ ). Estos resultados indican que la quimioterapia podría inducir una disminución de la expresión de los genes regulados por el receptor de estrógenos en pacientes premenopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama hormonodependiente, probablemente ocasionado por el efecto indirecto que genera la quimioterapia con la disfunción ovárica.



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ebiom](http://www.elsevier.com/locate/ebiom)

Research paper

## Oestrogen receptor activity in hormone-dependent breast cancer during chemotherapy



Nuria Chic<sup>a,b,c,1</sup>, Francesco Schettini<sup>a,b,c,1</sup>, Fara Brasó-Maristany<sup>a,b,c</sup>, Esther Sanfeliu<sup>a,c,d</sup>, Barbara Adamo<sup>a,b,c</sup>, Maria Vidal<sup>a,b,c</sup>, Debora Martínez<sup>a,b,c</sup>, Patricia Galván<sup>a,b,c</sup>, Blanca González-Farré<sup>a,c,d</sup>, Javier Cortés<sup>e,f</sup>, Joaquín Gavilá<sup>c,g</sup>, Cristina Saura<sup>c,e</sup>, Mafalda Oliveira<sup>c,e</sup>, Sonia Pernas<sup>c,h</sup>, Olga Martínez-Sáez<sup>a,b,c</sup>, Jesús Soberino<sup>i</sup>, Eva Ciruelos<sup>c,j</sup>, Lisa A. Carey<sup>k</sup>, Montserrat Muñoz<sup>a,b,c</sup>, Charles M. Perou<sup>k</sup>, Tomás Pascual<sup>c,k</sup>, Meritxell Bellet<sup>c,e</sup>, Aleix Prat<sup>a,b,c,i,k,l,\*</sup>

<sup>a</sup> Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Medical Oncology, Hospital Clinic of Barcelona, Spain

<sup>c</sup> SOLTI cooperative group, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Pathology, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Institute of Oncology (IOB)-Quiron, Madrid, Spain

<sup>g</sup> Department of Medical Oncology, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

<sup>h</sup> Department of Medical Oncology, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain

<sup>i</sup> Institute of Oncology (IOB)-Hospital Quirónsalud, Barcelona, Spain

<sup>j</sup> Department of Medical Oncology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>k</sup> Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chapel Hill, USA

<sup>l</sup> Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 26 March 2021

Revised 12 May 2021

Accepted 4 June 2021

Available online 20 June 2021

#### Keywords:

Pre-menopause

Progesterone receptor

Hormone receptor positive

Breast cancer

Chemotherapy

Oestrogens

### ABSTRACT

**Background:** Chemotherapy efficacy in early-stage hormone receptor-positive (HR+) breast cancer (BC) according to menopausal status needs a biological explanation.

**Methods:** We compared early-stage HR+ BC biological features before and after (neo)adjuvant chemotherapy or endocrine therapy (ET), and assessed oestrogen receptor (ER) pathway activity in both pre- and post-menopausal patients. The nCounter platform was used to detect gene expression levels.

**Findings:** In 106 post-menopausal patients with HR+/HER2-negative BC randomized to neoadjuvant chemotherapy or ET (letrozole+ribociclib), a total of 19 oestrogen-regulated genes, including progesterone receptor (*PGR*), were found downregulated in the ET-based arm-only. We confirmed this finding in an independent dataset of 20 letrozole-treated post-menopausal patients and found, conversely, an up-regulation of the same signature in HR+/HER2-negative MCF7 cell line treated with estradiol. *PGR* was found down-regulated by 2 weeks of ET+anti-HER2 therapy in pre-/post-menopausal patients with HR+/HER2-positive (HER2+) BC, while anti-HER2 therapy alone increased *PGR* expression in HR-negative/HER2+ BC. In 88 pre- and post-menopausal patients with newly diagnosed HR+/HER2-negative BC treated with chemotherapy, the 19 oestrogen-regulated genes were found significantly downregulated only in pre-menopausal patients. In progesterone receptor (PR)+/HER2-negative BC treated with neoadjuvant chemotherapy (n=40), tumours became PR-negative in 69.2% of pre-menopausal patients and 14.8% of post-menopausal patients (p=0.001). Finally, a mean decrease in *PGR* levels was only observed in pre-menopausal patients undergoing anti-HER2-based multi-agent chemotherapy.

**Interpretation:** Chemotherapy reduces the expression of ER-regulated genes in pre-menopausal women suffering from hormone-dependent BC by suppressing ovarian function. Further studies should test the value of chemotherapy in this patient population when ovarian function is suppressed by other methods.

\* Corresponding author at: Translational Genomic and Targeted Therapies in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS) and Department of Medical Oncology, Hospital Clinic, Carrer de Villarroel, 170, 08036, Barcelona, Spain.

<sup>1</sup> co-first authors for equal contribution

E-mail address: [alprat@clinic.cat](mailto:alprat@clinic.cat) (A. Prat).



**Funding:** Instituto de Salud Carlos III, Breast Cancer Now, the Breast Cancer Research Foundation, the American Association for Cancer Research, Fundació La Marató TV3, the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme, Pas a Pas, Save the Mama, Fundació Científica Asociación Española Contra el Cáncer, PhD4MDgrant of "Departament de Salut", exp SLT008/18/00122, Fundació SEOM and ESMO. Any views, opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed in this material are those solely of the author(s).

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## Research in Context

### *Evidence before this study*

Transient or permanent amenorrhea is frequently induced by adjuvant chemotherapy in pre-menopausal women affected by hormone receptor-positive (HR+) breast cancer. However, it is unclear if this indirect effect of chemotherapy affects anti-tumour response. Here, we carried out a systematic literature search on Pubmed<sup>®</sup> in March 2021 by using the following terms "antiestrogen", "anti-estrogen", "effect", "chemotherapy", "breast cancer", "breast tumour", "premenopause" and "premenopausal", without language restrictions. We screened 905 references and none shed light on the molecular basis of chemotherapy efficacy in premenopausal HR+ breast tumours.

### *Added value of this study*

This is the first report to provide biological evidence that chemotherapy induces an anti-oestrogen effect in pre-menopausal patients with oestrogen-dependent breast cancer, as does an aromatase inhibitor in post-menopausal patients.

### *Implications of all the available evidence*

The value of chemotherapy in pre-menopausal patients with hormone-dependent breast cancer might be low or null if ovarian function suppression is induced. Large prospective trials with survival outcomes should test this hypothesis.

retrospective cohorts from the Hospital Clinic of Barcelona (HCB) and a publicly available cell line-derived dataset, as subsequently described.

**Patient cohorts.** The SOLTI-1402 CORALLEEN trial is an open-label, phase II parallel, two-arm, neoadjuvant trial, where 106 post-menopausal patients with stage I-IIIa HR+/HER2- negative and luminal B (by the standardized PAM50/Prosigna<sup>®</sup> assay) breast cancer were randomized 1:1 to receive either six cycles of 28 days of oral ribociclib 600mg once daily on a 3 weeks-on 1week-off schedule plus continuous letrozole 2.5 mg once daily or standard neoadjuvant chemotherapy with four cycles of doxorubicin 60mg/m<sup>2</sup> and cyclophosphamide 600mg/m<sup>2</sup> intravenous (IV) every 21 days followed by paclitaxel 80mg/m<sup>2</sup> during 12 weeks. Tumour samples were collected at baseline and at surgery, and subsequently formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) according to protocol. The main results of the SOLTI-CORALLEEN trial have been previously reported [11]. This study is registered in ClinicalTrials.gov with number NCT03248427 and is completed.

SOLTI-1501 VENTANA trial is a neoadjuvant phase II trial that randomized a total of 61 post-menopausal patients diagnosed with stage I-IIIa HR+/HER2-negative breast to receive either letrozole 2.5 mg daily, oral metronomic vinorelbine 50 mg 3 days a week or letrozole 2.5 mg daily and oral metronomic vinorelbine 50 mg three times a week for 3 weeks. Tumour samples were collected at baseline and after 3 weeks of letrozole treatment and subsequently FFPE according to protocol. The main results of the SOLTI-1501 VENTANA have been previously reported [12]. This study is registered in ClinicalTrials.gov with number NCT02802748 and is completed.

The PAMELA trial is a non-randomized, open label, multicentric phase II study of neoadjuvant dual HER2 blockade therapy without chemotherapy, where 151 patients with early HER2+ breast cancer were treated with neoadjuvant lapatinib (1,000 mg daily) and trastuzumab (8 mg/kg i.v. loading dose followed by 6 mg/kg) for 18 weeks. Patients with HR+ breast cancer received letrozole or tamoxifen according to menopausal status. The main results of the PAMELA trial have been previously reported [13]. Tumour samples were collected at baseline, day 14 and surgery and subsequently formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) according to protocol. This study is registered in ClinicalTrials.gov with number NCT01973660 and is completed.

SOLTI-1007 NEOERIBULIN trial is a neoadjuvant phase II, single-arm trial that included 174 stage II-III HER2-negative breast cancer patients (73 triple-negative and 101 HR+/HER2-negative) to receive 1.4 mg/m<sup>2</sup> of eribulin intravenously on days 1 and 8 every 21-day cycle, for 4 cycles. Tumour samples were collected at baseline and at surgery and subsequently FFPE according to protocol. The main results of the SOLTI-1007 NEOERIBULIN study have been previously reported [14]. This study is registered in ClinicalTrials.gov with number NCT01669252 and is completed.

Hospital Clinic HR+/HER2-negative neoadjuvant cohort is a retrospective cohort of 40 patients diagnosed with stage II-III HR+/HER2-negative breast cancer (13 pre-menopausal and 27 post-menopausal), between 2015-2018 at the HCB. All patients received an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy. Tumour samples were collected at baseline and surgery and subsequently FFPE.

Hospital Clinic HER2+ neoadjuvant cohort is a retrospective cohort of 73 pre-menopausal and post-menopausal patients

## 1. Introduction

Hormone receptor-positive (HR+) breast cancer is a major cause of cancer death [1]. Early-stage treatment consists of loco-regional therapy and adjuvant endocrine therapy [2]. (Neo)adjuvant chemotherapy is generally indicated for patients with high-risk HR+ tumours that usually have a high-proliferative state, which is a general biomarker of chemotherapy responsiveness [3,4]. In HR+ breast tumours with low-to-intermediate proliferation, however, recent results from three large, randomized adjuvant clinical trials (i.e., TailorX [3], MINDACT [4] and RxPONDER [5]) suggest that chemotherapy improves survival outcomes in pre-menopausal patients yet not in those who are post-menopausal. The biological explanation behind this observation remains unknown. On one hand, intrinsic genomic features of tumour cells in young women might render tumour cells more sensitive to chemotherapy [6]. On the other hand, chemotherapy's ability to induce ovarian failure or premature menopause is well-established [7]; hence, this could lead to a decrease of systemic levels of oestrogen [7,10]. To optimize the treatment landscape of early-stage HR+ breast cancer, a better understanding of this clinical observation is needed because these alternative hypotheses could mean different treatment options for young women with breast cancer.

## 2. Methods

To address the potential anti-oestrogen effects of chemotherapy in breast cancer, we analyzed tumour samples from 4 clinical trials, 2

diagnosed with HER2+ early stage (II/III) breast treated with neoadjuvant anti-HER2-based multi-agent chemotherapy between 2008 and 2017 at the HCB. FFPE tumour samples were collected at baseline and surgery (if residual disease).

### 2.1. Ethics

Each study was conducted according to the Declaration of Helsinki. For each one of the previously mentioned patient cohorts, an informed consent for study participation had been previously obtained from all patients enrolled in each individual study. HCB cohorts included patients in observational studies for which Ethic approval was granted by the ethics committee of the HCB (IRB: HCB/2021/0007 and HCB/2015/0491). All other cohorts proceeded from clinical trials that were approved by independent ethics committees at each centre, as specified in the respective publications.

**RNA extraction.** RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumour samples from the HCB neoadjuvant HER2+ cohort, the SOLTI-CORALLEEN, SOLTI-VENTANA, PAMELA and SOLTI-NEOERIBULIN trials using the High Pure FFPE RNA isolation kit (Roche, Indianapolis, IN, USA). At least 1–5 10 mm FFPE slides were used for each tumour specimen, and macrodissection was performed to avoid contamination with normal breast tissue, if needed. RNA was quantified at the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

**Gene expression analysis.** A minimum of 100 ng of total RNA was used to measure gene expression across the SOLTI-CORALLEEN, SOLTI-VENTANA, PAMELA and SOLTI-NEOERIBULIN trials and 1 neoadjuvant cohort of the HCB using the nCounter platform (NanoString Technologies, Seattle, Washington, USA). In SOLTI-CORALLEEN and SOLTI-VENTANA, we used the nCounter® Breast Cancer 360™ panel, which includes 771 breast cancer-related genes. In PAMELA, a custom made codeset of 560 breast cancer-related genes was used. In SOLTI-NEOERIBULIN, a custom made codeset of 540 breast cancer-related genes was used. In the neoadjuvant cohort of the HCB, a custom made codeset of 60 genes was used. Across the 5 studies, genomic data were normalized using 5 housekeeping genes (*ACTB*, *MRPL19*, *PSMC4*, *RPPLP0* and *SF3A1*) and log<sub>2</sub> transformed. Expression counts were then normalized using the nSolver 4.0 software and custom scripts in R 3.6.1.

**Immunohistochemistry.** Hematoxylin and eosin (H/E) staining was performed to confirm the presence of invasive tumour cells (10%) and determine the minimum tumour surface area (4 mm<sup>2</sup>). Progesterone receptor (PR) expression was identified using the 1E2 rabbit monoclonal primary antibody (Ventana Medical Systems). PR-negative disease was defined as less than 1% of positive tumour cells.

**Genomic analysis on MCF7 cell line.** Microarray-based gene expression data was obtained from GEO GSE119552 (available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119552>). In the original study, MCF7 breast cancer cell line was cultured for at least 24 h in steroid- and serum-deprived DMEM without phenol red and with 1.5% charcoal/dextran-stripped FBS (Biowest). Cells were treated for 24h with solvent as a control or 10<sup>-9</sup> M E2. RNA was extracted and gene expression analysis was performed using Agilent SurePrint G3 Human GE v2 8 × 60 microarrays [15].

**Statistical analysis.** To identify genes whose expression was significantly different between paired samples (i.e., baseline versus after treatment) or unpaired samples (i.e., different MCF-7 cell lines treated with control or E2) we used a two-class paired or a multiclass Significance Analysis of Microarray (SAM), respectively, with a false discovery rate (FDR) < 5% [16]. The SAM provides for each gene analyzed the standardized mean difference between the gene's expression in a class (e.g., a cell line, a patient cohort etc.), versus its overall mean expression in the dataset. The algorithm applies a t-test at the individual gene level to determine whether the expression pattern for that gene is significant and is able to identify up/down-regulated

genes by determining the deviations between observed and expected relative differences, considering a prespecified cut-off for the FDR. This is the rate at which a gene will be incorrectly identified as significant [16]. Paired or unpaired Student's t test, Mann-Whitney test and ANOVA were conducted whenever appropriate to compare continuous variables between groups. Univariate logistic regression was performed to evaluate the association between PR expression according to menopausal status in the HER2-negative HCB chemo-treated cohort. All statistical tests were two-sided, and the statistical significance level was set to < 0.05. All analyses were performed using R software version 4.0.2.

### 2.2. Role of funding source

The funders had no role in study design, data collection, data analyses, interpretation, or writing of this report. All authors had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

## 3. Results

First, we analyzed tumour samples from the SOLTI-CORALLEEN phase II clinical trial [11]. 106 post-menopausal patients with newly diagnosed stage II-III hormone-dependent luminal B breast cancers were randomized to either standard neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy or endocrine therapy (ET) of letrozole in combination with ribociclib, a CDK4/6 inhibitor, for 6 months (Fig 1a). We performed gene expression profiling of 771 breast cancer-related genes in pretreatment tumours, and in residual tumours at surgery, using the nCounter platform (NanoString Technologies, Seattle, USA). Within each arm, a gene list of the top-100 downregulated genes by each therapy was obtained using a two-class paired SAM. When we compared both gene lists, 81 of 100 genes (81%) were common in both treatment arms including many proliferation-related genes (e.g., *MKI67*, *TOP2A* and *EXO1*). A total of 19 genes were found downregulated in the ET-based arm-only (Fig 1b), including known oestrogen-regulated genes such as progesterone receptor (*PGR*) [17], cyclin D1 (*CCND1*) [18], the trefoil factor 1 (*TFF1*) [19], *TFF3* [20], proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) and E2F transcription factor 1 (*E2F1*) [21]. Of note, *PGR*, *TFF1* and *TFF3* have been previously correlated with plasma estradiol levels in HR+ breast cancer in post-menopausal women [22].

To confirm these results, we first evaluated the expression of the 19 oestrogen-regulated genes using the nCounter platform in an independent dataset of 20 post-menopausal patients with newly diagnosed HR+/HER2-negative breast cancer (80% Luminal A, 15% Luminal B and 5% normal-like) treated for 3 weeks with letrozole monotherapy in the SOLTI-VENTANA clinical trial (Fig 1c-d) [12]. As expected, all genes, including *PGR* (Fig 1e), were found significantly downregulated in the post-treatment samples (Fig 1d). Secondly, MCF7 ER+/HER2-negative cell line treated *in vitro* with 10<sup>-9</sup> M estradiol (E2) showed a general up-regulation of the 19-gene signature, including *PGR*, which showed a 6.1-fold up-regulation (Fig 1f). Finally, *PGR* was also found down-regulated by 2 weeks of anti-oestrogen therapy (i.e., tamoxifen or letrozole) in combination with anti-HER2-based therapy (i.e. trastuzumab plus lapatinib) in pre-menopausal and post-menopausal patients with HR+/HER2+/Luminal A or B early-stage breast cancer in the PAMELA phase II clinical trial [13]. In contrast, anti-HER2 therapy alone for 2 weeks did not decrease *PGR* expression but conversely increased its expression in HR-negative/HER2+ early-stage breast cancer, consistent with our previous study showing that anti-HER2 therapy induces a luminal phenotype [23].

Our previous results identified 19 oestrogen-regulated genes in HR+ breast cancer. To evaluate the oestrogen signaling pathway during chemotherapy, we analyzed tumour samples from the phase II

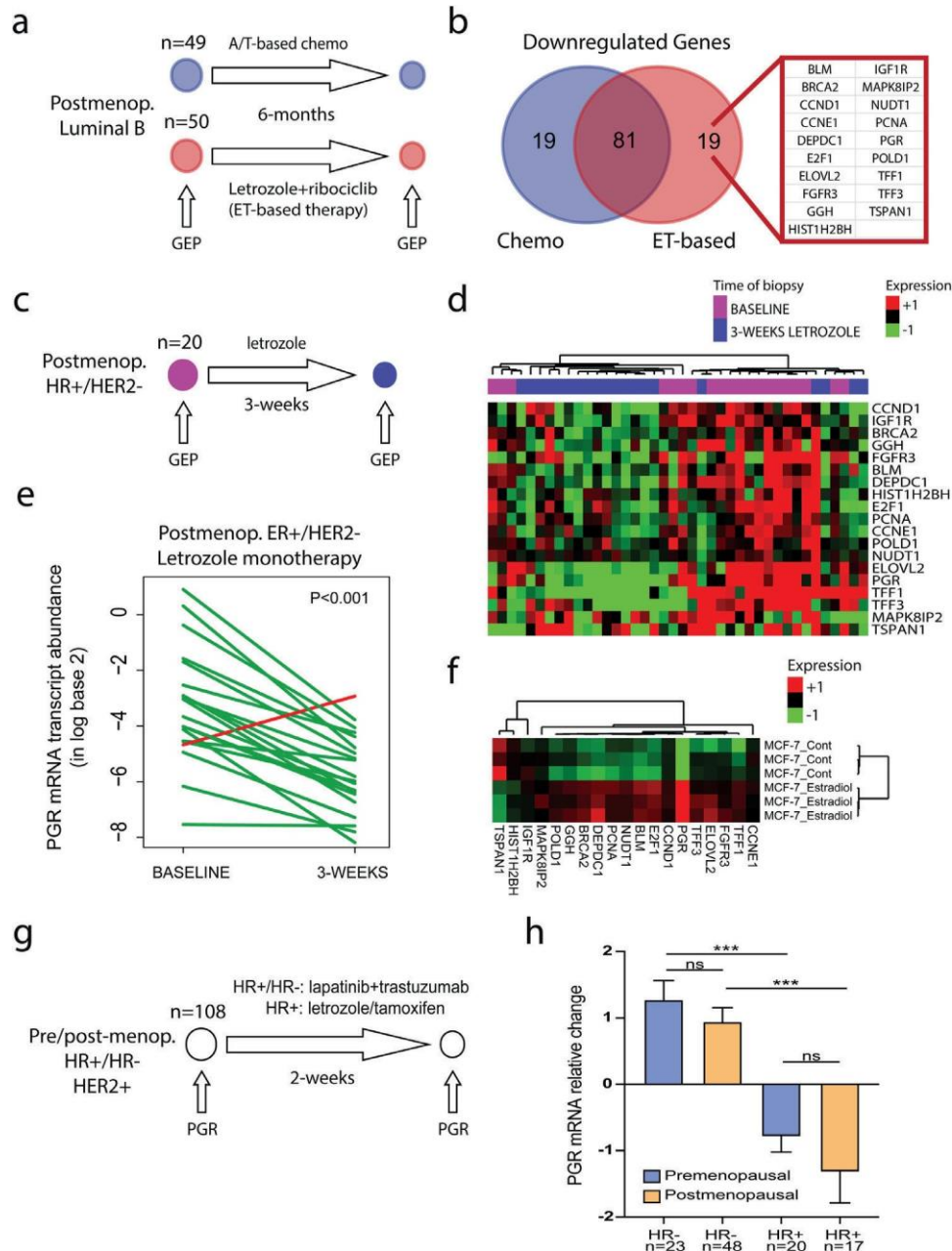


Fig. 1. Identification of oestrogen-regulated genes in early-stage breast cancer

Legend and captions. (a) Schematic trial design and tumour samples from 99 patients with HR+/HER2-negative disease recruited in the SOLT1-CORALLEEN trial phase II clinical trial(11). (b) Overlap of downregulated genes in SOLT1-CORALLEEN trial between both treatment arms (i.e., anthracycline/taxane [AT]-based chemotherapy and letrozole + ribociclib), and identification of 19 genes found downregulated in the endocrine therapy (ET)-based arm- only. (c) Schematic trial design and tumour samples from the SOLT1-VENTANA phase II clinical trial(12). (d) Unsupervised hierarchical clustering of 19 oestrogen-regulated genes using 20 paired ER+/HER2-negative (i.e., baseline and after 3-weeks of letrozole) from the SOLT1-VENTANA trial(12). Heatmap shows high (red) / low (green) expression of mRNA for each sample and gene. (e) Progesterone receptor (PGR) mRNA expression changes between baseline and after 3-weeks of letrozole monotherapy across 20 patients recruited in the SOLT1-VENTANA trial(12). Each line represents a patient. Increases are represented in red and decreases in green. P-value (P) was determined using a two-tailed paired Student's t-test. (f) Expression of the 19 oestrogen-regulated genes in the MCF7 HR+/HER2-negative cell line treated with  $10^{-9}$  M E2 versus control. Gene expression data was obtained from GEO [GSE119552](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119552) (available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119552>). (g) Schematic trial design and tumour samples from 108 patients with HER2+ early breast cancer, including HER2+/HR- (n=71) and HER2+/HR+/Luminal A or B (n=37) disease recruited in the PAMELA phase II clinical trial(13). (h) Progesterone receptor (PGR) mRNA relative changes after 2 weeks of treatment in premenopausal and post-menopausal patients. P-value (P) was determined one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. \*\*\*; p<0.001; n/s: non-significant.

neoadjuvant SOLT1-NEOERIBULIN trial [14], in which 83 patients (35 pre-menopausal and 48 post-menopausal) with newly diagnosed HR+/HER2-negative breast cancer (40% Luminal A, 39% Luminal B, 11% normal-like, 8% Basal-like and 2% HER2-enriched) received 4 cycles (i.e., 12 weeks) of eribulin in monotherapy, an anti-microtubule agent (Fig 2a). We performed gene expression profiling of pretreatment and residual tumours at surgery using the nCounter platform. Strikingly, PGR was found significantly downregulated only in pre-

menopausal patients (Fig 2b). We observed similar findings with the other 19 oestrogen-regulated genes (Fig 2c). Conversely, no oestrogen-regulated gene was found differentially expressed in 55 patients (12 pre-menopausal and 33 post-menopausal) with triple-negative breast cancer in the SOLT1-NEOERIBULIN according to menopausal status (data not shown). This result provided direct evidence that chemotherapy induces an anti-oestrogen effect in hormone-dependent tumour cells in pre-menopausal patients. Interestingly, 80% (4 of 5)

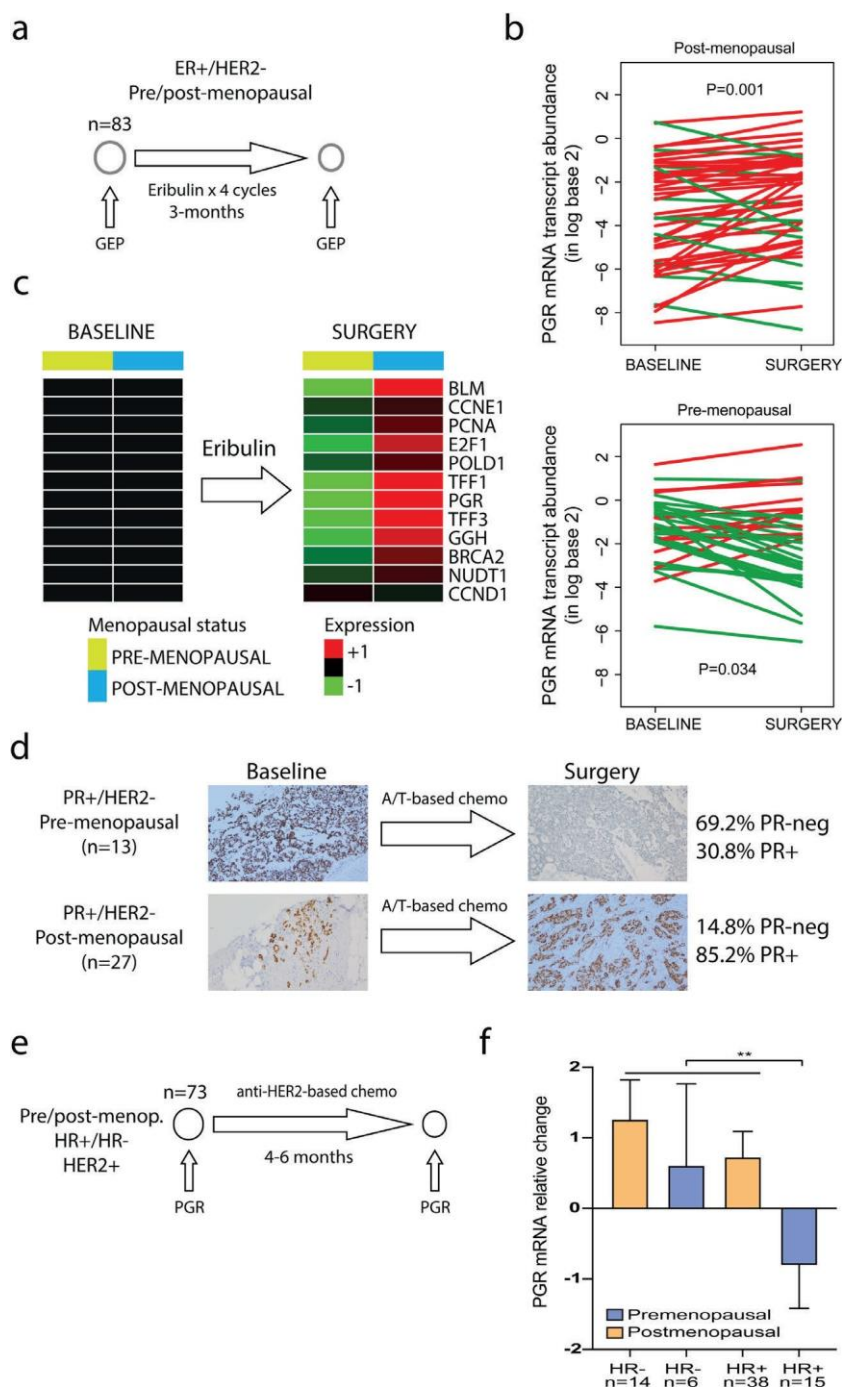


Fig. 2. Oestrogen-regulated genes following chemotherapy in early-stage breast cancer *per* menopausal status

**Legend and captions.** (a). Schematic trial design and tumour samples from the SOLT1-NEOERIBULIN phase II clinical trial (14). (b) Progesterone receptor (PGR) mRNA expression changes between baseline and after 4 cycles of eribulin monotherapy in 83 patients with residual tumours at surgery (i.e., 35 pre-menopausal and 53 post-menopausal). Each line represents a patient. Increases are represented in red and decreases in green. P-value (P) were determined using a two-tailed paired Student's t-test. (c). Changes in gene expression after 4 cycles of eribulin in 83 patients included in the SOLT1-NEOERIBULIN trial *per* menopausal status. Heatmap shows high (red) / low (green) expression of mRNA. (d) Images and summary of progesterone receptor (PR) status by immunohistochemistry in residual tumours of 40 patients (13 pre-menopausal and 27 post-menopausal) with PR+/HER2-negative breast cancer treated with anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy at the Hospital Clinic of Barcelona (Hematoxylin and eosin staining, original magnification  $\times 10$ ). (e) Schematic trial design and tumour samples from 73 HER2+ early-stage breast patients treated with neoadjuvant anti-HER2-based multi-agent chemotherapy for 4-6 months, including HER2+/HR- (n=20) and HER2+/HR+/Luminal A or B (n=53) (f) Progesterone receptor (PGR) mRNA relative changes after 4-6 months of treatment in pre-menopausal and post-menopausal patients P-value (P) was determined using a two-tailed unpaired Mann-Whitney test. \*\*:  $p < 0.01$ .

of the pre-menopausal patients with HR+/HER2-negative breast cancer and age  $< 40$  had a 3-fold decrease of *PGR* compared to 23.3% (7 of 30) pre-menopausal patients with age  $\geq 40$  ( $p = 0.026$ ).

Progesterone receptor (PR) has been identified as a marker of oestrogenicity in numerous studies spanning 3 decades [22,24]. To further explore the modulation of PR by chemotherapy in residual

tumours according to menopausal status, we evaluated the protein levels by immunohistochemistry in an independent dataset of the 40 patients (13 pre-menopausal and 27 post-menopausal) with newly diagnosed ER+/PR+/HER2-negative breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy at the HCB (Fig 2d). The proportion of PR-negative disease in residual tumours at

surgery was 9 of 13 (69.2%) in pre-menopausal patients and 4 of 27 (14.8%) in post-menopausal patients (odds ratio=4.70;  $p$ -value=0.001). Consistent with this finding, a previous study observed decreased PR expression at residual tumours among pre-menopausal patients treated with neoadjuvant chemotherapy, but not post-menopausal patients [25]. Finally, we explored the ability of chemotherapy to reduce the levels of *PGR* in 73 pre-menopausal and post-menopausal patients with HER2+ early-stage breast treated with neoadjuvant anti-HER2-based multi-agent chemotherapy at the HCB (Fig 2e). Consistent with previous findings, a mean decrease in *PGR* levels was only observed in pre-menopausal patients with HR+/HER2+ disease (Fig 2f).

#### 4. Discussion

To our knowledge, this is the first report to provide biological evidence that the benefit of chemotherapy in pre-menopausal patients with a newly diagnosed oestrogen-dependent breast cancer is likely due to the suppression of the ovarian function induced by chemotherapy. This effect is similar to the anti-oestrogen effect induced by an aromatase inhibitor in post-menopausal patients, where oestrogen biosynthesis is suppressed in peripheral tissues through the inhibition of the aromatization of androgens to oestrogens [8]. However, differently from what occurs in menopause, the predominant source of oestrogens in pre-menopausal women is the ovary. Thus, the most likely explanation of our findings is that chemotherapy induces ovarian function suppression in pre-menopausal patients, leading to lower systemic levels of estradiol, which then causes reduced expression of oestrogen/oestrogen-receptor regulated genes in tumour cells. Our findings could explain, in part or in total, the recent clinical findings from TailorX [3], MINDACT [4] and RxPONDER [5] randomized trials in >10,000 patients with HR+/HER2-negative breast cancer with a genomic low-risk by OncotypeDX or MammaPrint, which are biomarkers largely tracking tumour cell proliferation. In these studies, unlike post-menopausal patients, pre-menopausal patients obtained survival benefit from adjuvant chemotherapy. This survival benefit of chemotherapy was also observed in pre-menopausal patients with very low proliferation status (i.e., recurrence score of 0-14 by OncotypeDX in RxPONDER) [5]. Of note, the proportion of patients receiving luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) analogues in these trials was less than 20% [3-5]. These results reinforce our hypothesis that the benefit induced by chemotherapy in pre-menopausal women is directly related to its ability to induce ovarian function suppression.

Our study presents some limitations that need to be acknowledged. Firstly, this is a retrospective and exploratory analysis from available datasets, with all the known limitations and biases concerning sample and dataset availability. Secondly, we had no data regarding patients' oestradiol (E2), FSH and LH blood levels. Consequently, we could not assess any direct correlation between ovarian function and the molecular findings. Finally, the different patients cohorts proceeded from different prospective interventional and observational multicentre clinical trials, being thus prone to a selection bias. In this regard, it would be useful to expand on the results of the present study by performing confirmatory analyses on tissues from a broader number of patients in wider randomized trials [26-31]. Nonetheless, results are consistent between similar cohorts and cell lines assays and provide a coherent explanation of the clinical results observed in TailorX [3], MINDACT [4] and RxPONDER [5] trials.

In summary, we have shown that chemotherapy (i.e., eribulin or anthracycline/taxane-based chemotherapy) exerts an anti-oestrogenic biological effect on tumour samples from pre-menopausal patients, which is very similar to that observed with aromatase inhibitors on tumour samples from post-menopausal women. Our chemotherapy-induced endocrine signature, not previously reported, to our knowledge, strongly supports the lengthily accepted hypothesis that at

least a substantial proportion of the survival gain obtained from chemotherapy in pre-menopausal women is due to an endocrine effect, most likely via a decrease in global estradiol levels secondary to ovarian function suppression [10, 32]. This is in line with results of several phase 3 trials and one subsequent meta-analysis showing similar outcomes for adjuvant LHRH analogue treatment, alone or added to chemotherapy, versus chemotherapy for all pre-menopausal population with ER+ breast cancer [33]. Interestingly, survival benefits with the addition of LHRH analogues to chemotherapy were only seen in younger women (<40 years), precisely those with lower probability of definitive chemo-induced amenorrhoea [33]. Indeed, a non-meaningless proportion of women experience recovery of estradiol and FSH levels to pre-menopausal range in the subsequent months [34, 35]. In this context, pivotal phase 3 trials such as SOFT, TEXT and AST-TRA have established the superiority of adding ovarian function suppression to an aromatase inhibitor/tamoxifen versus tamoxifen alone in pre-menopausal women with HR+ early-stage breast cancer [35, 36]. However, whether LHRH analogues can be used to substitute the endocrine effects of chemotherapy and obtain similar survival outcomes is currently unknown. Nonetheless, our translational study gives consistency to this hypothesis. Finally, a large phase III clinical trial with survival outcome as the primary endpoint is likely needed to demonstrate the endocrine effects of chemotherapy in pre-menopausal patients. This trial could randomize pre-menopausal patients with early-stage HR+/HER2-negative breast cancer to chemotherapy versus no chemotherapy, where all patients are subjected to ovarian function suppression.

To conclude, despite some limitations, our results proffer a strong rationale to develop and/or test effective and more targeted anti-oestrogen treatment strategies in pre-menopausal patients. For example, LHRH modulators could be evaluated to decrease or avoid the use of systemic chemotherapy in hormone-dependent breast cancer. In this context, the capacity of each treatment strategy, including different LHRH modulators and schedules, to affect ovarian and ER function might be of critical importance [8,37]. For instance, LHRH modulators such as degarelix (i.e., a potent LHRH antagonist) achieves a faster ovarian function suppression, which is more effectively maintained compared to triptorelin (i.e., a LHRH agonist) [38]; thus, the magnitude of ovarian function suppression might be important [8,37]. Another relevant aspect to consider is the existence of a direct cytotoxic effect of chemotherapy on tumour cells, which is likely to be related to their proliferative status (i.e., more tumour proliferation, more benefit from chemotherapy). Future trials in pre-menopausal early-stage hormone-dependent breast cancer to de-escalate and/or escalate systemic therapy should be designed with these results in mind, including hormone-dependent HER2+ breast cancer.

#### Contributors

AP had the idea for and designed the study. JC and AP were the principal investigator of the SOLT-NEOERIBULN trial. JG and AP were the principal investigators of the SOLT-CORALLEEN trial. AP was the principal investigator of the SOLT-VENTANA trial. NC, FS, ES, FB-M, DM, PG, BG-F, TP contributed to data collection and assembly. NC and FS wrote the manuscript. All authors had full access to all the data in the study, discussed and interpreted the results, revised and approved the final manuscript and accepted responsibility to submit for publication.

#### Declaration of Competing Interest

Dr. Prat reports grants and personal fees from Pfizer, grants and personal fees from Lilly, personal fees from Nanostring technologies, grants and personal fees from Amgen, grants from Roche, personal fees from Oncolytics Biotech, personal fees from Daiichi Sankyo, personal fees from PUMA, personal fees from BMS, from Daiichi Sankyo,



outside the submitted work. Dr. Perou reports personal fees from Bio-classifier LLC, outside the submitted work; in addition, Dr. Perou has a U.S. Patent No. 12,995,459 with royalties paid. Dr. Saura reports personal fees from AstraZeneca, Daiichi Sankyo, Eisai, Exact Sciences, Exeter Pharma, F. Hoffmann - La Roche Ltd, MediTech, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Philips, Pierre Fabre, Puma, Roche Farma, Sanofi-Aventis, SeaGen, and Zymeworks outside the submitted work. Dr. Ciruelos reports personal fees from Roche, Pfizer, Lilly, Novartis, Astra-Zeneca/Daiichi Sankyo and from MSD outside the submitted work. Dr. Gavilán reports grants from Novartis, Pfizer, Astra-Zeneca and Lilly, outside the submitted work. Dr. Soberino reports grants and personal fees from MSD, grants from Sanofi and personal fees from Roche outside the submitted work. Dr. Carey reports uncompensated relationship with Sanofi, G1 Therapeutics, Genentech/Roche, AstraZeneca/Daiichi Sankyo, Aplitude Health and Exact Sciences; in addition Dr. Carey declared that Companies who have provided research funds to her institution in the past 1–2 years were Syndax, Immunomedics, Novartis, Nanostring technologies, Abbvie, Seattle Genetics and Veracyte, outside the submitted work. Dr. Bellet declares advisory board participation for Lilly, Pfizer and Novartis, as well as travel expenses from Pfizer, outside the submitted work. Dr. Muñoz reports expert testimony for Eisai, Novartis and Roche, advisory board for Pierre Fabre and travel grants from Lilly, Pfizer and Roche, outside the submitted work. Dr. Oliveira reports grants from Pfizer, grants, personal fees and non-financial support from Roche, grants and personal fees from Genentech, grants, personal fees and non-financial support from Novartis, grants and personal fees from Seattle Genetics, grants and personal fees from Astra-Zeneca, grants and personal fees from PUMA Biotechnology, grants from Immunomedics, grants from Boehringer-Ingelheim, non-financial support from Eisai, Grunenthal, GP Pharma and Pierre Fabre, outside the submitted work. Dr. Pernas reports personal fees and non-financial support from Novartis, personal fees from AstraZeneca, Daiichi-Sankyo, Polyphor, Seattle Genetics, Eisai, Roche and Pierre-Fabre, outside the submitted work. Dr. Cortes reports personal fees and travel expenses from Pfizer, personal fees from Lilly, Servier, Athenex, personal fees and travel expenses and advisory/honoraria from Roche, personal fees from Polyphor, personal fees and travel expenses from Daiichi Sankyo, Novartis and Eisai, personal fees from MSD, GSK, Astra-Zeneca, Celgene, Cellectia, Biothera, Merus, Seattle Genetics, Erytech, Leuko, Bioasis, Clovis Oncology, Boehringer-Ingelheim, Samsung Biopharmaceuticals, and stocks from MedSIR, outside the submitted work. The other authors have nothing to declare.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to patients who participated in the trials and consented for their tumours to be analyzed for research purposes.

#### Data sharing statement

All requests for raw and analyzed data and materials will be promptly reviewed by the SOLTI Group to verify whether the request is subject to any intellectual property or confidentiality obligations. Patient-related data not included in the paper were generated as part of the clinical trial and might be subject to patient confidentiality restrictions. Any data and materials that can be shared will be released via a material transfer agreement. Raw counts for gene expression analysis are directly available as Supplementary Material 1.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:[10.1016/j.ebiom.2021.103451](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103451).

#### References

- [1] Carioli G, Malvezzi M, Rodriguez T, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe. *Breast* 2017;36:89–95 2017 Dec.
- [2] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):66.
- [3] Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant breast cancer therapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. *N Engl J Med* 2018;379(2):111–21.
- [4] Cardoso F, van't Veer L, Poncet C, Lopes Cardoso J, Delalage S, Pierga J-Y, et al. MINDACT: long-term results of the large prospective trial testing the 70-gene signature MammaPrint as guidance for adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *JCO* 2020;38:506. (15\_suppl).
- [5] Kalinsky K, Barlow W, Meric-Bernstam F, et al. In: First results from a phase III randomized clinical trial of standard adjuvant endocrine therapy combined with chemotherapy in patients with 1–3 positive nodes, hormone receptor-positive and HER2-negative breast cancer with recurrence scores  $\geq 25$ : SWOG S1007 (RxPONDER). 2020 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2020 Dec.
- [6] Liao S, Hartmaier RJ, McGuire KP, Puhalla SL, Luthra S, Chandran UR, et al. The molecular landscape of premenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2015 Aug;17:104.
- [7] Schmid P, Untch M, Koss M, Bondar G, Vassiljev L, Tarutinov V, et al. Leuprorelin acetate every-3-months depot versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant treatment in premenopausal patients with node-positive breast cancer: the TABLE study. *J Clin Oncol* 2007 Jun;25(18):2509–15.
- [8] Bellet M, Gray KP, Francis PA, Løng I, Ciruelos E, Lluh A, et al. Twelve-Month Estrogen Levels in Premenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Receiving Adjuvant Triptorelin Plus Exemestane or Tamoxifen in the Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT): The SOFT-EST Substudy. *J Clin Oncol* 2016 May;34(14):1584–93.
- [9] Dowsett M, Richner J. Effects of cytotoxic chemotherapy on ovarian and adrenal steroidogenesis in pre-menopausal breast cancer patients. *Oncology* 1991;48(3):215–20.
- [10] Swain SM, Jeong J-H, Geyer CE, Costantino JP, Pajon ER, Fehrenbacher L, et al. Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer. *N Engl J Med* 2010 Jun;362(22):2053–65.
- [11] Prat A, Saura C, Pascual T, Hernando C, Muñoz M, Paré L, et al. Ribociclib plus letrozole versus chemotherapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative, luminal B breast cancer (CORALLEN): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(1):33–43 2020 Jan.
- [12] Adamo B, Bellet M, Paré L, Pascual T, Vidal M, Pérez Fidalgo JA, et al. Oral metronomic vinorelbine combined with endocrine therapy in hormone receptor-positive HER2-negative breast cancer: SOLTI-1501 VENTANA window of opportunity trial. *Breast Cancer Res* 2019;18:21(1):108.
- [13] Llombart-Cussac A, Cortes J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(4):545–54.
- [14] Prat A, Ortega V, Villagrana P, Paré L, Galván P, Oliveira M, et al. Abstract P1-09-09: Efficacy and gene expression results from SOLTI1007 NEOERIBULIN phase II clinical trial in HER2-negative early breast cancer. *Cancer Res* 2017 Feb;77(4 Supplement) P1-09-09.
- [15] Lecomte S, Demay F, Pham TH, Moulis S, Efstathiou T, Chalmel F, et al. Deciphering the molecular mechanisms sustaining the estrogenic activity of the two major dietary compounds zearalenone and apigenin in ER-positive breast cancer cell lines. *Nutrients* 2019 Jan;11(2).
- [16] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Apr;98(9):5116–21.
- [17] Finlay-Schultz J, Gillen AE, Brechbuhl HM, Ivie JJ, Matthews SB, Jacobsen BM, et al. Breast cancer suppression by progesterone receptors is mediated by their modulation of estrogen receptors and RNA polymerase III. *Cancer Res* 2017 Sep;77(18):4934–46.
- [18] Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, et al. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 2004;24(16):7260–74 Aug.
- [19] Prest SJ, May FEB, Westley BR. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J* 2002;16(6):592–4 Apr.
- [20] Miller WR, Larionov AA, Renshaw L, Anderson TJ, White S, Murray J, et al. Changes in breast cancer transcriptional profiles after treatment with the aromatase inhibitor, letrozole. *Pharmacogenet Genom* 2007;17(10):813–26 Oct.
- [21] Stender JD, Frasier J, Komm B, Chang KCN, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen-regulated gene networks in human breast cancer cells: involvement of E2F1 in the regulation of cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2007 Sep;21(9):2112–23.
- [22] Dunbier AK, Anderson H, Ghazoui Z, Folkard EJ, A'hern R, Crowder RJ, et al. Relationship between plasma estradiol levels and estrogen-responsive gene expression in estrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women. *J Clin Oncol* 2010 Mar;28(7):1161–7.
- [23] Brasó-Maristany F, Griguolo G, Pascual T, Paré L, Nuciforo P, Llombart-Cussac A, et al. Phenotypic changes of HER2-positive breast cancer during and after dual HER2 blockade. *Nat Commun* 2020 Jan;11(1):385.

- [24] Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 1978 Nov;103(5):1742–51.
- [25] Enomoto Y, Morimoto T, Nishimukai A, Higuchi T, Yanai A, Miyagawa Y, et al. Impact of biomarker changes during neoadjuvant chemotherapy for clinical response in patients with residual breast cancers. *Int J Clin Oncol* 2016;21(2):254–61 Apr.
- [26] Ishiguro H, Masuda N, Sato N, Higaki K, Morimoto T, Yanagita Y, et al. A randomized study comparing docetaxel/cyclophosphamide (TC), 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide (FEC) followed by TC, and TC followed by FEC for patients with hormone receptor-positive HER2-negative primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2020;180(3):715–24 Apr.
- [27] Iwata H, Sato N, Masuda N, Nakamura S, Yamamoto N, Kuroi K, et al. Docetaxel followed by fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy for patients with primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2011 Jul;41(7):867–75.
- [28] Kim HJ, Noh WC, Lee ES, Jung YS, Kim LS, Han W, et al. Efficacy of neoadjuvant endocrine therapy compared with neoadjuvant chemotherapy in premenopausal patients with oestrogen receptor-positive and HER2-negative, lymph node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* 2020 May;22(1):54.
- [29] von Minckwitz G, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III GeparQuattro study. *J Clin Oncol* 2010 Apr;28(12):2015–23.
- [30] Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer J-U, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 2005 Aug;23(22):5108–16.
- [31] Colleoni M, Sun Z, Martinelli G, Basser RL, Coates AS, Gelber RD, et al. The effect of endocrine responsiveness on high-risk breast cancer treated with dose-intensive chemotherapy: results of International Breast Cancer Study Group Trial 15-95 after prolonged follow-up. *Ann Oncol* 2009 Aug;20(8):1344–51.
- [32] Swain SM, Jeong J-H, Wolmark N. Amenorrhea from breast cancer therapy—not a matter of dose. *N Engl J Med* 2010 Dec;363(23):2268–70.
- [33] LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group, Cuzick J, Ambroisine L, Davidson N, Jakesz R, Kaufmann M, et al. Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. *Lancet* 2007 May;369(9574):1711–23.
- [34] Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, Paskett ED, Naftalis EZ, Singletary SE, et al. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *J Clin Oncol* 2006 Mar;24(7):1045–51.
- [35] Kim H-A, Lee JW, Nam SJ, Park B-W, Im S-A, Lee ES, et al. Adding ovarian suppression to tamoxifen for premenopausal breast cancer: a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2020 Feb;38(5):434–43.
- [36] Francis PA, Pagani O, Fleming GF, Walley BA, Colleoni M, Láng I, et al. Tailoring adjuvant endocrine therapy for premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2018 Jul;379(2):122–37.
- [37] Conforti A, Schettini F, Vallone R, Di Rella F, De Rosa P, De Santo I, et al. Unexpected ovarian activity in premenopausal breast cancer survivors treated with exemestane and GnRH analogues. *Breast J* 2019 Nov;25(6):1310–1.
- [38] Dellapasqua S, Gray KP, Munzone E, Rubino D, Gianni L, Johansson H, et al. Neoadjuvant degarelix versus triptorelin in premenopausal patients who receive letrozole for locally advanced endocrine-responsive breast cancer: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2019 Feb;37(5):386–95.

**Supplementary table 1.** Clinicopathological characteristics of patients included in different cohorts.

TRIAL/COHORT	CORALLEN TRIAL	VENTANA TRIAL	NEOERIBULIN TRIAL	PAMELA TRIAL	NEOHER COHORT
DESCRIPTION	Neoadjuvant, randomized Phase II trial. HR-positive, HER2-negative (PAM50-Luminal B)	Neoadjuvant, phase II trial. HR-positive, HER2-negative	Neoadjuvant, phase II trial. HR-positive, HER2-negative	Neoadjuvant, phase II Trial. HR-positive/negative, HER2-positive	Retrospective Cohort (Hospital Clinic of Barcelona). HR-positive/negative, HER2-positive
PATIENTS INCLUDED	6 months of neoadjuvant chemotherapy and 6 months of ribociclib plus letrozol	3 weeks of letrozol	4 cycles of Eribulin every 21 weeks	Lapatinib + trastuzumab +/- hormone therapy if HR-positive	6 months of neoadjuvant chemotherapy + anti-HER2 therapy (trastuzumab +/- pertuzumab)
MENOPASUAL STATUS	Post menopausal; CHT arm (n= 48), Ribo + letrozol arm (n=48)	Post menopausal (n=20)	Pre-menopausal (n=35) and Post-menopausal (n=48)	Pre-menopausal/HR-positive(n=20); Pre-menopausal/HR-negative (n=23); Post-menopausal/HR-positive (n=17); Post-menopausal/HR-negative (n=48)	Pre-menopausal/HR-positive(n=15); Pre-menopausal/HR-negative (n=6); Post-menopausal/HR-positive (n=38); Post-menopausal/HR-negative (n=14)
SAMPLES ANALYZED	Pre- treatment (SCR) and Post-treatment (SUR)	Pre- treatment (SCR) and Post-treatment (SUR)	Pre- treatment (SCR) and Post-treatment (SUR)	Pre- treatment (SCR) and after 2 weeks of treatment (week 2)	Pre- treatment (SCR) and Post-treatment (SUR)
CODESED USED	Breast Cancer 360	Breast Cancer 360	custom made 545-gene panel	custom made 560-gene panel	custom made 60-gene panel

## Supplementary information

All the gene expression data included in the analysis (gene panels and raw data) is available at the following link in the *Appendix. Supplementary material* section.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396421002449?via%3Dihub>



## TERCER ARTÍCULO – NO PUBLICADO

---

**Gene expression profiling and immune response following neoadjuvant ribociclib plus letrozole versus chemotherapy in Luminal B early breast cancer: a correlative analysis of the SOLTI-1402/CORALLEEN phase 2 randomized trial**

Trabajo no publicado

## RESUMEN DEL TERCER ARTICULO

Con la aprobación de los inhibidores de CDK4/6 (iCDK4/6) en combinación con endocrinoterapia (ET) en cáncer de mama metastásico RRHH positivo (RRHH+) /HER2-negativo (HER2-) y con los resultados contradictorios observados en el contexto adyuvante, se ha buscado comprender el efecto biológico que estos fármacos generan sobre las células tumorales. Diversos estudios han observado el efecto anti proliferativo de los iCDK4/6 sobre las células tumorales, ya sea con la disminución de Ki67 o a nivel molecular con la infra regulación de genes implicados en el ciclo celular. Recientemente, se ha observado que el tratamiento con iCDK4/6 puede llegar a tener, también, implicaciones en la regulación del sistema inmunológico. Comprender mejor el efecto biológico inducido por los iCDK4/6 sobre la célula y el microambiente tumoral es esencial para poder realizar una mejor selección de los pacientes y explorar nuevas indicaciones de esta terapia. En este trabajo se realizó un análisis de expresión génica, así como del microambiente tumoral de muestras de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz RRHH+/HER2-, Luminal B por Prosigna que recibieron tratamiento durante 24 semanas con ribociclib más letrozol o quimioterapia incluidas en el ensayo clínico fase II CORALLEEN. Se observó que el tratamiento con ribociclib más letrozol indujo una mayor infra regulación de genes relacionados con proliferación tanto en las muestras determinadas a día 14 ( $\pm 2$ ) como a la cirugía (ej. *PGR*, *CDK1* y *MKI67*). Cuando se exploró la expresión de genes inmunes, se observó un aumento de la expresión de los genes implicados en la regulación inmunológica posterior a 24 semanas de tratamiento tanto en el brazo de ribociclib más letrozol como en el de quimioterapia (ej. *CD8A*, *PD1*, *LAG3* y *CD8 T-cell signature*). Curiosamente, se observó que las muestras tumorales tratadas con ribociclib más letrozol que fueron clasificadas como bajas respondedoras presentaron una mayor expresión de los genes inmunorelacionados en comparación con las altas respondedoras al contrario que las pacientes tratadas con quimioterapia. Además, también se exploró la infiltración por linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), donde se observó que las pacientes tratadas con ribociclib más letrozol que presentaron una baja respuesta al tratamiento presentaban una mayor infiltración por TILs en comparación con las que realizaron alta respuesta al tratamiento (con una media TILs de 13.4% y 7.1% en bajas y altas respondedoras en el brazo de ribociclib más letrozol respectivamente y 2.3% y 10.7% en bajas y altas respondedoras en el brazo de quimioterapia respectivamente). Todos estos datos apoyan los diferentes resultados publicados en la literatura donde los iCDK4/6 presentan un potente y precoz efecto antiproliferativo asociando, además, un efecto modulador de la inmunidad mediada por células T. Será necesario estudiar con mayor detalle la composición celular del microambiente tumoral para poder llegar a discernir el motivo por el cual existe una mayor infiltración de TILs en pacientes poco respondedoras posterior a tratamiento con ribociclib más letrozol. Este trabajo abre la puerta a poder seguir avanzando en el conocimiento biológico de los iCDK4/6 en ámbito precoz y poder llegar a encontrar biomarcadores que en un futuro ayuden a seleccionar que pacientes se podrán beneficiar de un tratamiento dirigido con iCDK4/6 en lugar de quimioterapia.

## Gene expression profiling and immune response following neoadjuvant ribociclib plus letrozole versus chemotherapy in Luminal B early breast cancer: a correlative analysis of the SOLTI-1402/CORALLEEN phase 2 randomized trial

### INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de CDK4/6 (iCDK4/6) en combinación con endocrinoterapia (ET) se han convertido en el tratamiento de elección para pacientes diagnosticadas de cáncer de mama receptor hormonal positivo (RRHH+) /HER2 negativo (HER2-)<sup>1,2</sup>. El beneficio observado tanto en supervivencia libre de progresión (SLP) como en supervivencia global (SG) han permitido retrasar el inicio de quimioterapia incluso en tumores de alto riesgo, provocando un claro aumento en calidad de vida<sup>3-6</sup>.

El gran beneficio reportado por los diferentes ensayos clínicos en cáncer de mama RRHH+/HER2-metastásico ocasionó que se explorara esta combinación en estadios precoces. En adyuvancia, cuatro ensayos clínicos fase III valoraron la combinación de diferentes iCDK4/6 más ET con resultados contradictorios. Mientras que los estudios realizados con palbociclib no reportaron un beneficio con la adición del iCDK4/6 al tratamiento adyuvante<sup>7,8</sup>, si lo observaron los ensayos que utilizaron abemaciclib y ribociclib, con un beneficio en cuanto a supervivencia libre de enfermedad invasiva (SLEi) del 6% y 3% a 4 y 3 años respectivamente<sup>9,10</sup>.

Esta disparidad observada en los resultados de los ensayos clínicos adyuvantes, indica que todavía es necesario comprender mejor el efecto biológico de los iCDK4/6 en estadios tempranos. Diferentes estudios traslacionales han observado un efecto antiproliferativo precoz inducido por los iCDK4/6 en células tumorales RRHH+/HER2- ya sea en monoterapia o en combinación con ET<sup>11-13</sup>. Probablemente debido a su principal mecanismo de acción, que impide la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (RB) deteniendo el ciclo celular en fase G1. Sin embargo, los iCDK4/6 pueden inducir otros efectos, ya sea sobre la célula tumoral o el microambiente, ejerciendo un efecto modulador del sistema inmune<sup>14-17</sup>.

Para poder comprender mejor el efecto inducido por los iCDK4/6 en cáncer de mama RRHH+/HER2- en estadio temprano, en este trabajo se ha realizado un estudio de expresión génica y del microambiente tumoral, en una cohorte única de pacientes incluidas en el estudio neoadyuvante fase II CORALLEEN, donde se incluyeron pacientes con diagnóstico de cáncer de mama RRHH+/HER2-, estadios I-III A, Luminal B por Prosigna, a recibir tratamiento mediante ribociclib más letrozol o quimioterapia<sup>18</sup>.

Este análisis ofrecerá la oportunidad de ampliar el conocimiento en cuanto a los efectos moleculares que inducen los iCDK4/6 tanto en las células tumorales como en el microambiente tumoral y ayudar a poder realizar una mejor selección de pacientes que podrán beneficiarse de esta combinación de tratamiento. El objetivo final es poder llegar a seleccionar, en un futuro, aquellas pacientes de alto riesgo que podrán substituir la quimioterapia por iCDK4/6 en contexto (neo)adyuvante.

## MÉTODOS

### Selección de pacientes

Se utilizaron muestras de las pacientes incluidas en del ensayo clínico fase II CORALLEEN (NCT03248427). Este estudio incluyó pacientes menopáusicas con diagnóstico de cáncer de mama RRHH+/HER2- y Luminal B por Prosigna, estadios I-III A. Las pacientes se aleatorizaron a recibir tratamiento neoadyuvante estándar mediante antraciclinas más ciclofosfamida por 4 ciclos seguido de paclitaxel semanal por 12 semanas o el tratamiento a estudio con ribociclib 600mg/24h (3 semanas si y 1 semanas de descanso) más letrozol 2,5 mg/24h continuado durante 24 semanas (Figura 1).

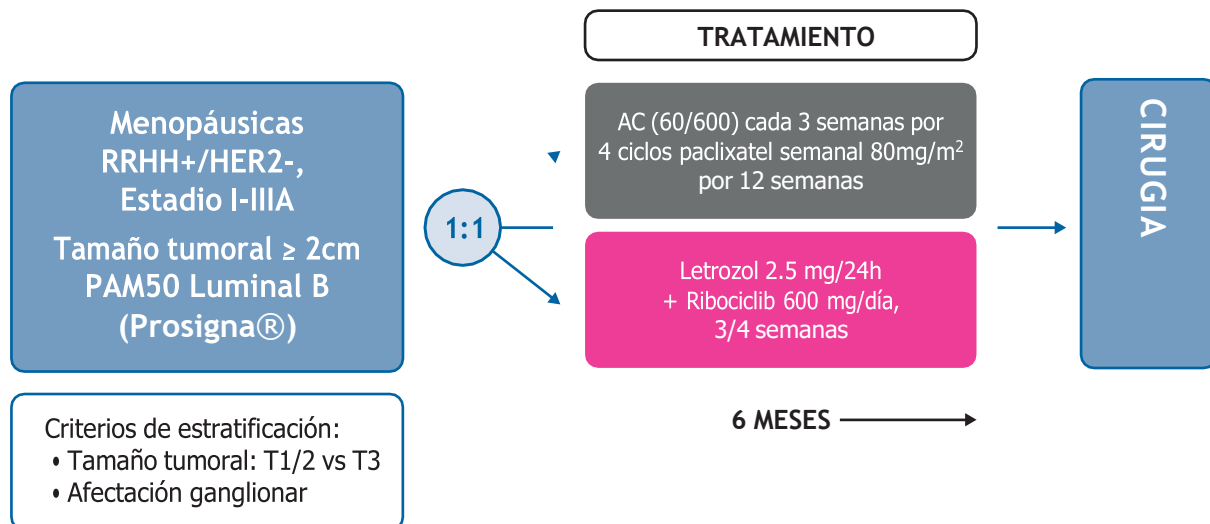


Figura 1. Diseño del estudio fase II CORALLEEN (NCT03248427).

El objetivo primario del estudio fue evaluar el porcentaje de muestras tumorales que alcanzaron un *Risk of Recurrence score* (ROR score), determinado por Prosigna, de bajo riesgo en la muestra quirúrgica posterior a recibir 24 semanas de tratamiento en los dos brazos.

El estudio fue aprobado por los diferentes comités de ética y las pacientes firmaron consentimiento informado previo a la inclusión. Los resultados del estudio y las características de éste han sido previamente reportados<sup>18</sup>.

### Selección de muestras tumorales

Se realizó la obtención de muestras tumorales previo a la aleatorización (en la inclusión de la paciente en el ensayo) y por tanto previa al tratamiento (SCR), la segunda muestra se obtuvo a los 14 días del inicio del tratamiento (D14) y finalmente a la cirugía (CIR). Una parte del tejido tumoral fijado en formol y embebido en parafina (FFPE) de los 3 momentos fue enviada al Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) al Laboratorio de *Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors*, donde se realizó toda la investigación traslacional.



Una vez las muestras fueron recibidas, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (H/E) para confirmar que las muestras tumorales presentaban  $\geq 10\%$  de células de tumor invasivo y determinar la superficie mínima tumoral ( $10 \text{ mm}^2$ ).

### Determinación de linfocitos infiltrantes de tumor estromales (sTILs)

---

La determinación de los sTILs, al inicio del estudio, a D14 y a CIR en los dos brazos de tratamiento, fue evaluada de forma centralizada en las muestras obtenidas mediante tinción de H/E según las guías establecidas por el *International TILs Working Group*<sup>19</sup>.

### Análisis de expresión génica

---

Se realizó la extracción de ARN de las muestras de FFPE tumorales al SCR, a D14 y a CIR, mediante el kit de aislamiento de ARN High Pure FFPE (Roche®, Indianapolis, IN, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron al menos  $\geq 1-5$  láminas FFPE de  $10 \mu\text{m}$  por cada muestra de tumor y se realizó microdissección si era necesario para evitar contaminación con tejido no tumoral. Para realizar la expresión génica, se utilizó un mínimo de  $\sim 100 \text{ ng}$  de ARN total.

La expresión génica de las muestras FFPE de tumor fue analizando mediante la plataforma nCounter (Nanonstring Technologies, Seattle, WA, USA). Se realizó la expresión de un total de 770 genes y 30 firmas biológicas implicadas en diferentes procesos del cáncer de mama mediante el panel BreastCancer360®. Los datos fueron normalizados utilizando los cinco genes de referencia housekeeping (*ACTB*, *MRPL19*, *PSMC4*, *RPLP0*, *SF3A1*) y fueron transformados a  $\log_2$ . Los datos de expresión fueron normalizados utilizando el software nSolver 4.0 y se utilizó scripts personalizados utilizando el software R versión 3.5.1.

### Análisis estadístico

---

Para los diferentes análisis realizados se exploraron diferentes definiciones de respuesta: ROR score de bajo riesgo a la cirugía (en comparación con ROR score riesgo intermedio y alto), RCB 0-I a la cirugía (en comparación con RCB II-III), PEPI score a la cirugía, respuesta por imagen ya sea parcial o completa (prueba realizada posterior al tratamiento neoadyuvante y previa a la cirugía) y descenso relativo en los cambios de ROR score (se definieron los tumores como altos y bajos respondedores en función del descenso  $\geq 50$  y  $< 50$  en el descenso relativo del ROR score respectivamente).

La asociación entre dos variables fue evaluada usando la prueba  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher. La prueba de ANOVA fue realizada para observar diferencias entre expresión en los diferentes genes. Se utilizó un análisis de microarrays (SAM del inglés *Significance Analysis of Microarrays*) de dos clases con una tasa de descubrimientos falsos (FDR del inglés *False Discovery Rate*) del  $< 5\%$  para identificar la expresión diferencial de genes entre las muestras FFPE en los diferentes momentos y entre las variables clínicas en los diferentes brazos de tratamiento. Las pruebas de interacción entre cada variable y la respuesta ROR del tumor (es decir, la disminución en relación con la puntuación del ROR score) según el tratamiento realizado se exploraron mediante modelos de regresión logística. Toda la estadística fue realizada mediante el software R versión 3.5.1.

## RESULTADOS

Un total de 106 pacientes fueron incluidas y aleatorizadas en el ensayo clínico fase II CORALLEEN (NCT03248427), 52 pacientes en el brazo de ribociclib más letrozol (R+L) y 54 en el brazo de poliquimioterapia (QT). Las características clínico-patológicas de las pacientes incluidas se encuentran descritas en la **Tabla 1** (para más información en relación con los datos basales de las pacientes incluidas tomar de referencia la publicación: Prat et al.; *Lancet Oncol.*, 2020).

CARACTERÍSTICAS, n (%)	QT (n=54)	R+L (n=52)
Edad media años (rango)	64 (49-79)	63 (50-78)
Tamaño tumoral (%)		
cT1	10 (5.5%)	10 (5.8%)
cT2	43 (79.6%)	40 (76.9%)
cT3	8 (14.8%)	9 (17.3%)
Afectación axilar (%)		
cN0	31 (57.4%)	31 (59.6%)
cN1	22 (40.8%)	19 (36.6%)
cN2	1 (1.8%)	2 (3.8%)
Ki67 mediana (rango)	35 % (12-70%)	30 % (5-75%)
Media ROR score (rango)	77 (51-97)	70 (52-93)
Clasificación ROR score (%)		
Intermedio	6 (11.1%)	8 (15.4%)
Alto	48 (88.9%)	44 (84.6%)

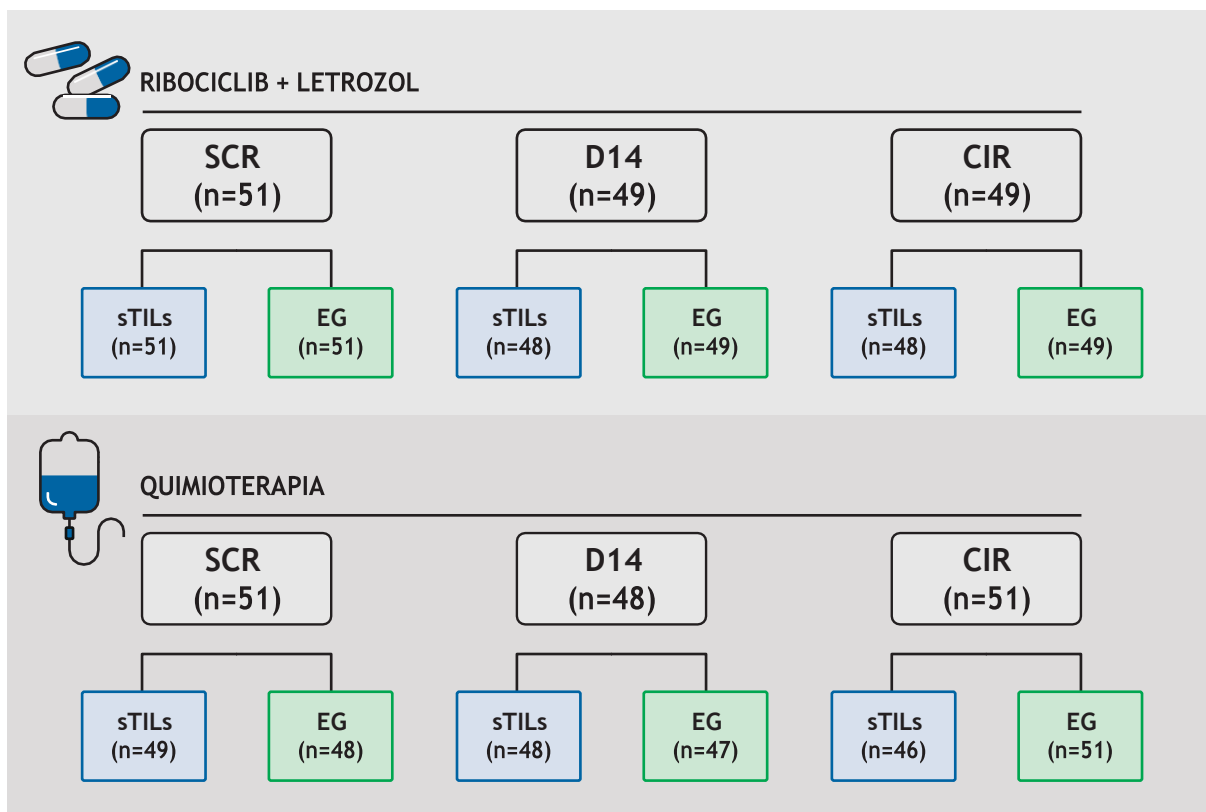
**Tabla 1.** Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en el estudio. QT= Brazo de tratamiento con quimioterapia; R+L= brazo de tratamiento con ribociclib más letrozol.

La distribución del total de muestras disponibles para realizar los análisis tanto de determinación de sTILs como de análisis de expresión génica (EG) en los 3 momentos (SCR, D14 y CIR) y en los dos brazos de tratamiento (R+L y QT) se encuentra representada en la **Figura 2**.

De las 52 pacientes aleatorizadas al brazo de R+L estuvieron disponibles para el análisis traslacional 51/52 muestras a SCR, 49/52 a D14 y 49/52 a CIR y de las 54 pacientes aleatorizadas a tratamiento con QT fueron las siguientes 51/54 al SCR, 48/54 a D14 y 51/54 a CIR.

Del total de muestras de pacientes incluidas en el estudio, en el brazo de R+L se dispuso del 100% de las muestras tanto para sTILs como para EG (51/51) a SCR y prácticamente el 100% a D14 (48/49 para determinación de sTILs y 49/49 para EG) y a CIR (48/49 para determinación de sTILs y 49/49 para EG). En el brazo de QT el 96% (49/51) de las muestras estuvieron disponibles en el SCR para

determinación de sTILs y el 94% (48/51) para EG, prácticamente el 100% estuvieron disponibles a D14 (48/48 en la determinación de sTILs y 47/48 en el brazo de EG). Finalmente, a la CIR, se realizó la determinación de sTILs en el 90% (46/51) de las muestras y determinación de EG en el 100% (51/51).



**Figura 2.** Distribución de las muestras disponibles en cada brazo de tratamiento y en cada momento de obtención de muestra, tanto para realizar determinación de sTILs como EG.  
sTILs = Infiltración de linfocitos tumorales estromales  
EG = Expresión génica.

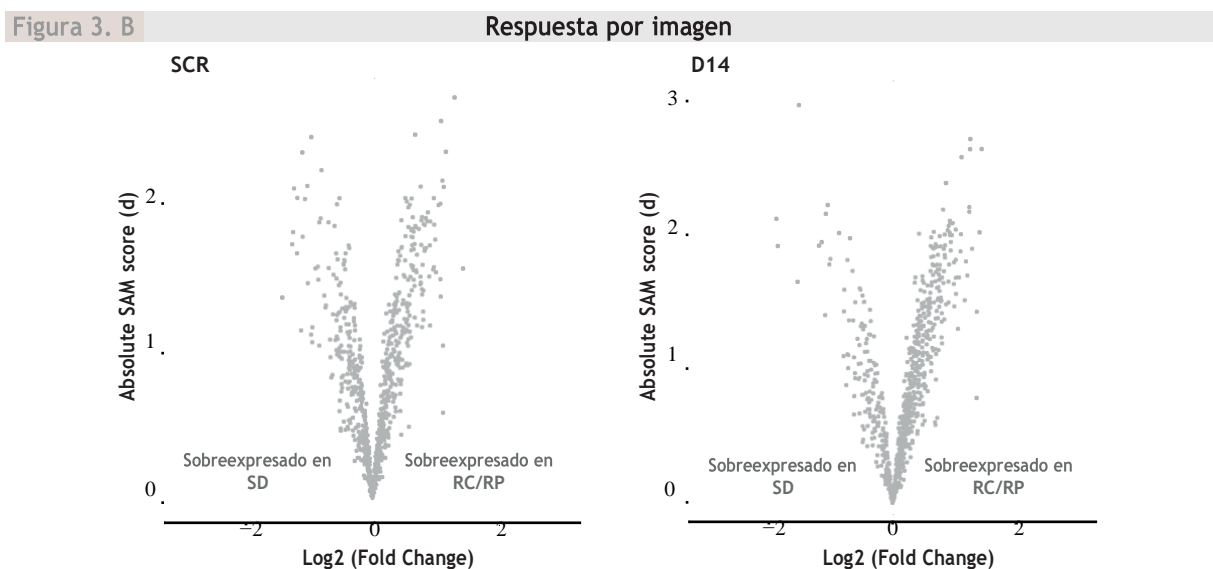
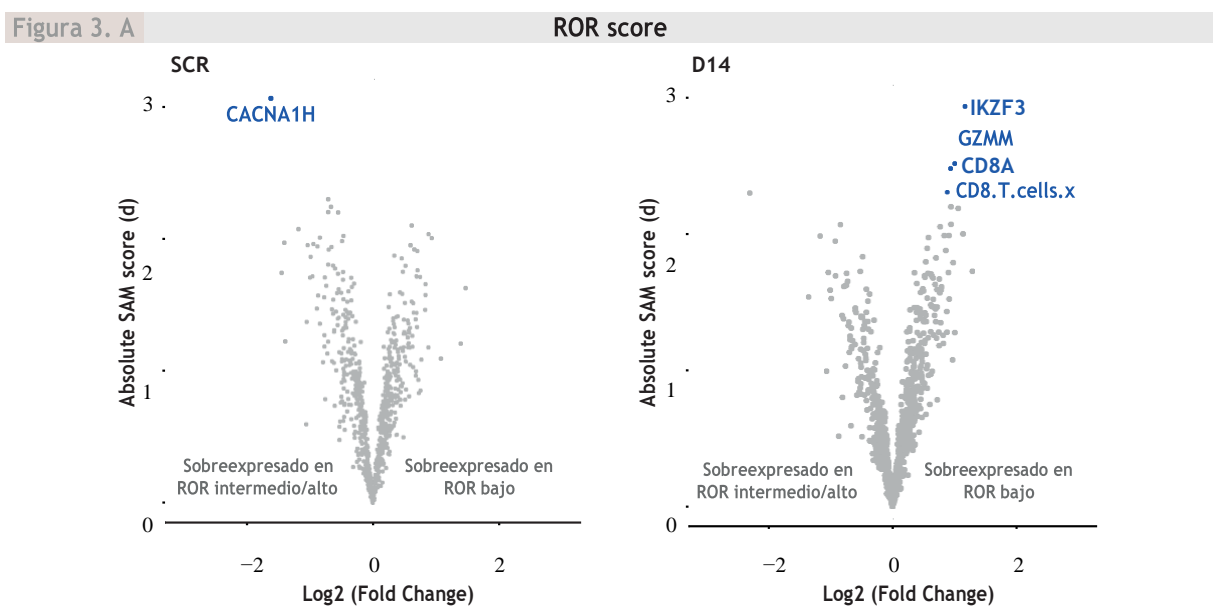
## Perfil de expresión génica

Las muestras disponibles para el análisis de EG por brazo de tratamiento se encuentran descritas en la **Figura 2**. Primero se valoró si de los diferentes genes y firmas génicas exploradas en este trabajo, determinados a SCR o a D14, estaba relacionada con respuesta a CIR en el brazo de R+L. Para ello se analizaron las diferentes definiciones de respuesta descritas previamente: RCB 0-I, respuesta por imagen (Respuesta completa y/o respuesta parcial), PEPI score de 0-1, ROR score bajo y descenso relativo del ROR score  $\geq 50$ .

La determinación del RCB no se pudo explorar ya que únicamente 3 muestras en toda la cohorte tratada con R+L presentaron un RCB 0-I a la cirugía. Posteriormente se exploraron las diferentes definiciones propuestas de respuesta, tanto la respuesta por imagen como la determinación del PEPI score no observaron genes diferencialmente expresados ni a SCR ni a D14 de tratamiento que estuvieran relacionados con respuesta a CIR. La determinación del ROR score a D14 observó

la sobreexpresión de diferentes genes/firmas inmunes relacionadas implicadas con células T y B (*IKZF3*, *GZMM*, *CD8* y la firma *CD8 células T*) en las muestras clasificadas como ROR score bajo a CIR (Figura 3).

Finalmente, al explorar el descenso relativo de ROR score, se observó que existían 8 genes desregulados y relacionados con respuesta a CIR cuando se determinaba a SCR. En concreto se observó una sobreexpresión de *BCL2*, *APOE* y *WT1* en el grupo de bajo respondedores, genes que ya han sido previamente descritos como genes de mal pronóstico en cáncer. En el mismo grupo a



D14 se encontraron 3 genes desregulados, 2 sobreexpresados en tumores clasificados como bajo respondedores: *S100B* y *EFNA3*, genes relacionados con mal pronóstico en diversos tumores y 1 sobreexpresado en altos respondedores *AGRT1* (Figura 3D).

Posteriormente, se quiso determinar el efecto generado por los dos tipos de tratamiento sobre las muestras tumorales. Para ello, se obtuvieron las muestras de los dos brazos de tratamiento a D14 y a CIR. Se observó que a D14, 146 (14.6%) de los genes o firmas se encontraron significativamente sobreexpresadas (n=47) o infraexpresadas (n=99) en el brazo de R+L en comparación con el brazo de QT. En concreto, el brazo de R+L se observó una alta expresión de genes relacionados con el daño y reparación del ADN, así como genes relacionados con activación inmunológica (como *TP53*, *RAD52*, *GZMM* and *CD19*). Además, se observó una baja expresión de genes relacionados con el ciclo celular y genes con la vía hormonal (como *PGR*, *CDK1* y *MKI67*) (Figura 4).

Figura 3. C PEPI score

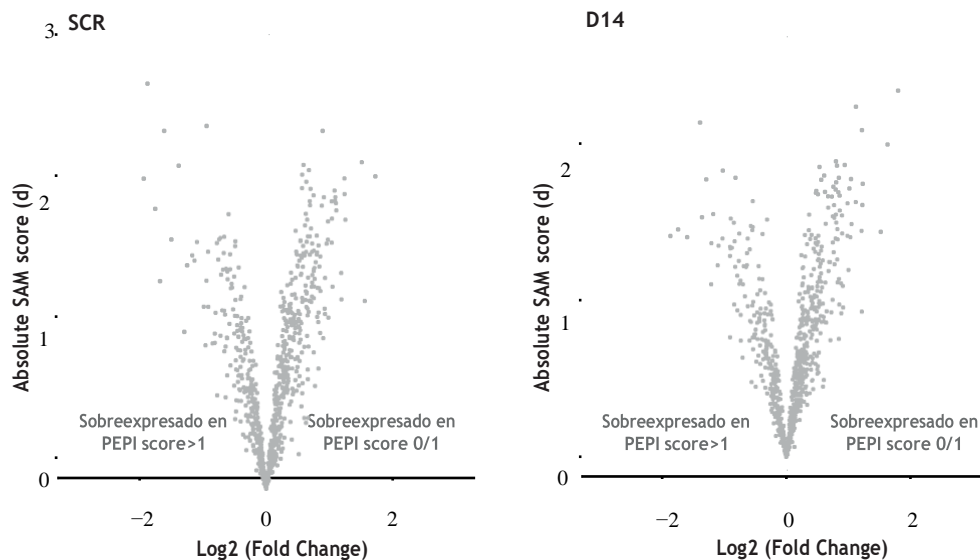


Figura 3. D RELATIVE ROR SCORE

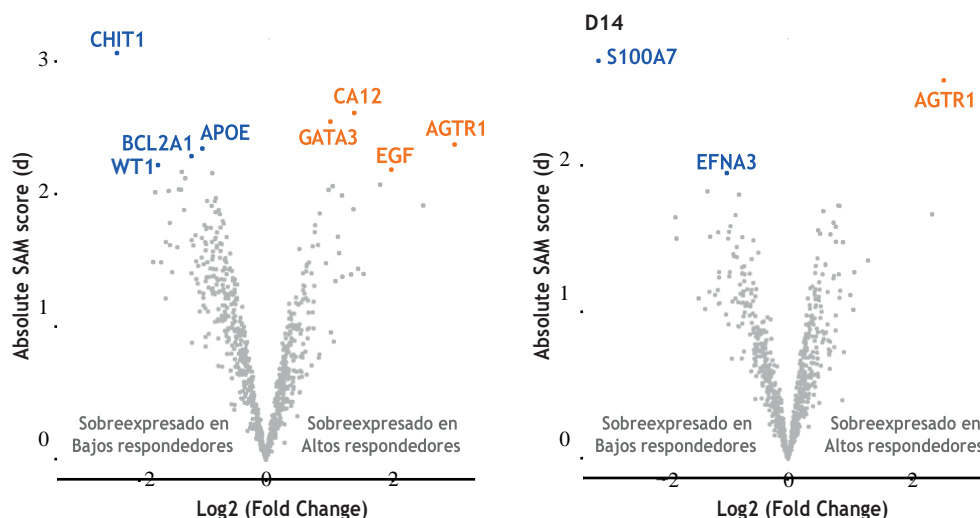
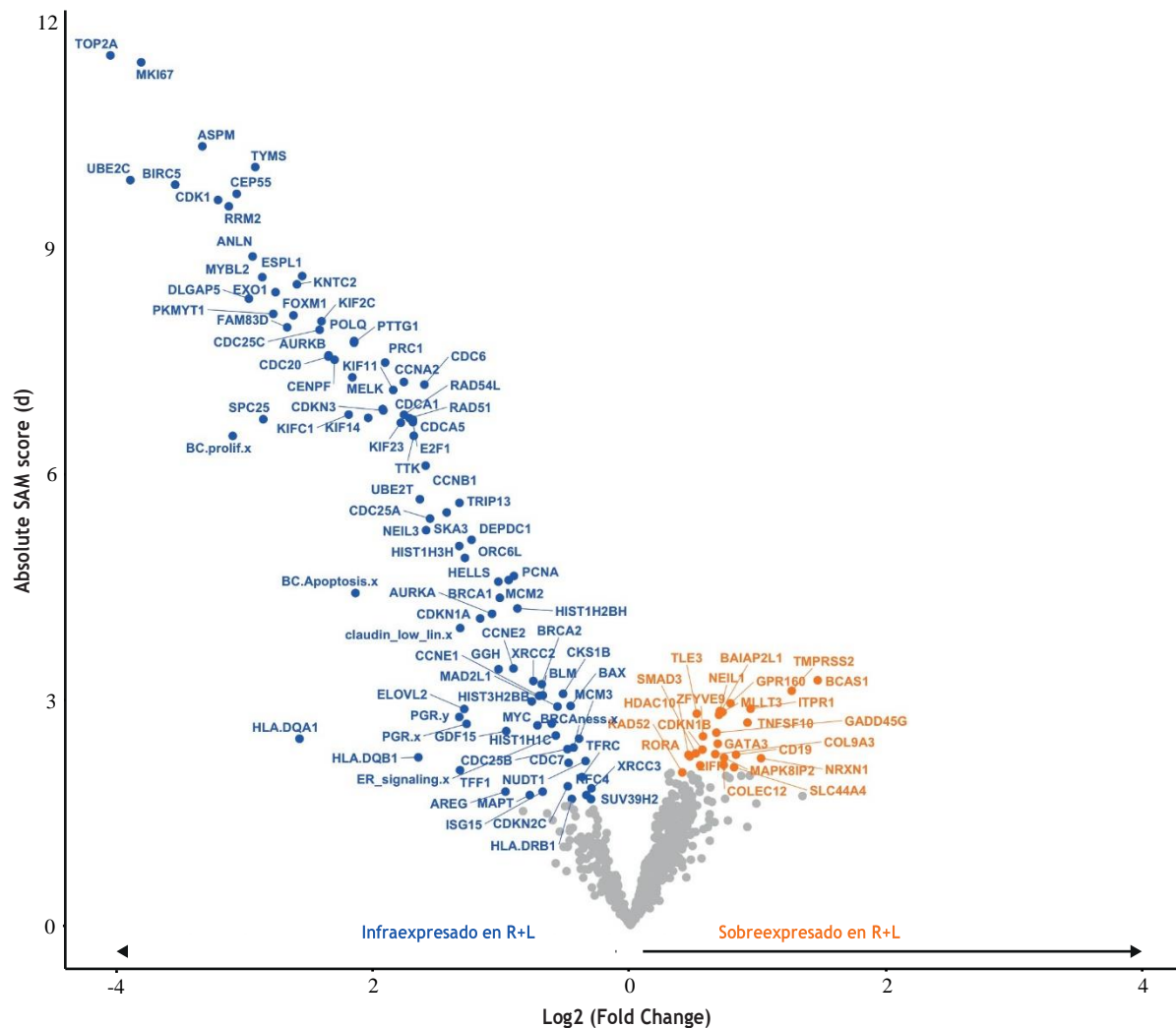
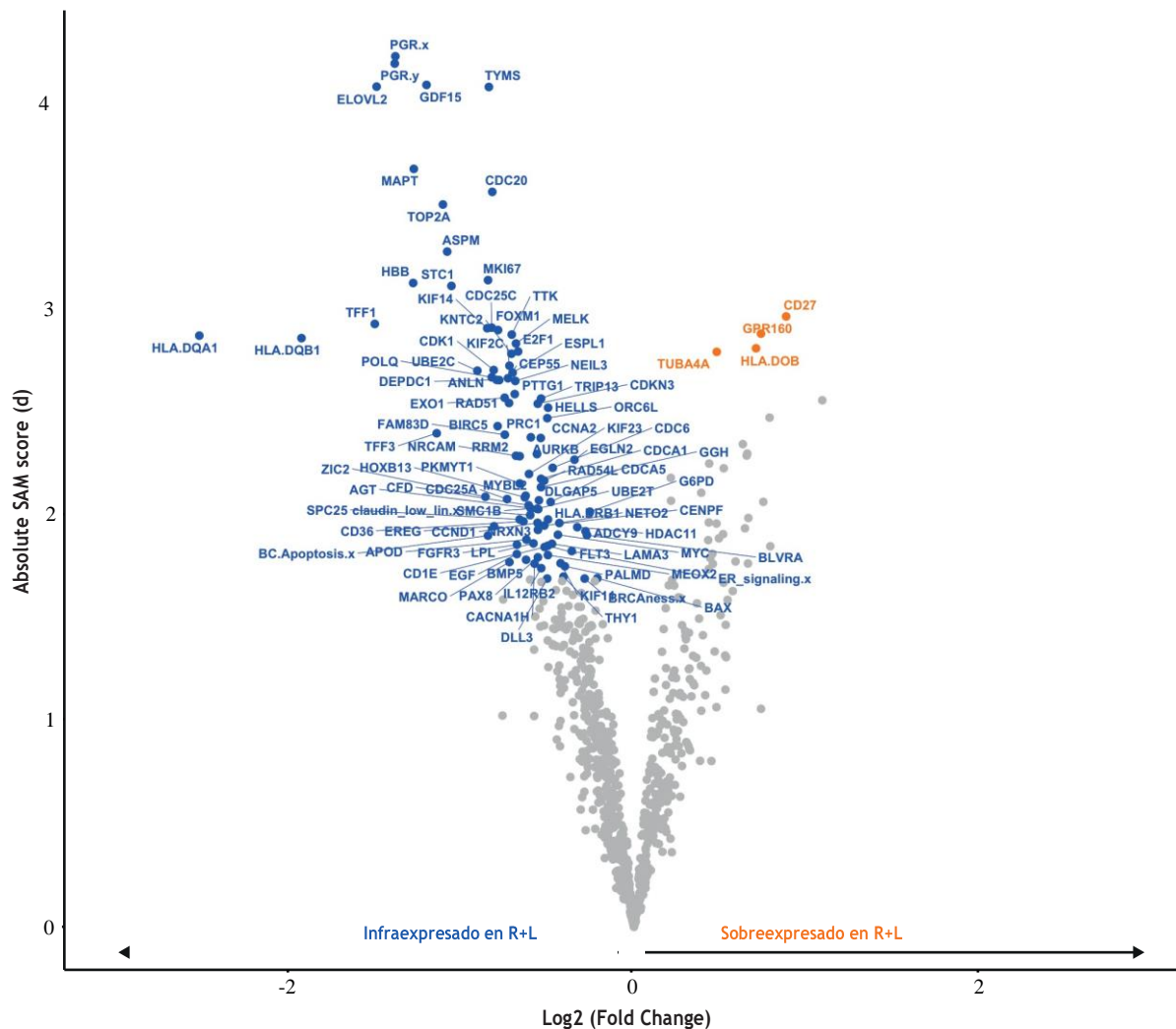


Figura 3. Expresión diferencial de los diferentes genes y firmas génicas en función de la definición de respuesta utilizada a SCR y D14 en el brazo de R+L. A. ROR score a cirugía (considerando respuesta ROR score bajo y no respuesta ROR score intermedio y alto). B. Respuesta por imagen (considerando respuesta como respuesta completa o respuesta parcial y no respuesta estabilidad). C. PEPI score (considerando respuesta PEPI score 0-1 no respuesta PEPI score >1). D. Descenso relativo del ROR score (considerando respuesta descenso  $\geq 50$  y no respuesta un descenso  $< 50$ ).



Expresión disminuida en R+L a D14	Expresión aumentada en R+L a D14	Expresión disminuida en R+L a D14	Expresión aumentada en R+L a D14
<i>TOP2A</i>	<i>BCAS1</i>	<i>ESPL1</i>	<i>ZFYVE9</i>
<i>MK167</i>	<i>TMPRSS2</i>	<i>MYBL2</i>	<i>GATA3</i>
<i>ASPM</i>	<i>GPR160</i>	<i>KNTC2</i>	<i>CDKN1B</i>
<i>TYMS</i>	<i>ITPR1</i>	<i>EXO1</i>	<i>SMAD3</i>
<i>UBE2C</i>	<i>NEIL1</i>	<i>DLGAP5</i>	<i>COL9A3</i>
<i>BIRC5</i>	<i>MILLT3</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>CD19</i>
<i>CEP55</i>	<i>TLE3</i>	<i>FOXM1</i>	<i>HDAC10</i>
<i>CDK1</i>	<i>BAIAP2L1</i>	<i>K1F2C</i>	<i>RORA</i>
<i>RRM2</i>	<i>TNFSF10</i>	<i>FAM83D</i>	<i>BCAS1</i>
<i>ANLN</i>	<i>GADD45G</i>		

Figura 4. Expresión diferencial de los diferentes genes y firmas génicas en las muestras tumorales en el brazo de tratamiento con R+L y QT a D14 y tabla con los top 20 genes diferencialmente expresados.



Expresión disminuida en R+L a CIR	Expresión aumentada en R+L a CIR	Expresión disminuida en R+L a CIR	Expresión aumentada en R+L a CIR
<i>PGR</i>	<i>CD27</i>	<i>HBB</i>	
<i>PGR signature</i>	<i>GPR160</i>	<i>STC1</i>	
<i>GDF15</i>	<i>HLA.DOB</i>	<i>TFF1</i>	
<i>ELOVL2</i>	<i>TUBA4A</i>	<i>CDC25C</i>	
<i>TYMS</i>		<i>KIF14</i>	
<i>MAPT</i>		<i>FOXM1</i>	
<i>CDC20</i>		<i>TTK</i>	
<i>TOP2A</i>		<i>HLA.DQA1</i>	
<i>ASPM</i>		<i>HLA.DQB1</i>	
<i>MKI67</i>			

Figura 5. Expresión diferencial de los diferentes genes y firmas génicas en las muestras tumorales en el brazo de tratamiento con R+L y QT a CIR y tabla con los top 20 genes diferencialmente expresados.

A la cirugía, un total de 102 (10.2%) de los genes o firmas se encontraron significativamente sobreexpresadas o infraexpresadas. En el brazo de R+L se encontraron 4 genes/firmas sobreexpresadas y 98 infraexpresadas en comparación con el brazo de quimioterapia (Figura 5). En concreto el

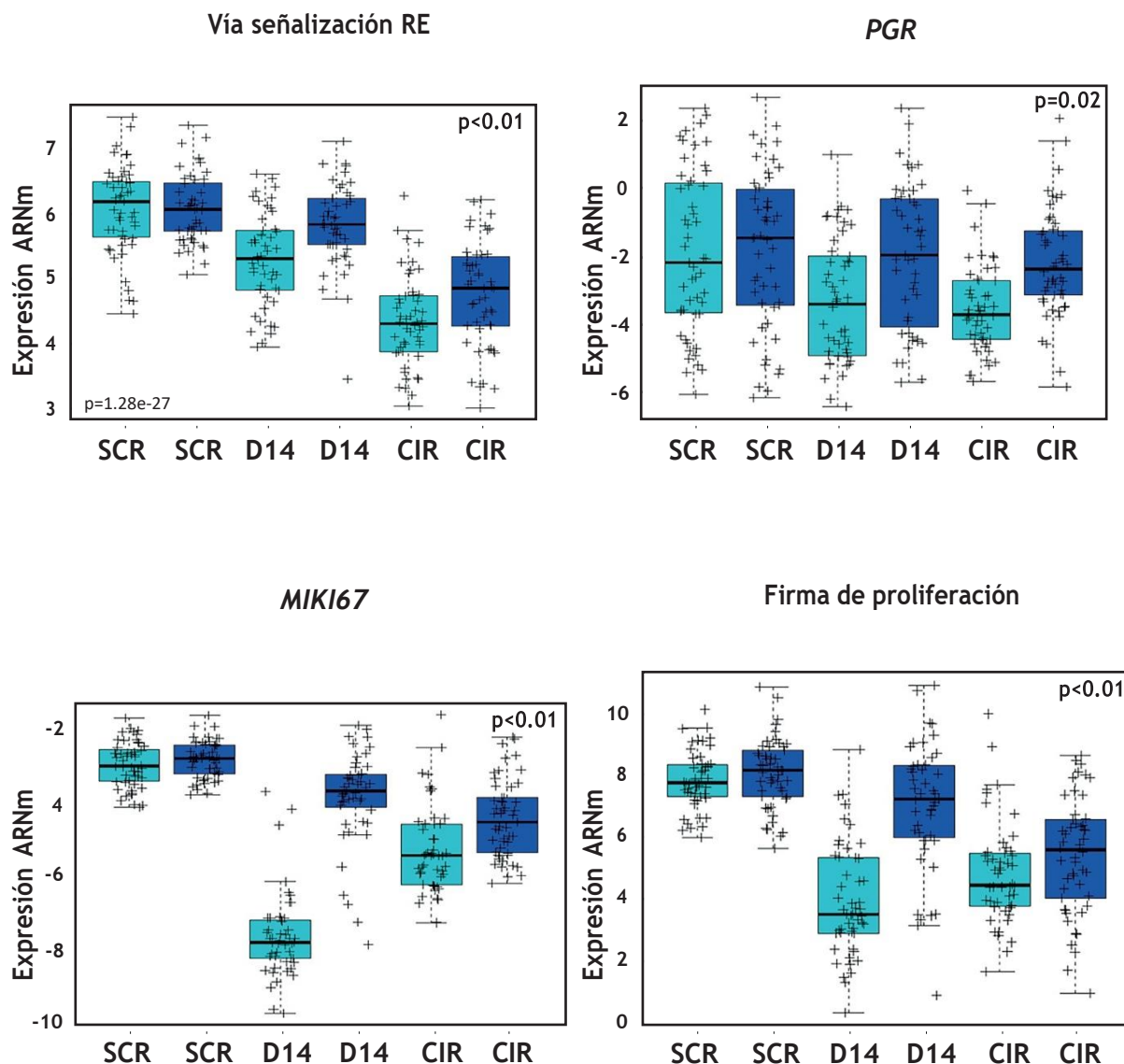


Figura 6. Selección de expresión de genes en los 3 momentos SCR = pre-tratamiento; D14= semana 2; CIR= cirugía) en los dos brazos de tratamiento (R+L = ribociclib más letrozol; QT= quimioterapia).

tratamiento con R+L se observó que inducía una disminución importante de la expresión de los genes y/o firmas relacionadas con la vía del estrógeno y proliferación (como *PGR*, *ER signaling*, and *MKI67*) (Figura 6).

### Distribución de los sTILs

La determinación de sTILs basales (a SCR en los dos brazos de tratamiento) observó que la mayoría de las muestras incluidas en el ensayo presentaron una infiltración por sTILs basales bajo ( $\leq 5\%$ ),



solo 5 muestras presentaron una infiltración por sTILs alta ( $\geq 50\%$ ).

Posteriormente, se realizó la determinación de sTILs en las muestras obtenidas a D14 y CIR en los dos brazos de tratamiento. Las muestras disponibles para realizar la determinación de sTILs ha sido descrita en la **Figura 2**.

La mediana de los sTILs fue de 5% en los 3 momentos, en los dos brazos de tratamiento, la media fue 12.1%, 7.1% y 8.2% en el brazo de R+L a SCR, D14 y CIR respectivamente y 7.1%, 5.6% y 7.4% en el brazo de QT (**Tabla 2**).

CARACTERÍSTICAS)	sTILs QT	sTILs QT
<b>Mediana % (rango)</b>		
SCR	5% (0-70)	5% (0-90)
D14	5% (0-60)	5% (0-30)
CIR	5% (0-60)	5% (1-50)
<b>Media % (rango)</b>		
SCR	12.1% (0-70)	7.1% (0-90)
D14	7.1% (0-60)	5.6% (0-30)
CIR	8.2% (1-60)	7.4% (1-50)
<b>Rango Intercuartil</b>		
SCR (Q1-Q3)	10.3% (1-12.5)	9% (1-10)
D14 (Q1 -Q3)	9% (1-10)	9% (1-10)
CIR (Q1-Q3)	9% (1-10)	9% (1-10)

**Tabla 2.** Mediana, media y rango Inter cuartil de los sTILs pretratamiento (SCR), a la semana 2 (D14) y a la cirugía (CIR) en los dos brazos de tratamiento.

Al valorar si se observaban cambios en la infiltración de sTILs posterior al tratamiento (a D14 y CIR) únicamente se observó un descenso significativo de la infiltración por sTILs en el brazo de R+L determinados a D14 respecto a SCR ( $p= 0.016$ ). No se observaron otros cambios estadísticamente significativos entre los sTILs determinados a D14 y a CIR en los dos brazos de tratamiento (**Figura 6**).

Sin embargo, si se observó que un 27.1% (13/48) de las muestras tumorales que fueron tratadas con 24 semanas de R+L presentaron  $\geq 10\%$  de infiltración por sTILs a la CIR en comparación con el 15.2% (7/46) en el brazo de QT. Además, se observó que del 27.1% de los pacientes que recibieron tratamiento con R+L con sTILs  $\geq 10\%$  a la cirugía, un 38.5% (5/13) tenían una determinación de sTILs  $< 10\%$  a nivel basal.

La distribución de sTILs también fue determinada en función de la definición de respuesta seleccionada para este trabajo, el descenso relativo de ROR score (definición en la sección de métodos). Fueron clasificadas como altas respondedoras el 63% (29/46) de las muestras tumorales tratadas con QT y el 84% (41/49) de las muestras tratadas mediante R+L.

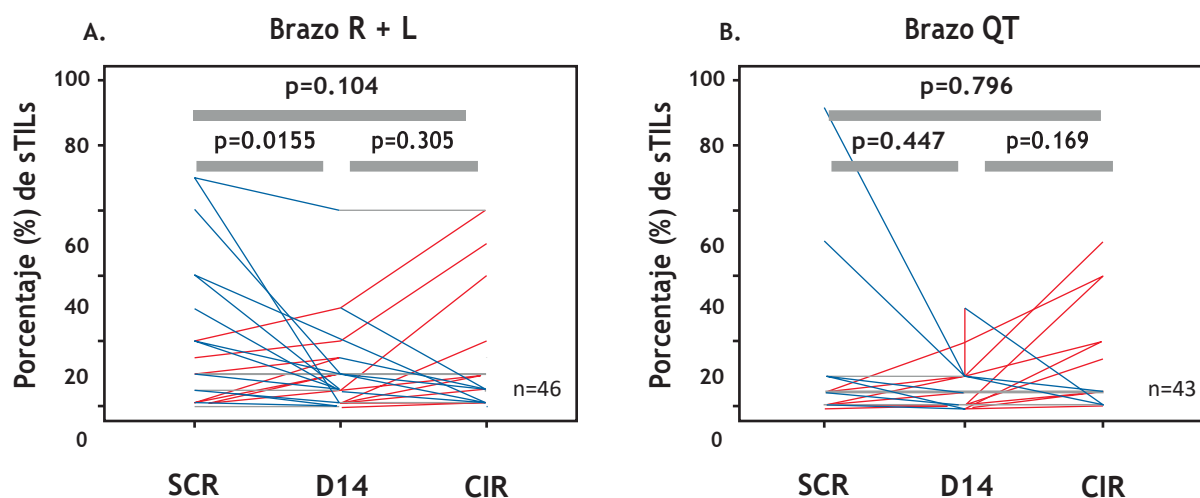


Figura 7. Distribución de sTILs en los 3 momentos (SCR = pre-tratamiento; D14= día 14; CIR= cirugía) en los 2 brazos de tratamiento. **A.** En el brazo de R+L y **B.** En el brazo de QT.

R+L = Ribociclib más letrozol (número de muestras incluidas en el análisis 46).

QT= Quimioterapia (número de muestras incluidas en el análisis 43).

Cuando se analizó el porcentaje de infiltración por sTILs en función de la respuesta realizada se observó que la media de sTILs en las muestras clasificadas como alto respondedoras fue de 10.7%

	Brazo QT (CIR n=46)	Brazo R+L (CIR n= 48)
Media sTILs en AltoR % (n)	10.7% (29)	7.1% (41)
Media sTILs en BajoR % (n)	2.3% (17)	13.4% (8)

Tabla 3. Media de sTILs entre los tumores clasificados como Altos respondedores (AltoR) y bajos respondedores (BajoR) en los dos brazos de tratamiento (R+L = ribociclib más letrozol; QT = quimioterapia).

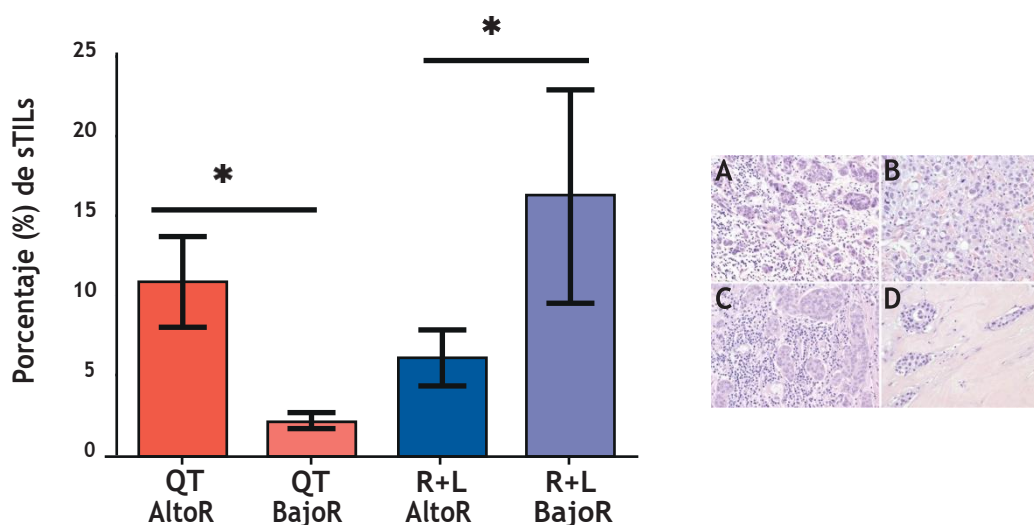


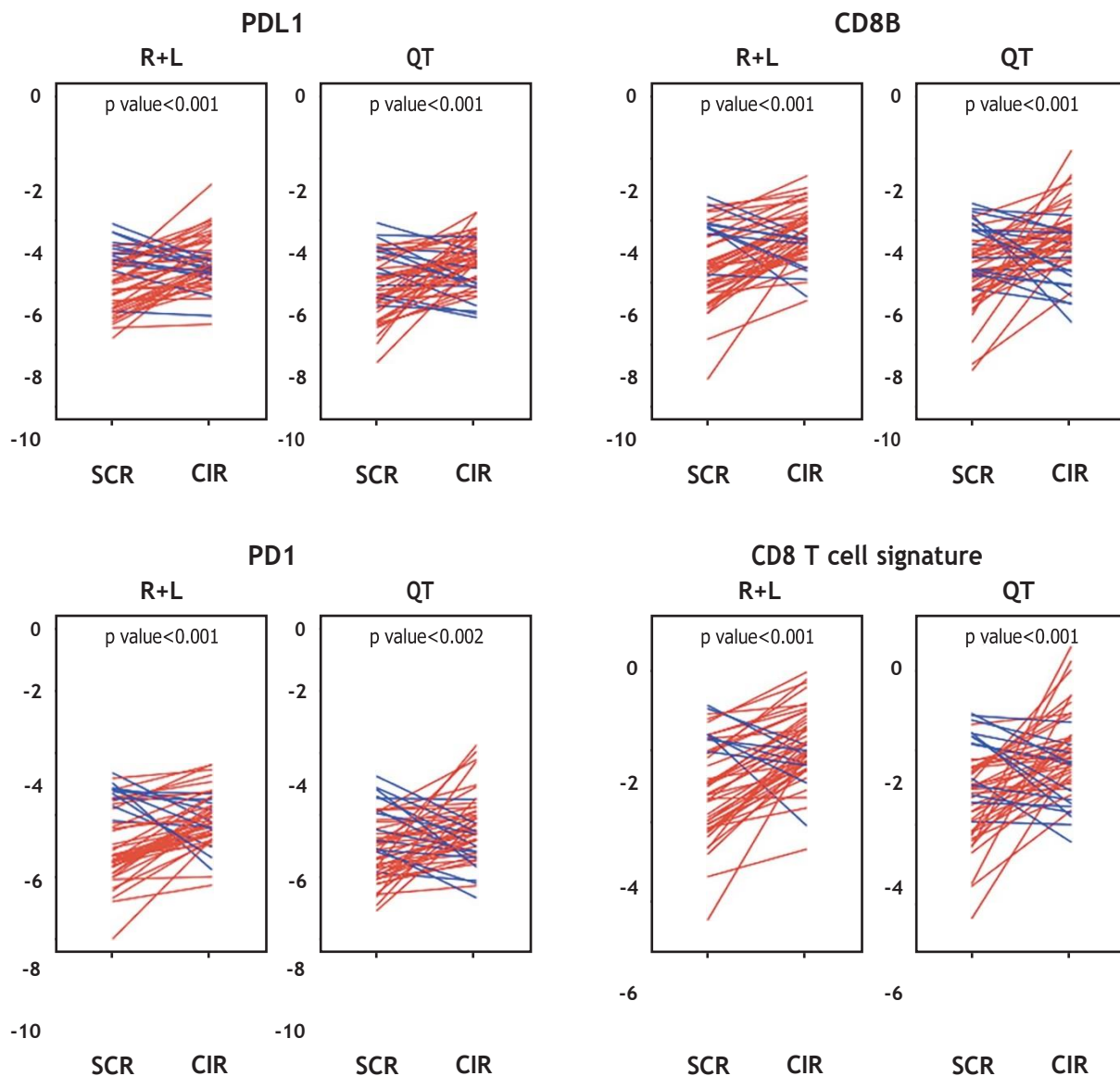
Figura 7. Infiltración por sTILs en los brazos de tratamiento. **A.** Determinación de sTILs a la cirugía en cada brazo de tratamiento basado en la respuesta en función del descenso relativo del ROR score (AltoR y BajoR) \* $p < 0.05$ . **B.** Imágenes de H/E mostrando la determinación de sTILs en la cirugía de muestras: QT y AltoR (A),

en el brazo de QT y un 7.1% en el brazo de R+L. Sin embargo, la media de sTILs en las muestras tumorales clasificadas como bajo respondedoras fue de 2.3% en el brazo de QT, pero de 13.4% en el brazo de R+L a la CIR (Tabla 3 y Figura 7).

Cuando se evaluó como se comportaban los sTILs en función con la respuesta por el descenso relativo del ROR score, en variable continua, se observó que presentar una mayor infiltración por sTILs a la cirugía estaba relacionado con una mejor respuesta por ROR score en el brazo de QT mientras que se observó el efecto contrario en el brazo de R+L (test interacción  $p=0.03$ ).

### Perfil de expresión de genes inmunes

Posteriormente, para observar la relación que existe entre la expresión de genes relacionados con la vía inmune y la respuesta por descenso relativo del ROR score, se realizó una selección de los genes inmunes incluidos en el panel BreastCancer360. Fueron seleccionados un total 83 genes inmune-relacionados y 12 firmas para el análisis. Se seleccionaron las muestras a CIR para observar el



**Figura 8.** Selección de genes inmunes y su expresión basal (SCR) y a cirugía (CIR) en los dos brazos de tratamiento (QT= quimioterapia y R+L = Ribociclib más letrozol).

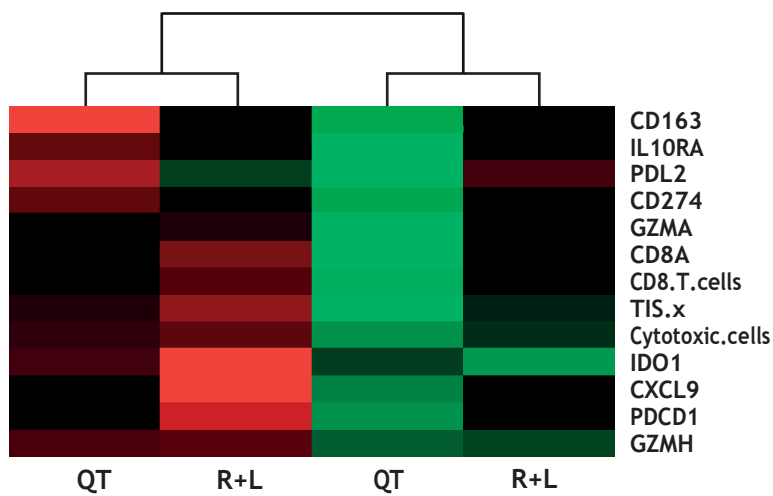


Figura 9. Heatmap que muestra la interacción entre el brazo de QT y R+L y genes inmuno-relacionados con respuesta.

existía un aumento de expresión de los genes inmunes en las muestras clasificadas como buenas respondedoras en el brazo de QT mientras que observó justamente lo contrario en el brazo de pacientes tratadas con R+L con disminución de la expresión de éstos. Se observó que el aumento de la expresión de genes inmunes tras 24 semanas de tratamiento con R+L está relacionada con una peor respuesta por ROR (Figura 9).

efecto posterior a 24 semanas de tratamiento en los dos brazos. Se observó un aumento significativo de la expresión de los genes *PD1*, *PD-L1*, *CD8B* y *CD8 T-cell signature* en los dos brazos de tratamiento (Figura 8).

Posteriormente se realizó un test de interacción para observar la expresión de los genes inmunes y la respuesta por el descenso relativo del ROR score entre los dos brazos de tratamiento. Los resultados mostraron que

## DISCUSIÓN

Los iCDK4/6 actúan inhibiendo la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6, impidiendo la fosforilización de RB interviniendo en la progresión del ciclo celular. En concreto en la transición de la fase G1 a fase S. Este paso, es vital para la proliferación celular<sup>20-22</sup>.

Diferentes estudios han confirmado el descenso en la proliferación de las células tumorales inducido por los diferentes iCDK4/6, ya sea a través de la disminución del Ki67, pero también a nivel molecular con la infraregulación de genes implicados en el ciclo celular<sup>11-13</sup>. Recientemente, diferentes estudios han reportado, además, que estos fármacos pueden tener implicaciones a nivel de regulación inmunológica, ya sea por la activación de las células T que se encuentran en el microambiente tumoral o disminuyendo la actividad inmunosupresora de las células Tregs, entre otros. Sin embargo, los mecanismos exactos de cómo influye la actividad de los iCDK4/6 sobre la regulación del sistema inmune todavía se encuentra pendiente de establecer<sup>14-16</sup>.

En este trabajo se ha confirmado el potente y precoz efecto antiproliferativo de las células tumorales, con un descenso en la expresión del gen MKI67 y de la firma de proliferación por PAM50, así como genes implicados en el ciclo celular, del tratamiento mediante iCDK4/6 asociado a ET a los 14 días de su inicio, que además fue mayor que en la quimioterapia. Además, este efecto se mantuvo también en la muestra obtenida a 24 semanas de tratamiento, en la cirugía, aunque no se observó de una forma tan profunda, probablemente, por el efecto rebote que generan las células tumorales durante el tiempo de espera a la cirugía. Esto confirma el efecto reversible y la necesidad de mantener de forma continua el tratamiento de iCDK4/6<sup>23</sup>.

En cuanto se exploró el potencial efecto que podían generar los iCDK4/6 a nivel de la regulación del sistema inmunológico, se observó que a 24 semanas de tratamiento existía un claro aumento de expresión de genes relacionados con inmunidad (*PD-L1* y *PD-1*) y de firmas relacionadas, principalmente, con las células T CD8, en los dos brazos de tratamiento. Es interesante remarcar que este aumento no fue homogéneo ya que se reportó una sobreexpresión de los genes relacionados con el sistema inmunológico en aquellas pacientes cuyos tumores fueron clasificados como bajos respondedores cuando eran tratados con ribociclib más letrozol. Curiosamente estos resultados fueron en dirección opuesta cuando se analizaron los tumores tratados con quimioterapia, donde se observó una sobreexpresión de los genes inmunológicos en tumores asociados a buena respuesta al tratamiento. De la misma forma la infiltración por TILs fue mayor en los tumores tratados con ribociclib más letrozol con baja respuesta que en tumores con buena respuesta que recibieron el mismo tratamiento y claramente mayor en altos respondedores tratados con quimioterapia.

No existe una clara respuesta por el motivo de estos resultados con los datos obtenidos hasta ahora, aunque una de las hipótesis pueda estar relacionada con el mecanismo de acción del fármaco, donde el mecanismo de acción de estos fármacos genera apoptosis y senescencia de las células tumorales<sup>24</sup>. Algunos datos han observado que la senescencia celular puede afectar al microambiente tumoral<sup>25</sup> con una mayor expresión de genes relacionados con la presentación de antígenos, la sobreexpresión de proteínas inmuno inhibidoras como PD-L1 o una poca capacidad de atracción de células inmunes al microambiente<sup>26,27</sup>.

Con todo ello, se puede deducir que la composición del microambiente será muy relevante. Se ha descrito que la diferente proporción y composición celular del microambiente tumoral en cáncer de mama tiene características pronósticas significativas<sup>28-30</sup>. Descifrar las características de las células que se encuentran representadas en el microambiente tumoral en esta cohorte será clave para poder obtener conclusiones más sólidas.

Este estudio presentó varias limitaciones, por un lado, la muestra de pacientes incluida fue limitada y no se consiguió realizar expresión de todas las muestras. La definición de respuesta utilizada (el descenso relativo del ROR score) no es una definición estándar, y aunque puede llegar a utilizarse, debería validarse de forma prospectiva

A pesar de todo, estos resultados corroboran y van en consonancia con los diferentes estudios publicados sobre el efecto antiproliferativo de los iCDK4/6 así como su potencial efecto inmunosupresor. Abren la puerta a plantear opciones como que la inhibición de CDK4/6, es posible alterar los mecanismos inmunosupresores empleados por las células cancerosas y potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral.

Si bien es cierto que la combinación de immune checkpoint inhibitors (ICI) asociado a la combinación de iCDK4/6 en la práctica clínica ha demostrado ser una combinación demasiado tóxica<sup>31-34</sup>, los datos moleculares observados en este trabajo pueden ser útiles en un futuro para ayudar a seleccionar que grupo de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama RRHH+/HER2- en estadio precoz se beneficiará de un tratamiento libre de quimioterapia.



## REFERENCIAS

1. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, De Azambuja E, Demichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer 5 behalf of the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol.* 2021 Dec;32(12):1475-1495.
2. Burstein HJ, Somerfield MR, Barton DL, Dorris A, Fallowfield LJ, Jain D, et al. Endocrine Treatment and Targeted Therapy for Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2021 Dec 10;39(35):3959-3977.
3. Johnston S, Martin M, Di Leo A, Im SA, Awada A, Forrester T, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2019 Jan 17;5(1):1–8.
4. Johnston S, O'shaughnessy J, Martin M, Huober J, Toi M, Sohn J, et al. Abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer: MONARCH 3 updated results in prognostic subgroups. *NPJ Breast Cancer.* 2021 Jun 22;7(1):80.
5. Lu YS, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Cardoso F, et al. Updated Overall Survival of Ribociclib plus Endocrine Therapy versus Endocrine Therapy Alone in Pre- and Perimenopausal Patients with HR+ /HER2- Advanced Breast Cancer in MONALEESA-7: A Phase III Randomized Clinical Trial. *Clin Cancer Res.* 2022 Mar 1;28(5):851-859.
6. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Annals of Oncology.* 2018 Jul 1;29(7):1541–7.
7. Gnant M, Dueck AC, Frantal S, Martin M, Burstein HJ, Greil R, et al. Adjuvant Palbociclib for Early Breast Cancer: The PALLAS Trial Results (ABCSG-42/AFT- 05/BIG-14-03). *J Clin Oncol.* 2022 Jan 20;40(3):282–93.
8. Loibl S, Marmé F, Martin M, Untch M, Bonnefoi H, Kim SB, et al. Palbociclib for residual high-risk invasive HR-positive and HER2-negative early breast cancer-the penelope-B trial. *Journal of Clinical Oncology.* 2021 May 10;39(14):1518–30.
9. Johnston SRD, Harbeck N, Hegg R, Toi M, Martin M, Shao ZM, et al. Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR+, HER2-, Node- Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (monarchE). *J Clin Oncol.* 2020 Dec 1;38(34):3987–98.
10. Slamon DJ, Fasching PA, Patel R, Verma S, Hurvitz SA, Chia SKL, et al. NATALEE: Phase III study of ribociclib (RIBO) + endocrine therapy (ET) as adjuvant treatment in hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-) early breast cancer (EBC). 2023 Asco Annual meeting, Abstract LBA5000.
11. Johnston S, Puhalla S, Wheatley D, Ring A, Barry P, Holcombe C, et al. Randomized Phase II Study Evaluating Palbociclib in Addition to Letrozole as Neoadjuvant Therapy in Estrogen Receptor-Positive Early Breast Cancer: PALLET Trial. *J Clin Oncol.* 2019 Jan 20;37(3):178–89.
12. Hurvitz SA, Martin M, Press MF, Chan D, Fernandez-Abad M, Petru E, et al. Potent Cell-Cycle Inhibition and Upregulation of Immune Response with Abemaciclib and Anastrozole in neoMONARCH, Phase II Neoadjuvant Study in HR+/HER2- Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020 Feb 1;26(3):566–80.
13. Ma CX, Gao F, Luo J, Northfelt DW, Goetz M, Forero A, et al. NeoPalAna: Neoadjuvant Palbociclib,

- a Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor, and Anastrozole for Clinical Stage 2 or 3 Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug;23(15):4055–65.
14. Goel S, Decristo MJ, Watt AC, Brinjones H, Sceneay J, Li BB, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*. 2017 Aug 24;548(7668):471–5.
  15. Lelliott EJ, Kong IY, Zethoven M, Ramsbottom KM, Martelotto LG, Meyran D, et al. CDK4/6 Inhibition Promotes Antitumor Immunity through the Induction of T-cell Memory. *Cancer Discov*. 2021 Oct 1;11(10):2582–601.
  16. Scirocchi F, Scagnoli S, Botticelli A, Di Filippo A, Napoletano C, Zizzari IG, et al. Immune effects of CDK4/6 inhibitors in patients with HR+/HER2- metastatic breast cancer: Relief from immunosuppression is associated with clinical response. *EBioMedicine*. 2022 May 1;79.
  17. Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends Cell Biol*. 2018 Nov 1;28(11):911–25.
  18. Prat A, Saura C, Pascual T, Hernando C, Muñoz M, Paré L, et al. Ribociclib plus letrozole versus chemotherapy for postmenopausal women with hormone receptor- positive, HER2-negative, luminal B breast cancer (CORALLEEN): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan 1;21(1):33–43.
  19. 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. *Annals of Oncology*. 2015 Feb 1;26(2):259–71.
  20. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131–49.
  21. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, Prado M Del, Lallena MJ, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle- dependent/ independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs*. 2014;32(5):825–37.
  22. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy. *Cancer Discov*. 2016 Apr 1;6(4):353–67.
  23. Johnston SRD, Toi M, O’Shaughnessy J, Rastogi P, Campone M, Neven P, et al. Abemaciclib plus endocrine therapy for hormone receptor-positive, HER2-negative, node-positive, high-risk early breast cancer (monarchE): results from a preplanned interim analysis of a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2023 Jan 1;24(1):77–90.
  24. Torres-Guzmán R, Calsina B, Hermoso A, Baquero C, Alvarez B, Amat J, et al. Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*. 2017 May 10;8(41):69493–507.
  25. Oesterreich S, Aird KM. Senescence and Immunotherapy: Redundant Immunomodulatory Pathways Promote Resistance. *Cancer Immunol Res*. 2023 Apr 3;11(4):401–4.
  26. Shahbandi A, Chiu FY, Ungerleider NA, Kvadas R, Mheidly Z, Sun MJS, et al. Breast cancer cells survive chemotherapy by activating targetable immune-modulatory programs characterized by PD-L1 or CD80. *Nature Cancer* 2022. Dec 8;3(12):1513–33.
  27. Marin I, Serrano M, Pietrocola F. Recent insights into the crosstalk between senescent cells and CD8 T lymphocytes. *NPJ Aging* 2023. Apr 4;9(1):1–4.
  28. Savas P, Virassamy B, Ye C, Salim A, Mintoff CP, Caramia F, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nature Medicine*. 2018 Jun 25;24(7):986–93.

29. Yam C, Yen EY, Chang JT, Bassett RL, Alatrash G, Garber H, et al. Immune phenotype and response to neoadjuvant therapy in triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2021 Oct 1;27(19):5365–75.
30. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res*. 2015 Sep 4;17(1).
31. Rugo HS, Delord JP, Im SA, Ott PA, Piha-Paul SA, Bedard PL, et al. Clinical Trials: Immunotherapy Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer. 2018 Jun 15;24(12):2804-2811.
32. Masuda J, Tsurutani J, Masuda N, Tanabe Y, Iwasa T, Takahashi M, et al. Abstract PS12-10: Phase II study of nivolumab in combination with abemaciclib plus endocrine therapy in patients with HR+, HER2- metastatic breast cancer: WJOG11418B
33. NEWFLAME trial. *Cancer Res*. 2021 Feb 15;81(4\_Supplement):PS12-10.
34. Jerusalem G, Prat A, Salgado R.F, Reinisch M, Saura C, Ruiz Borrego C, et al. Neoadjuvant nivolumab (NIVO) + palbociclib (PALBO) + anastrozole (ANA) for estrogen receptor-positive (ER+)/human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2\_) primary breast cancer (BC): CheckMate 7A8. ESMO congress 2022. Abstract 92MO.
35. Rugo HS, Kabos P, Beck JT, Jerusalem G, Wildiers H, Sevillano E, et al. Abemaciclib in combination with pembrolizumab for HR+, HER2– metastatic breast cancer: Phase 1b study. *NPJ Breast Cancer*. 2022 Nov 5;8(1):1–8.



## **V. DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN GENERAL

---

Gracias a años de investigación y a los múltiples avances observados en el cáncer de mama a diferentes niveles: diagnóstico precoz, una mejoría en la clasificación y estratificación de riesgo de las pacientes y con el desarrollo de nuevos fármacos y esquemas de tratamiento, se ha podido aumentar las tasas de curación de esta enfermedad. La supervivencia del cáncer de mama hoy en día se sitúa en aproximadamente por encima 90% a los 5 años y en un 80% a 10 años<sup>2</sup>.

Durante varios años, múltiples combinaciones de tratamientos con nuevos fármacos asociados a poliquimioterapia han dominado el campo de los ensayos clínicos en (neo)adyuvancia con el objetivo de conseguir la mayor tasa posible de pCR y una mayor SLE a costa de sumar más fármacos. A medida que ha aumentado el conocimiento en las características genómicas y la evolución molecular del cáncer de mama, la medicina de precisión ha ido cogiendo protagonismo. De tal forma que no solo es importante saber que pacientes se van a beneficiar de una mayor cantidad de tratamiento sino cuales van a presentar el mismo beneficio con menor terapia y/o de terapias dirigidas.

El desarrollo y la implementación de las diferentes plataformas genómicas ha generado un gran impacto en el tratamiento de las pacientes, pudiendo estratificar mejor el pronóstico desde el inicio y poder establecer un mejor abordaje terapéutico<sup>191,272</sup>. Con todo ello, cada vez nos vamos focalizando más en una medicina personalizada, cambiando el paradigma de realizar el mismo tratamiento a todas las pacientes y alejándonos del concepto "cuanto más mejor".

Un ejemplo de ello, son los resultados observados en los grandes estudios fases III, donde la implementación de estas plataformas ha permitido que pacientes menopáusicas diagnosticadas de tumores luminales que previamente se consideraban de alto riesgo, por tamaño o afectación ganglionar (N1-3), pueden llegar a ahorrarse tratamiento con poliquimioterapia y realizar tratamiento exclusivo con ET<sup>208,209,214</sup>. Otro ejemplo de ello, se pudo observar en los tumores HER2+ estadios I, donde realizar un esquema corto de tratamiento con paclitaxel más trastuzumab presenta resultados pronósticos excelentes<sup>122</sup>.

Sin embargo, todavía existe bastante camino por recorrer y quedan muchas preguntas sin respuesta en el campo de la desescalada de tratamiento: ¿Qué sucede en tumores que presentan histologías consideradas de alto riesgo, como por ejemplo tumores con subtipo intrínseco Luminales B o alta proliferación?; ¿Qué sucede en pacientes premenopáusicas donde la quimioterapia sigue siendo un tratamiento prioritario? Además, en el subtipo HER2+ sabemos que existe hasta un 30% de tumores que presentaran una sensibilidad especial al tratamiento anti-HER2 por lo que ¿Es posible realizar un tratamiento libre completamente de quimioterapia?

Para poder responder a esas preguntas es importante identificar diferentes biomarcadores que nos ayuden a seleccionar estos tipos de tumores de una forma precoz y sin llegar a comprometer la supervivencia de las pacientes.

## 5.1 DESESCALADA DE TRATAMIENTO EN CÁNCER DE MAMA HER2+

En el cáncer de mama HER2+ el desarrollo de nuevos fármacos y combinaciones desde la llegada del trastuzumab hace ya más de dos décadas, ha generado un gran impacto en la supervivencia y la calidad de vida de las pacientes<sup>81</sup>. En los últimos años se ha observado como las pacientes se han ido beneficiando de la adición de nuevos tratamientos anti-HER2 asociados a poliquimioterapia<sup>72</sup>.

A diferencia de los tumores RRHH+/HER2- donde existen diferentes plataformas génicas que son capaces de estimar el riesgo del tumor, en el cáncer de mama HER2+, la clasificación pronóstica sigue dependiendo, en gran parte, de los factores clínico-patológicos clásicos incluyendo el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la expresión de RRHH<sup>273</sup>. Un ejemplo de ello ha sido la desescalada de tratamiento en estadios I, presentando un excelente pronóstico (superior al 90% a 10 años de seguimiento) con únicamente 12 semanas de paclitaxel y trastuzumab<sup>122</sup>.

Sin embargo, cada vez hay más datos clínicos que muestran que un subgrupo de tumores HER2+ (incluso estadios II-III) puede llegar a alcanzar la pCR únicamente con tratamientos que bloquean el receptor HER2 sin necesidad de realizar quimioterapia<sup>25,106,135-139,271</sup>.

Estos datos han ocasionado que, en los últimos años, uno de los retos más importantes en el cáncer de mama HER2+ precoz sea poder identificar este subgrupo de tumores que permitirá ahorrar tratamientos citotóxicos a las pacientes.

Queda bastante claro que, el estudio de la biología del tumor va a ser clave para poder realizar una estratificación del riesgo más precisa, y, por tanto, poder optimizar todas las estrategias terapéuticas de las que disponemos. Las características genómicas, el microambiente tumoral, así como las características clínicas del tumor, van a ser, en conjunto, los determinantes que van a ayudar a estratificar el pronóstico y a establecer si las pacientes se beneficiarían de una terapia intensificada, mediante doble bloqueo HER2 más poliquimioterapia o si podrán ser candidatas a un tratamiento de desescalada.

A lo largo de los años, se han identificado diversos potenciales biomarcadores, pero sin duda, uno de los más prometedores ha sido la identificación de la infiltración por TILs como un factor pronóstico y predictivo de respuesta en el cáncer de mama HER2+<sup>55,60,61,142</sup>.

La determinación de los TILs al diagnóstico ha sido un biomarcador muy estudiado, sin embargo, recientemente el potencial efecto del tratamiento sobre el tumor y el microambiente tumoral (la infiltración por TILs) también ha demostrado tener un potencial efecto predictivo. En el estudio PAMELA, se observó que la infiltración por TILs determinada posterior al primer ciclo de tratamiento mediante terapia anti-HER2 (sin quimioterapia) tenía un efecto predictivo de respuesta mayor que la determinación basal de éstos<sup>172</sup>. Además, se observó que cuando se combinaba esta determinación de TILs con la celularidad tumoral a día 14 ( $\pm$  2 días) de iniciar tratamiento (posterior al primer ciclo) mediante doble bloqueo HER2, aumentaba de manera sustancial la capacidad predictiva. Este score fue denominado CelTIL score. El CelTIL score fue descrito por primera vez en el 2018 por Nuciforo P. y colaboradores, en el estudio PAMELA y validado posteriormente en el estudio LPT



109096. Se trata de un score predictivo de respuesta a tratamiento mediante doble bloqueo HER2 independiente de pCR. Sin embargo, el papel pronóstico del CelTIL score se encontraba todavía pendiente de valorar.

En este trabajo se valoró el papel pronóstico a largo plazo que podía ofrecer el CelTIL score en las muestras de pacientes incluidas en el ensayo clínico fase III NeoALTTO. Los datos observados han demostrado como un score de sencilla y rápida determinación a día 14 ( $\pm$  2 días), posterior al primer ciclo de tratamiento de doble terapia anti-HER2, puede estar vinculado con el pronóstico tanto en SLE como SG a 5 años. Además, también se confirmó su papel predictivo, se observó que cuando se utilizaba el punto de corte preestablecido previamente (Nuciforo et al; *Ann. Oncol*, 2018) presentar una determinación del CelTIL alto se relacionaba con prácticamente el doble de probabilidad de alcanzar la pCR que el CelTIL bajo.

La determinación del CelTIL score es relativamente sencilla, ya que solo es necesario una lámina de tumor teñida mediante H/E y no requiere ninguna técnica adicional ni experiencia particular. Es una forma simple y rápida de poder obtener información predictiva y pronóstica a largo plazo a simplemente 15 días de inicio del tratamiento neoadyuvante, mediante doble bloqueo HER2. Esta herramienta tiene varias utilidades, un ejemplo de ello sería identificar aquellas pacientes que tras realizar tratamiento neoadyuvante alcancen una pCR pero presenten un CelTIL con un score bajo a los 15 días. En este caso, dado que el CelTIL score nos ofrece una información adicional de mal pronóstico a largo plazo, se podría plantear una terapia adyuvante adicional. Por lo que, el CelTIL score es una herramienta útil que puede llegar a utilizarse como soporte para estratificar el riesgo de las pacientes de una forma precoz al tratamiento y escalar o realizar una desescalada si es preciso.

Este trabajo tiene ciertas limitaciones: 1) la habilidad del CelTIL para predecir pronóstico a diferentes fármacos está todavía por descubrir (ya que el estudio fue realizado y validado en pacientes que realizaron tratamiento mediante doble bloqueo HER2 con trastuzumab y lapatinib); 2) el estudio no tuvo suficiente poder estadístico para poder definir el efecto pronóstico en aquellos tumores que no alcanzaban la pCR. Si se observó que podría tener un efecto, pero para poder obtener conclusiones más robustas serán necesarias más validaciones 3) aunque la determinación es sencilla, poder realizar el CelTIL score, implica realizar una biopsia a día 15 del tratamiento, un procedimiento invasivo y no exento de efectos secundarios y 4) este score se ha desarrollado a partir de muestras que han recibido tratamiento con regímenes libres de quimioterapia, por lo que, si se realiza un tratamiento neoadyuvante con quimioterapia desde el inicio, el efecto que puede llegar a tener se desconoce.

Además, recientemente se ha desarrollado un nuevo test específico para cáncer de mama precoz HER2+, el HER2Dx. Esta herramienta, ofrece la determinación del riesgo y de la probabilidad de alcanzar una pCR al inicio del tratamiento, con lo que únicamente es necesaria la biopsia inicial<sup>173</sup>. Recientemente, la capacidad predictiva del HER2Dx ha sido valorada de forma retrospectiva en diferentes estudios, incluso en tumores estadios I y en estudios con regímenes sin quimioterapia<sup>174,175</sup>. Además, el valor pronóstico también ha sido valorado en diferentes estudios (Tarantino P et al; Abstract 6P, *ESMO Breast* 2023; Martínez-Saez, O. et al; Abstract 5P, *ESMO Breast* 2023).

El uso de regímenes sin quimioterapia en la práctica clínica habitual requiere un biomarcador predictivo validado y, por lo tanto, este enfoque sigue siendo objeto de investigación. Si al final este clasificador combinado con las características clínico-patológicas convencionales ayudará a refinar aún más la estratificación de los pacientes se tendrá que explorar en ensayos clínicos prospectivos. Sin embargo, no cabe duda de que se han realizado grandes avances y el futuro de esta estrategia parece prometedor.

Lo que está claro es que, en los últimos años, el cáncer de mama HER2+ ha sufrido numerosos cambios con la incorporación de nuevos regímenes de tratamiento y se encuentra en continua evolución. Por lo que el establecer un biomarcador que pueda llegar a ser válido en todos los contextos, no es siempre una tarea fácil. Probablemente la integración de diferentes biomarcadores basales y biomarcadores dinámicos será el futuro para poder realizar una correcta estratificación del riesgo de las pacientes.

## 5.2 DESESCALADA DE TRATAMIENTO EN CÁNCER DE MAMA RRHH+/HER2- EN PACIENTES PREMENOPÁUSICAS

El cáncer de mama en edades jóvenes se ha asociado a peor pronóstico con más riesgo de recaídas y de muerte por esta enfermedad que en pacientes menopáusicas<sup>186,224</sup>. Esto puede ser debido a un mayor porcentaje de factores clínicos de alto riesgo que predominan en este subgrupo de pacientes, como mayor grado histológico, menor expresión de RRHH, mayor expresión de genes de proliferación y de subtipos intrínsecos no-Luminales entre otros. Además, dentro del subtipo luminal-like, se observa un mayor porcentaje de tumores luminal B-like y una mayor proporción de tumores de riesgo intermedio-alto por determinación genómica. Todos estos datos han generado que en este subgrupo de pacientes la quimioterapia siga siendo la opción más utilizada en contexto precoz, sin tener claro la magnitud del beneficio<sup>186,222,224,225</sup>.

La desescalada de tratamiento en el grupo de cáncer de mama RRHH+/HER2- precoz ha sido uno de los avances más notorios con la aparición de las herramientas genómicas que han permitido poder realizar una mejor estratificación de riesgo de las pacientes. Sin embargo, la utilidad de éstas para plantear una desescalada de tratamiento parece estar principalmente indicada en pacientes menopáusicas. Los tres grandes estudios fases III prospectivos, MINDACT, TAILORx y RxPONDER, que han permitido la implementación de las plataformas en la práctica clínica habitual, al analizar pacientes premenopáusicas se observó un beneficio de la quimioterapia en prácticamente todos los subgrupos incluso en aquellas muestras tumorales donde la proliferación era baja. Estos datos, nos indican que existe algún efecto de la quimioterapia sobre las pacientes premenopáusicas que claramente no sucede en las pacientes menopáusicas<sup>274</sup>.

Una de las hipótesis más conocidas es la implicación de la función ovárica en la supervivencia de las pacientes. Desde hace más de dos décadas se conoce el potencial efecto pronóstico de la amenorrea en las pacientes premenopáusicas. Con ello surgía la hipótesis de si el beneficio observado con la quimioterapia en estos tres grandes estudios era debido al efecto que realiza ésta sobre el tumor o era la propia alteración de la función ovárica generada por la quimioterapia la que ocasionaba este beneficio<sup>227</sup>.

En este trabajo se corroboró la hipótesis que el efecto biológico de la quimioterapia en las muestras tumorales de pacientes premenopáusicas con diagnóstico de cáncer de mama estrógeno-dependiente (de bajo riesgo) es muy probablemente debido a la bajada de estrógenos periféricos ocasionada por la supresión de la función ovárica provocada por la quimioterapia.

De hecho, el efecto biológico observado en las muestras tumorales tras realizar tratamiento con quimioterapia en pacientes premenopáusicas (con el descenso de la expresión de genes implicados con la vía del receptor de estrógenos) fue similar al efecto anti-estrogénico producido por los IA en pacientes menopáusicas.

En las pacientes menopáusicas la gran mayoría de estrógenos es producido a nivel de la conversión periférica a raíz de la enzima aromatasa. Mientras que, en las pacientes premenopáusicas, la situación es diferente, ya que, en este caso, la gran mayoría de los estrógenos son producidos a

nivel de la actividad ovárica. Por lo tanto, los resultados reportados en este trabajo dejan bastante claro que este descenso de expresión de genes relacionados con la vía estrogénica en las células tumorales es debido a la disminución de estrógenos periféricos ocasionado por la disfunción ovárica generada por el efecto citotóxico de la quimioterapia.

Estos datos podrían explicar los resultados de los 3 grandes fases III, donde se observó el beneficio de la quimioterapia en las pacientes premenopáusicas RRHH+/HER2- incluido en aquellos tumores que presentaban un riesgo genómico bajo por Oncotype DX o MammaPrint mientras que no fue así en las pacientes menopáusicas. Es importante destacar, además, que menos del 20% de las pacientes premenopáusicas incluidas en estos ensayos recibieron tratamiento mediante bloqueo de la vía hormonal con análogos de GnRH/LHRH, este hecho, solo hace que reforzar la hipótesis que parte del beneficio observado en las pacientes podría ser debido al efecto directo citotóxico que se genera con la indirecta SFO<sup>274</sup>.

Los resultados del trabajo van en consonancia con diferentes estudios publicados donde se observaron resultados similares en cuanto a beneficio al realizar tratamiento adyuvante con quimioterapia asociado o no a análogo GnRH/LHRH en pacientes premenopáusicas RE+. Lo más interesante es que los beneficios en la supervivencia de éstos se observan principalmente en pacientes más jóvenes ( $\leq 35$  años), precisamente en aquellas pacientes donde la probabilidad de que se genere una amenorrea inducida por quimioterapia es menos probable<sup>275</sup>.

De hecho, una proporción no insignificante de mujeres experimenta una recuperación de los niveles de estradiol y FSH hasta el rango premenopáusico en los meses posteriores de realizar tratamiento con quimioterapia. Es en este contexto donde los estudios de fase III como el TEXT, SOFT y ASTTRA observaron la superioridad de añadir supresión de la función ovárica asociado a un inhibidor de la aromatasas/tamoxifeno en comparación con tamoxifeno en monoterapia en pacientes premenopáusicas con cáncer de mama precoz RRHH+/HER2-<sup>203,276</sup>.

En el ensayo clínico SOFT se observó que pacientes que no realizaron tratamiento con quimioterapia (bajo riesgo) y que realizaron un doble bloqueo hormonal, presentaron unas tasas de SG de aproximadamente 95% a 8 años de seguimiento. Sin embargo, datos publicados han observado que pacientes jóvenes aun siendo clasificadas como bajo riesgo por diferentes herramientas genómicas siguen recibiendo más tratamiento con quimioterapia que las pacientes menopáusicas (28 vs. 11.3%,  $p = 0.037$ )<sup>277</sup>, con todo el riesgo y toxicidad que esto conlleva.

Saber si realmente los análogos GnRH/LHRH pueden ser utilizados para substituir los efectos endocrinológicos que realiza la quimioterapia para generar este aumento de supervivencia es todavía incierto. Este estudio traslacional da cierta consistencia a esta hipótesis.

Este estudio presentó algunas limitaciones: 1) El estudio se realizó a través del análisis de múltiples muestras incluidas en diferentes ensayos clínicos o cohortes y se analizaron de forma retrospectiva; 2) No se ha dispuesto de datos de estradiol, FSH y LH en sangre de las pacientes incluidas, con lo que no se ha podido realizar la correlación entre la función ovárica y los hallazgos encontrados a nivel molecular y 3) Las muestras de pacientes incluidas provienen de diferentes ensayos clínicos

multicéntricos prospectivos, por lo que existe un sesgo de selección. No obstante, los resultados obtenidos en las diferentes cohortes de pacientes y las líneas celulares son coherentes y además proporcionan una explicación coherente en los resultados observados en los ensayos clínicos.

Además, hay que tener en cuenta que el tratamiento mediante doble bloqueo hormonal no está exento de efectos secundarios. Síntomas vasomotores (sofocos y sudores), alteración en la esfera sexual y ginecológica (sequedad vaginal, disminución de la lívido entre otros) y mialgias/artralgias, son, entre otros, los efectos secundarios más frecuentes. Estos efectos han generado que exista una tasa de abandono del tratamiento de hasta un 20% aproximadamente a los 5 años, siendo más pronunciado en el grupo de pacientes más jóvenes ( $\leq 35$  años)<sup>278,279</sup>.

Finalmente, a pesar de las limitaciones que ha podido tener este estudio, los resultados observados ofrecen una sólida justificación para desarrollar y/o probar estrategias de tratamiento antiestrogénicas eficaces y más específicas en pacientes premenopáusicas. Podría ser que, en un futuro, pacientes con cáncer de mama RE+/HER2- de bajo riesgo genómico podrán substituir el tratamiento con quimioterapia por el doble bloqueo hormonal mediante SFO.

### 5.3 DEESCALADA DE TRATAMIENTO EN PACIENTES MENOPÁUSICAS DIAGNOSTICADAS DE CÁNCER DE MAMA PRECOZ RRHH+/HER2-LUMINAL B POR PAM50

Con el desarrollo de los diferentes iCDK4/6 se ha conseguido modificar la estrategia terapéutica en el cáncer de mama RRHH+/HER2- metastásico de forma sustancial. Se ha aumentado la supervivencia, reduciendo la toxicidad y retrasando el inicio de la quimioterapia, implicando una mejoría importante en la calidad de vida de las pacientes. Con el aumento significativo en la SLP y prácticamente doblando las tasas de SG, han permitido posicionar la combinación de los iCDK4/6 más ET en primera línea de tratamiento del cáncer de mama metastásico RRHH+/HER2-<sup>198</sup>.

El gran beneficio observado por estos fármacos en el contexto metastásico ha generado la pregunta de si es posible observar este mismo beneficio en etapas más precoces. En los últimos años, se han reportado resultados de 4 grandes fases III, con casi más de 5,000 pacientes incluidos cada uno, donde han intentado posicionar los diferentes iCDK4/6 más ET a nivel adyuvante<sup>243-245</sup>. Todos ellos han demostrado un beneficio bastante limitado excepto por la combinación de abemaciclib más ET en pacientes diagnosticadas con tumores de alto riesgo donde si se ha observado un beneficio en cuanto a SLE en pacientes previamente tratadas con quimioterapia neoadyuvante<sup>245</sup> y recientemente la combinación de ribociclib más ET donde también se ha reportado un beneficio en SLE a 3 años (Slamon D.J., et al; Abstract LBA5000, *ASCO annual meeting* 2023):

El efecto biológico de estos fármacos sobre el tumor fue investigado por diferentes estudios neoadyuvantes, observando un descenso en la proliferación (descenso del Ki67 por IHQ o descenso de la firma de proliferación determinada por PAM50), así como en los genes implicados en el ciclo celular de una forma más potente que el tratamiento con ET en monoterapia. Estos resultados, abrieron la posibilidad de valorar si realmente la combinación de iCDK4/6 más ET podría substituir al tratamiento de quimioterapia convencional a nivel neoadyuvante.

Hasta la fecha, solo dos fases II han realizado una comparación directa con esta combinación de tratamiento dirigido y quimioterapia<sup>264,265</sup>. En concreto el ensayo CORALLEEN observó un efecto biológico, determinado por Prosigna ROR score, generado por los iCDK4/6 más ET similar al de la quimioterapia alcanzando un ROR score de bajo riesgo a la cirugía de aproximadamente el 47% en los dos brazos de tratamiento. Este estudio abre la puerta a plantear si realmente la combinación de tratamiento con ribociclib más letrozol pueda llegar a substituir al tratamiento con quimioterapia incluso en pacientes de alto riesgo en un futuro<sup>265</sup>.

En este trabajo, se estudió más en detalle el efecto biológico ocasionado por iCDK4/6 más ET en las muestras tumorales de las pacientes incluidas del ensayo clínico CORALLEEN. Se confirmó el potente efecto de los iCDK4/6 en combinación con ET de infraregular genes implicados en el ciclo celular y de la vía estrogénica de forma precoz, a los 14 días del inicio del tratamiento, así como a la cirugía. Además, también se corroboró el potente y precoz descenso de la proliferación de las células tumorales, con un descenso en la expresión del gen *MIK167* y de la firma de proliferación por PAM50 a los 14 días de tratamiento con ribociclib más letrozol en comparación con tratamiento con quimioterapia. Es interesante destacar, que tal y como se ha reportado en otros estudios, se observó

un ligero ascenso de la expresión del gen *MIKI67* en el brazo de ribociclib más letrozol en la cirugía, confirmando que el efecto antiproliferativo de los iCDK4/6 es, por un lado, reversible y por el otro la necesidad de ofrecerlos de forma continua para mantener este efecto<sup>251,253</sup>.

A nivel de infiltración por TILs estromales no se observaron cambios en cuanto al porcentaje de infiltración a dos semanas de tratamiento ni a la cirugía (24 semanas de tratamiento) tanto en el brazo de quimioterapia como en el de ribociclib más letrozol. Sin embargo, se observó que realizar 24 semanas de tratamiento con ribociclib más letrozol aumentaba la infiltración por TILs en un 30% de los tumores. Además, en cuanto se determinó la infiltración de TILs en función de la respuesta, se observó que las muestras tumorales que presentaron una mayor infiltración por TILs fueron aquellas muestras tumorales tratadas con ribociclib más letrozol que presentaron poca respuesta. Hay que añadir que, en el brazo de tratamiento con quimioterapia, justamente se observó el efecto contrario, un aumento de expresión de TILs en pacientes respondedoras.

El potencial efecto inmunomodulador de los iCDK4/6 ha sido previamente estudiado, donde datos preclínicos han observado que estos fármacos promueven la producción de interferón tipo III estimulando la presentación de antígenos por las células tumorales que generan una activación de las células T efectoras y una disminución de la proliferación de las células T reguladoras (Tregs). Ocasionando, todo ello, un ambiente menos inmunosuprimido<sup>280-282</sup>.

Estos datos fueron en consonancia con los datos de expresión génica observados en el trabajo. En global, a 24 semanas de tratamiento se observó un claro aumento de expresión de genes relacionados con inmunidad (*PD-L1* y *PD-1*) y de firmas relacionadas, principalmente, con las células T CD8, en los dos brazos de tratamiento. De nuevo, este aumento de expresión génica no fue homogéneo. Como sucedió con la infiltración por TILs, se observó una sobreexpresión de los genes inmunes en el grupo de tumores tratados con ribociclib más letrozol clasificados como no respondedores a diferencia del brazo de quimioterapia donde se observó este aumento, pero en el grupo de pacientes respondedoras.

Una explicación para este escenario podría ser que mientras la quimioterapia genera muerte celular por apoptosis con la liberación de neoantígenos en el microambiente tumoral atrayendo diferentes células del sistema inmune, esto no es así en el caso del tratamiento con iCDK4/6. En este caso, por el mecanismo de acción de estos fármacos se genera apoptosis y senescencia de las células tumorales<sup>283</sup>.

Existen datos que han relacionado el descenso de porcentaje de Tregs así como el aumento células T efectoras con una mejor respuesta a tratamiento(284), generando la hipótesis que quizá los iCDK4/6 no aumenten el reclutamiento de células inmunes en el microambiente tumoral si no que generen una activación de las células T ya presentes, hecho que explicaría, en parte, el no aumento significativo de infiltración por TILs tras tratamiento con iCDK4/6<sup>252</sup>.

El potencial efecto inmunomodulador descrito por los iCDK4/6 ha sido de vital importancia para el desarrollo de nuevos tratamientos y combinaciones en el cáncer de mama RRHH+/HER2-, principalmente con ICI. Como ya es bien conocido, el cáncer de mama RRHH+/HER2- es, respecto a los otros subtipos, el que presenta una menor infiltración por TILs y respuestas limitadas a

tratamientos con ICI<sup>64,285</sup>. El efecto de iCDK4/6 en las muestras tumorales, convirtiendo un tumor "frío" en un tumor "caliente" podría ayudar a aumentar las respuestas a inmunoterapia en este subtipo. Estudios preclínicos han demostrado que existe una acción sinérgica entre iCDK4/6 y tratamiento con anti-PD1, por lo que no es de extrañar que se haya valorado esta combinación en diferentes ensayos clínicos<sup>286</sup>.

En conjunto, se podría hipotetizar que realizar un rescate mediante ICI en combinación con iCDK4/6 en las pacientes poco respondedoras sería una opción válida. Sin embargo, diferentes estudios que han testado la triple terapia: iCDK4/6 más ET asociado a ICI, han reportado toxicidades inaceptables.

En un estudio fase Ib que realizó la combinación de pembrolizumab con iCDK4/6 más ET en cáncer de mama RRHH+/HER2- metastásico se observó un aumento claro de toxicidad hepática con un 40% de elevación de transaminasas grado 3 y un aumento de casi un 5% en la incidencia de neumonitis<sup>287</sup>. Un porcentaje similar de toxicidades a nivel hepático fueron reportadas en el estudio NEWFLAME donde se realizó la combinación de abemaciclib más ET con nivolumab en el mismo grupo de pacientes<sup>288</sup>. Paralelamente, esta combinación fue testada a nivel precoz mediante el estudio fase II no comparativo Checkmate 7 A 8. Este ensayo realizó tratamiento neoadyuvante mediante palbociclib más anastrozol y nivolumab. Sin embargo, el estudio cerró de forma precoz dado que se observó un alto porcentaje de elevación de las transaminasas grado 3<sup>289</sup>. Existe, todavía pendiente de resultados, el estudio ImmunoADAPT (NCT04075604) donde se realiza tratamiento mediante combinación de tamoxifeno más palbociclib asociado a nivolumab<sup>290</sup>.

Todos estos datos publicados, apoyan y van en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo que los iCDK4/6 podrían actuar como potentes moduladores de la inmunidad mediada por células T. Sin embargo, el poder discernir el motivo por el que existe elevación de TILs en las pacientes poco respondedoras todavía es una pregunta difícil de responder con los datos obtenidos hasta la fecha.

Este estudio tiene varias limitaciones, por un lado, la muestra de pacientes incluida fue limitada y no se consiguió realizar expresión de todas las muestras. La definición de respuesta utilizada (el descenso relativo del ROR score) no es una definición estándar, y aunque puede llegar a utilizarse, debería validarse de forma prospectiva. Además, un aspecto relevante en cuanto a la determinación de TILs, es valorar la composición de éstos. Hay que tener en cuenta que la composición del microambiente tumoral, así como las diferentes células inmunes implicadas puede afectar al comportamiento de la célula tumoral. En un futuro, discernir la composición de éstas puede ser clave para poder valorar su función predictiva/pronóstica.

Teniendo en cuenta que el tratamiento mediante iCDK4/6 más ET e inmunoterapia mediante ICIs es una combinación bastante tóxica que difícilmente podrá ser implementada en la práctica clínica, es posible que la información sobre la infiltración por TILs, pueda llegar a utilizarse, juntamente con otros factores, como un biomarcador de selección de pacientes con diferentes pronósticos. El seguimiento de las pacientes incluidas en el estudio CORALLEEN se encuentra pendiente, por lo que en un futuro se podrá llegar a saber que implicaciones presenta esta infiltración por TILs, principalmente en el grupo no respondedoras tratadas con ribociclib más letrozol.



A raíz de los resultados observados en el ensayo CORALLEEN, se abrió la puerta a valorar si realmente se pudieran llegar a ahorrar el tratamiento de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama RRHH+/HER2- de alto riesgo a nivel precoz, valorando el ROR score. Con esta idea, surgió el ensayo clínico RIBOLARIS, que abrió reclutamiento en abril del 2022 (Cottu P., et al; *ESMO* 2022) y que tiene como objetivo primario valorar la SLM a distancia en la cohorte de pacientes con un ROR de bajo riesgo posterior a 6 ciclos de tratamiento inicial con ribociclib más letrozol.

El RIBOLARIS (NCT 05296746) es un ensayo clínico fase II donde se incluyen pacientes, tanto pre como menopáusicas, con cáncer de mama estadio II de alto riesgo, RRHH+/HER2- con Ki67 $\geq$  20% y grado histológico 2 o 3. Las pacientes incluidas reciben 6 ciclos de tratamiento con ribociclib (600mg/24h, 3 semanas si una de descanso) más letrozol  $\pm$  análogos de la LHRH. Posterior a la cirugía se determina el ROR score mediante Prosigna. Si este es clasificado como ROR de bajo riesgo, las pacientes seguirán tratamiento mediante ribociclib más letrozol (a dosis de 400mg/día 3 semanas si un descanso) durante 33 ciclos. El tratamiento con ET se mantendrá durante un mínimo de 5 años. Mientras que si el tumor es ROR intermedio o alto riesgo recibirán tratamiento con quimioterapia estándar seguido de ribociclib más letrozol  $\pm$  análogos de la LHRH.

En un futuro, probablemente, será la combinación de diversos biomarcadores los que ayudaran a seleccionar el grupo de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama de alto riesgo, que se beneficiaran de un esquema libre de quimioterapia. El potencial efecto inmunomodulador que genera el tratamiento con iCDK4/6 tanto sobre las células tumorales, como las no tumorales, será un dato de vital importancia para poder seguir avanzando en esta dirección.



## **VI. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

---

- Presentar un CelTIL score elevado (determinado por el cutoff preestablecido) a día 14 ( $\pm 2$ ) de iniciar el tratamiento neoadyuvante mediante terapia anti-HER2 exclusiva, se asocia a una mayor probabilidad de alcanzar una pCR en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ precoz.
- Presentar un CelTIL score elevado (determinado por el cutoff preestablecido) a día 14 ( $\pm 2$ ) de iniciar el tratamiento neoadyuvante mediante terapia anti-HER2 exclusiva, se asocia a un mejor pronóstico a 5 años en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2+ precoz.
- El valor pronóstico del CelTIL score es independiente de los TILs basales, el estado de los receptores hormonales, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el tipo de cirugía, el tratamiento realizado y el tipo de respuesta patológica.
- En pacientes menopáusicas con un diagnóstico de cáncer de mama RRHH+/HER2-, genes relacionados con la vía de señalización del estrógeno se encontraron infra regulados tras un tratamiento neoadyuvante con terapia endocrina en comparación con quimioterapia.
- En pacientes premenopáusicas con un diagnóstico de cáncer de mama RRHH+/HER2-, genes relacionados con la vía de señalización del estrógeno se encontraron infra regulados tras un tratamiento neoadyuvante con quimioterapia.
- En pacientes premenopáusicas con un diagnóstico de cáncer de mama RRHH+/HER2+, el gen PGR se encontró infra regulado tras realizar tratamiento anti-HER2 y poliquimioterapia.
- El tratamiento neoadyuvante mediante ribociclib más letrozol en cáncer de mama RRHH+/HER2- durante 24 semanas genera una disminución de la expresión de genes implicados en la proliferación celular y la vía de señalización del estrógeno a las 2 semanas hasta las 24 semanas de iniciar el tratamiento.
- El tratamiento neoadyuvante mediante ribociclib más letrozol en cáncer de mama RRHH+/HER2- durante 24 semanas incrementa la presencia de TILs estromales en aproximadamente un 30% de los casos.
- El tratamiento neoadyuvante con quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos en cáncer de mama RRHH+/HER2- ocasiona un aumento en el número de TILs y expresión de genes inmunológicos en tumores respondedores, y una disminución en los no respondedores.
- El tratamiento neoadyuvante mediante ribociclib más letrozol en cáncer de mama RRHH+/HER2- durante 24 semanas ocasiona un descenso en el número de TILs y expresión de genes inmunológicos en tumores respondedores, y un aumento en los no respondedores.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





# BIBLIOGRAFÍA

---

1. El cáncer en cifras | SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023 Jan;73(1):17–48.
3. ESTIMACIONES DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA.
4. Wolff AC, McShane LM, Hammond MEH, Allison KH, Fitzgibbons P, Press MF, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Nov 1;142.
5. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *Journal of Clinical Oncology.* 2020 Apr 20;38(12):1346–66.
6. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, et al. 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus – Opinion of a German Team of Experts (Zurich 2013). *Breast Care.* 2013 J;8(3):221.
7. Hwang KT, Kim J, Jung J, Chang JH, Chai YJ, Oh SW, et al. Impact of breast cancer subtypes on prognosis of women with operable invasive breast cancer: A Population-based Study Using SEER Database. *Clinical Cancer Research.* 2019 Mar 15;25(6):1970–9.
8. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US incidence of Breast cancer Subtypes Defined by Joint Hormone receptor and Her2 Status. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Apr 28;106 (5):dju055.
9. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet.* 2011 Aug 27;378(9793):771–84.
10. Cronin KA, Harlan LC, Dodd KW, Abrams JS, Ballard-Barbash R. Population-based Estimate of the Prevalence of HER-2 Positive Breast Cancer Tumors for Early Stage Patients in the US.. *2010 Oct;28(9):963–8.*
11. Slamon DJ, 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. *New England Journal of Medicine.* 2001 Mar 15;344(11):783–92.
12. De Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007 May 21 ;96(10):1504–13.
13. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb 1;11(2):174–83.
14. Criscitiello C, Disalvatore D, De Laurentiis M, Gelao L, Fumagalli L, Locatelli M, et al. High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in Luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer. *Breast.* 2014 Feb 1 ;23(1):69–75.
15. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart MJ, et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology.* 2015 Aug 1;26(8):1533–46.
16. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and

- prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May;101(10):736–50.
17. Fernandez-Martinez A, Pascual T, Perrone G, Morales S, Haba J de la, González-Rivera M, et al. Limitations in predicting PAM50 intrinsic subtype and risk of relapse score with Ki67 in estrogen receptor-positive HER2-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2017 Feb 27;8(13):21930–7.
  18. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2021;113(7):201.
  19. Andre F, Ismaila N, Allison KH, Barlow WE, Collyar DE, Damodaran S, et al. Biomarkers for Adjuvant Endocrine and Chemotherapy in Early-Stage Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology.* 2022 Apr 1;34.
  20. Malmgren JA, Mayer M, Atwood MK, Kaplan HG. Differential presentation and survival of de novo and recurrent metastatic breast cancer over time: 1990–2010. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Jan 1;167(2):579–90.
  21. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
  22. Sørli 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 Jul 8;100(14):8418–23.
  23. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun 7;295(21):2492.
  24. Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. 2015; Dec 18;13:303.
  25. Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(4):545–54.
  26. Prat A, Cheang MCU, Galván P, Nuciforo P, Paré L, Adamo B, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncol.* 2016 Oct 1;2(10):1287.
  27. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015 Nov 1;24:S26–35.
  28. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
  29. Prat A, Brase JC, Cheng Y, Nuciforo P, Paré L, Pascual T, et al. Everolimus plus Exemestane for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A PAM50 Intrinsic Subtype Analysis of BOLERO-2. *Oncologist.* 2019 Jan 24;2018-0407.
  30. Cancer Genome Atlas Network T. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012 October 490; 61-70.
  31. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 1 ;28(10):1684–91.
  32. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2010 Sep 2;12(5):1–18.
  33. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 10;31(2):203–9.

34. Vidal M, Peg V, Galván P, Tres A, Cortés J, Ramón y Cajal S, et al. Gene expression-based classifications of fibroadenomas and phyllodes tumours of the breast. *Mol Oncol*. 2015 Jun 1;9(6):1081–90.
35. Zitvogel L, Kroemer G. The immune response against dying tumor cells: avoid disaster, achieve cure. *Cell Death & Differentiation* 2008 15:1. 2007 Dec 17;15(1):1–2.
36. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565–70.
37. de Melo Gagliato D, Cortes J, Curigliano G, Loi S, Denkert C, Perez-Garcia J, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in Breast Cancer and implications for clinical practice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2017 Dec 1;1868(2):527–37.
38. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, 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.
39. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Jan 1;28(1):105–13.
40. 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 Dec 2;8(12).
41. Denkert C, von Minckwitz G, 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 Mar 20;33(9):983–91.
42. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2011 Dec 8;13(6):1–13.
43. Solinas C, Carbognin L, De Silva P, Criscitiello C, Lambertini M. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. *Breast*. 2017 Oct 1;35:142–50.
44. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan;19(1):40–50.
45. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Mar 1;31(7):860–7.
46. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol*. 2016 Oct 1;2(10):1354–60.
47. Loi S, Michiels S, Adams S, Loibl S, Budczies J, Denkert C, et al. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. *Annals of Oncology*. 2021 Oct 1;32(10):1236–44.
48. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn B V., Blohmer JU, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: Clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Annals of Oncology*. 2019 Aug 1;30(8):1279–88.
49. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value

- of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):2959–66.
50. 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. *Annals of Oncology*. 2014 Aug 1;25(8):1544–50.
  51. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. 2019 Jan 16;37(7):559–69.
  52. Park JH, Jonas SF, Bataillon G, Criscitiello C, Salgado R, Loi S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2019 Dec 1;30(12):1941–9.
  53. De Jong VMT, Wang Y, Ter Hoeve ND, Opdam M, Stathonikos N, Józwiak K, et al. Prognostic Value of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Young, Node-Negative, Triple-Negative Breast Cancer Patients Who Did Not Receive (neo)Adjuvant Systemic Therapy. *J Clin Oncol*. 2022;40(21):2361–74.
  54. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnani M, Poortmans P, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: The St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Annals of Oncology*. 2019 Oct 1;30(10):1541–57.
  55. Heppner BI, 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. *Clinical Cancer Research*. 2016 Dec 1;22(23):5747–54.
  56. Solinas C, Ceppi M, Lambertini M, Scartozzi M, Buisseret L, Garaud S, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib or their combination: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev*. 2017 Jun 1;57:8–15.
  57. De Angelis C, Nagi C, Hoyt CC, Liu L, Roman K, Wang C, et al. Evaluation of the predictive role of tumor immune infiltrate in HER2-positive breast cancer patients treated with neoadjuvant anti-HER2 therapy without chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2020 Feb 1;26(3):738–745.
  58. Perez EA, Ballman K V., Tenner KS, Thompson EA, Badve SS, 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 Jan 1;2(1):56–64.
  59. Krop IE, Paulson J, Campbell C, Kiermaier AC, Andre F, Fumagalli D, et al. Genomic correlates of response to adjuvant trastuzumab (H) and pertuzumab (P) in HER2+ breast cancer (BC): Biomarker analysis of the APHINITY trial. 2019 May 26;37(15\_suppl):1012–1012.
  60. 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: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol*. 2015 Jul 1;1(4):448–55.
  61. Dieci M V., Conte P, Bisagni G, Brandes AA, Frassoldati A, Cavanna L, et al. Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+ breast cancer. *Annals of Oncology*. 2019 Mar 1;30(3):418–23.
  62. Luen S, Virassamy B, Savas P, Salgado R, Loi S. The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast*. 2016 Oct 1;29:241–50.
  63. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E, Fineberg S, Shear J, Turner S, et al. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group.

- NPJ Breast Cancer. 2021 Dec 7:150.
64. Barroso-Sousa R, Jain E, Cohen O, Kim D, Buendia-Buendia J, Winer E, et al. Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020 Mar 1;31(3):387–94.
  65. Gao Z hua, Li C xin, Liu M, Jiang J yuan. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020 Dec 1;20(1):1–14.
  66. Criscitiello C, Vingiani · A, Maisonneuve · P, Viale · G, Curigliano · G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2– breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;183:347–54.
  67. Tsang JYS, Hui SW, Ni YB, Chan SK, Yamaguchi R, Kwong A, et al. Lymphocytic infiltrate is associated with favorable biomarkers profile in HER2-overexpressing breast cancers and adverse biomarker profile in ER-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jan;143(1):1-9.
  68. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.
  69. Moasser MM. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 10;26(45):6469.
  70. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer. 2015 Jan 14;66:111–28.
  71. Gutierrez C, Schiff R. HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jan 1;135(1):55–62.
  72. Swain SM, Shastry M, Hamilton E. nature reviews drug discovery Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22:101–26.
  73. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the Dual Kinase Inhibitor Lapatinib (GW572016) against HER-2-Overexpressing and Trastuzumab-Treated Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1630–9.
  74. unttila TT, Li G, Parsons • Kathryn, Phillips GL, Sliwkowski MX. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jul;128(2):347-56.
  75. Yver A, Agatsuma T, Soria JC. The art of innovation: clinical development of trastuzumab deruxtecan and redefining how antibody-drug conjugates target HER2-positive cancers. *Annals of Oncology*. 2020 Mar 1;31(3):430–4.
  76. Staudacher AH, Brown MP. Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required? *British Journal of Cancer* 2017 117:12. 2017 Oct 24;117(12):1736–42.
  77. Martínez-Sáez O, Prat A. Current and Future Management of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO Oncol Pract*. 2021 Oct 2;17(10):594–604.
  78. Swain SM, Miles D, Kim SB, Im YH, Im SA, Semiglazov V, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2020 Apr 1;21(4):519–30.
  79. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, De Azambuja E, Demichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer 5 behalf of the ESMO Guidelines Committee. *S Loibl*. 2021;27.
  80. Giordano SH, Franzoi MAB, Temin S, Anders CK, Chandarlapaty S, Crews JR, et al. Systemic Therapy for Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2022 May 1;36.

81. Bradley R, Braybrooke J, Gray R, Hills R, Liu Z, Peto R, et al. Trastuzumab for early-stage, HER2-positive breast cancer: a meta-analysis of 13 864 women in seven randomised trials. *Lancet Oncol*. 2021 Aug 1;22(8):1139–50.
82. Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2017 Feb 23;12(2):81–92.
83. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 2014 Nov 20;32(33):3744–52.
84. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet*. 2017 Mar 25;389(10075):1195–205.
85. Piccart-Gebhart M, Holmes E, Baselga J, De Azambuja E, Dueck AC, Viale G, et al. Adjuvant Lapatinib and Trastuzumab for Early Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Apr 1;34(10):1034–42.
86. Loibl S, Jassem J, Sonnenblick A, Parlier D, Winer E, Bergh J, et al. VP6-2022: Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with early HER-2 positive breast cancer in APHINITY: 8.4 years' follow-up. *Annals of Oncology*. 2022 Sep;33(9):986–7.
87. FDA grants regular approval to pertuzumab for adjuvant treatment of HER2-positive breast cancer | FDA.
88. Krop IE, Im SA, Barrios C, Bonnefoi H, Gralow J, Toi M, et al. Trastuzumab Emtansine Plus Pertuzumab Versus Taxane Plus Trastuzumab Plus Pertuzumab After Anthracycline for High-Risk Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Early Breast Cancer: The Phase III KAITLIN Study. *J Clin Oncol*. 2022 Feb 10;40(5):438–48.
89. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Feb 14;380(7):617–28.
90. FDA approves ado-trastuzumab emtansine for early breast cancer | FDA
91. 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 HER2-negative cohort. *The Lancet*. 2010 Jan 30;375(9712):377–84.
92. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol*. 2014;15(6):640–7.
93. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmuller 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Sep 1;29(25):3351–7.
94. Hurvitz SA, Caswell-Jin JL, McNamara KL, Zoeller JJ, Bean GR, Dichmann R, et al. Pathologic and molecular responses to neoadjuvant trastuzumab and/or lapatinib from a phase II randomized trial in HER2-positive breast cancer (TRIO-US B07). *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).

95. 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 (NeoALTTO): A randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet*. 2012. p. 633–40.
96. De Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, Holmes E, Di Cosimo S, Swaby RF, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): Survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol*. 2014 Sep 1;15(10):1137–46.
97. Carey LA, Berry DA, Cirrincione CT, Barry WT, Pitcher BN, Harris LN, 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 Feb 20;34(6):542–9.
98. Fernandez-Martinez A, Krop IE, Hillman DW, Polley MY, Parker JS, Huebner L, et al. Survival, pathologic response, and genomics in CALGB 40601 (Alliance), a neoadjuvant Phase III trial of paclitaxel-trastuzumab with or without lapatinib in HER2-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2020 Dec 10;38(35):4184–93.
99. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, 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 Jan 1;13(1):25–32.
100. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Tseng LM, Liu MC, 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 Jun;17(6):791–800.
101. Swain SM, Ewer MS, Viale G, Delaloge S, Ferrero JM, Verrill M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and standard anthracycline- and taxane-based chemotherapy for the neoadjuvant treatment of patients with HER2-positive localized breast cancer (BERENICE): a phase II, open-label, multicenter, multinational cardiac safety study. *Annals of Oncology*. 2018 Mar 1;29(3):646–53.
102. 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). *Annals of Oncology*. 2013 Sep 1;24(9):2278–84.
103. Gavilá J, Oliveira M, Pascual T, Perez-Garcia J, González X, Canes J, et al. Safety, activity, and molecular heterogeneity following neoadjuvant non-pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel, trastuzumab, and pertuzumab in HER2-positive breast cancer (Opti-HER HEART): an open-label, single-group, multicenter, phase 2 trial. *BMC Med*. 2019 Jan 9;17(1):8.
104. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019 Aug 1;30(8):1194–220.
105. Hurvitz SA, Martin M, Symmans WF, Jung KH, Huang CS, Thompson AM, et al. Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Jan 1;19(1):115–26.
106. Hurvitz SA, Martin M, Jung KH, Huang CS, Harbeck N, Valero V, et al. Neoadjuvant Trastuzumab Emtansine and Pertuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Three-Year Outcomes From the Phase III KRISTINE Study. *J Clin Oncol*. 2019 Sep 1;37(25):2206–16.
107. 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. *The Lancet*. 2014 Jul 12;384(9938):164–72.
108. Broglio KR, Quintana M, Foster M, Olinger M, McGlothlin A, Berry SM, et al. Association of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Breast Cancer With Long-Term Outcomes: A Meta-Analysis. *JAMA Oncol*. 2016 Jun 1;2(6):751–60.
  109. Zarotti C, Papassotiropoulos B, Elfgén C, Dedes K, Vorburger D, Pestalozzi B, et al. Biomarker dynamics and prognosis in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Sci Rep*. 2022 Dec 1 ;12(1).
  110. Mieog JSD, Van Der Hage JA, Van De Velde CJH. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;2007(2).
  111. Pilewskie M, Morrow M. Axillary Nodal Management Following Neoadjuvant Chemotherapy: A Review. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):549–55.
  112. Rastogi P, Anderson SJ, 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Feb 2;26(5):778–85.
  113. 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;14(6):1273–83.
  114. Eiger D, Franzoi MA, Pondé N, Brandão M, De Angelis C, Nogueira MS, et al. Cardiotoxicity of trastuzumab given for 12 months compared to shorter treatment periods: a systematic review and meta-analysis of six clinical trials. *Open*. 2020;5:659.
  115. Van Der Voort A, Van Ramshorst MS, Van Werkhoven ED, Mandjes IA, Kemper I, Vulink AJ, et al. Three-Year Follow-up of Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Anthracyclines in the Presence of Dual ERBB2 Blockade in Patients With ERBB2-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of the TRAIN-2 Randomized, Phase 3 Trial. *JAMA Oncol*. 2021 Jul 1;7(7):978–84.
  116. Dang C, Ewer MS, Delaloge S, Ferrero JM, Colomer R, de la Cruz-Merino L, et al. BERENICE Final Analysis: Cardiac Safety Study of Neoadjuvant Pertuzumab, Trastuzumab, and Chemotherapy Followed by Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in HER2-Positive Early Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 1;14(11):2596.
  117. Kuderer NM, Desai A, Lustberg MB, Lyman GH. Mitigating acute chemotherapy-associated adverse events in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Nov;19(11):681–697.
  118. Vaz-Luis I, Ottesen RA, Hughes ME, Mamet R, Burstein HJ, Edge SB, et al. Outcomes by tumor subtype and treatment pattern in women with small, node-negative breast cancer: A multi-institutional study. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Jul 10;32(20):2142–50.
  119. Curigliano G, Viale G, Bagnardi V, Fumagalli L, Locatelli M, Rotmensz N, et al. Clinical relevance of HER2 overexpression/amplification in patients with small tumor size and node-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Dec 1;27(34):5693–9.
  120. Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR, Meric-Bernstam F, Rakhit R, Cardoso F, et al. High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Dec 1;27(34):5700–6.
  121. Tolane SM, Barry WT, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, et al. Adjuvant Paclitaxel and Trastuzumab for Node-Negative, HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015 Jan 8;372(2):134–41.
  122. Tolane SM, Tarantino P, Graham N, Tayob N, Parè L, Villacampa G, et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer: final 10-year analysis of the open-label, single-arm, phase 2 APT trial. *Lancet Oncol*. 2023 Mar 1;24(3):273–85.
  123. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and



- escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. Changes in serum IL-8 levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and NSCLC. 2017;28:1700–12.
124. Tolaney SM, Tayob N, Dang C, Yardley DA, Isakoff SJ, Valero V, et al. Adjuvant Trastuzumab Emtansine Versus Paclitaxel in Combination With Trastuzumab for Stage I HER2-Positive Breast Cancer (ATEMPT): A Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2021 Jul 20;39(21):2375–85.
  125. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Giermek J, Martin M, Jasiowka M, et al. Abstract S5-04: Ten year follow-up of BCIRG-006 comparing doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2+ early breast cancer. *Cancer Res*. 2016 Feb 15 ;76(4\_Supplement):S5-04. /615516/Abstract-S5-04-Ten-year-follow-up-of-BCIRG-006
  126. Nitz U, Gluz O, Graeser M, Christgen M, Kuemmel S, Grischke EM, et al. De-escalated neoadjuvant pertuzumab plus trastuzumab therapy with or without weekly paclitaxel in HER2-positive, hormone receptor-negative, early breast cancer (WSG-ADAPT-HER2+/HR-): survival outcomes from a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2022 May 1;23(5):625–35.
  127. Waks AG, Desai N V, Li T, Poorvu PD, Partridge AH, Sinclair N, et al. A prospective trial of treatment de-escalation following neoadjuvant paclitaxel/trastuzumab/pertuzumab in HER2-positive breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2022 May 10;8(1):63.
  128. Piccart M, Procter M, Fumagalli D, De Azambuja E, Clark E, Ewer MS, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer in the APHINITY Trial: 6 Years' Follow-Up. *Journal of Clinical Oncology*. 2021 May 1;39(13):1448–57.
  129. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Waldron-Lynch M, et al. Long-term efficacy analysis of the randomised, phase II TRYPHAENA cardiac safety study: Evaluating pertuzumab and trastuzumab plus standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer. *Eur J Cancer*. 2018 Jan 1;89:27–35.
  130. Earl HM, Hiller L, Vallier AL, Loi S, McAdam K, Hughes-Davies L, et al. 6 versus 12 months of adjuvant trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (PERSEPHONE): 4-year disease-free survival results of a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*. 2019 Jun 29;393(10191):2599–612.
  131. Pivot X, Romieu G, Debled M, Pierga JY, Kerbrat P, Bachelot T, et al. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab in early breast cancer (PHARE): final analysis of a multicentre, open-label, phase 3 randomised trial. *The Lancet*. 2019 Jun 29;393(10191):2591–8.
  132. Mavroudis D, Saloustros E, Malamos N, Kakolyris S, Boukovinas I, Papakotoulas P, et al. Six versus 12 months of adjuvant trastuzumab in combination with dose-dense chemotherapy for women with HER2-positive breast cancer: a multicenter randomized study by the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Ann Oncol*. 2015 Jul 1;26(7):1333–40.
  133. Joensuu H, Fraser J, Wildiers H, Huovinen R, Auvinen P, Utriainen M, et al. Effect of Adjuvant Trastuzumab for a Duration of 9 Weeks vs 1 Year With Concomitant Chemotherapy for Early Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: The SOLD Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018 Sep 1;4(9):1199–206.
  134. Conte P, Frassoldati A, Bisagni G, Brandes AA, Donadio M, Garrone O, et al. Nine weeks versus 1 year adjuvant trastuzumab in combination with chemotherapy: final results of the phase III

- randomized Short-HER study<sup>‡</sup>. *Ann Oncol*. 2018 Dec 1;29(12):2328–33.
135. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 May 10;31(14):1726–31.
  136. Rimawi MF, Niravath P, Wang T, Rexer BN, Forero A, Wolff AC, et al. TBCRC023: A Randomized Phase II Neoadjuvant Trial of Lapatinib Plus Trastuzumab Without Chemotherapy for 12 versus 24 Weeks in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019 Oct 29;26(4):821–7.
  137. Pérez-García JM, Gebhart G, Ruiz Borrego M, Stradella A, Bermejo B, Schmid P, et al. Chemotherapy de-escalation using an 18F-FDG-PET-based pathological response-adapted strategy in patients with HER2-positive early breast cancer (PHERGain): a multicentre, randomised, open-label, non-comparative, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Jun 1;22(6):858–71.
  138. Guarneri V, Dieci M V., Bisagni G, Frassoldati A, Bianchi G V., De Salvo GL, et al. De-escalated therapy for HR+/HER2+ breast cancer patients with Ki67 response after 2-week letrozole: results of the PerELISA neoadjuvant study. *Ann Oncol*. 2019 Jun 1;30(6):921–6.
  139. Harbeck N, Nitz UA, Christgen M, Kümmel S, Braun M, Schumacher C, et al. De-Escalated Neoadjuvant Trastuzumab-Emtansine With or Without Endocrine Therapy Versus Trastuzumab With Endocrine Therapy in HR+/HER2+ Early Breast Cancer: 5-Year Survival in the WSG-ADAPT-TP Trial. *J Clin Oncol*. 2023 Feb 21; JCO2201816.
  140. Cejalvo JM, Pascual T, Fernández-Martínez A, Brasó-Maristany F, Gomis RR, Perou CM, et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2018. Jun; 67:63-67.
  141. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortés J, et al. Molecular Features and Survival Outcomes of the Intrinsic Subtypes Within HER2-Positive Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2014 Aug 1;106(8).
  142. Dieci M V., Prat A, Tagliafico E, Paré L, Ficarra G, Bisagni G, et al. Integrated evaluation of PAM50 subtypes and immune modulation of pCR in HER2-positive breast cancer patients treated with chemotherapy and HER2-targeted agents in the CherLOB trial. *Ann Oncol*. 2016 Oct 1;27(10):1867–73.
  143. Fumagalli D, Venet D, Ignatiadis M, Azim HA, Maetens M, Rothé F, et al. RNA Sequencing to Predict Response to Neoadjuvant Anti-HER2 Therapy. *JAMA Oncol*. 2017 Feb;3(2):227.
  144. Prat A, Bianchini G, Thomas M, Belousov A, Cheang MCU, Koehler A, et al. Research-Based PAM50 Subtype Predictor Identifies Higher Responses and Improved Survival Outcomes in HER2-Positive Breast Cancer in the NOAH Study. *Clinical Cancer Research*. 2014 Jan 15;20(2):511–21.
  145. Schettini F, Pascual T, Conte B, Chic N, Brasó-Maristany F, Galván P, et al. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2020 Mar 1 ;84.
  146. Schettini F, Prat A. Dissecting the biological heterogeneity of HER2-positive breast cancer. *Breast*. 2021 Oct;59:339-350.
  147. de Haas SL, Slamon DJ, Martin M, Press MF, Lewis GD, Lambertini C, et al. Tumor biomarkers and efficacy in patients treated with trastuzumab emtansine + pertuzumab versus standard of care in HER2-positive early breast cancer: an open-label, phase III study (KRISTINE). *Breast Cancer Res*. 2023 Dec 1;25(1):2.
  148. Griguolo G, Brasó-Maristany F, González-Farré B, Pascual T, Chic N, Saurí T, et al. ERBB2 mRNA Expression and Response to Ado-Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in HER2-Positive Breast

- Cancer. *Cancers*. 2020 Jul 14;12(7):1902.
149. Prat A, Pascual T, De Angelis C, Gutierrez C, Llombart-Cussac A, Wang T, et al. HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade. *J Natl Cancer Inst*. 2020 Jan 1;112(1):46–54.
  150. Bianchini G, Gianni L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol*. 2014 Feb 1;15(2):e58–68.
  151. Bianchini G, Pusztai L, Pienkowski T, Im YH, Bianchi G V., Tseng LM, et al. Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. *Ann Oncol*. 2015 Dec 1;26(12):2429–36.
  152. Ignatiadis M, Van Den Eynden G, Roberto S, Fornili M, Bareche Y, Desmedt C, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients Receiving Trastuzumab/Pertuzumab-Based Chemotherapy: A TRYPHAENA Substudy. *J Natl Cancer Inst*. 2019 Jan; 111(1):69-77,
  153. Guarneri V, Dieci M V, Griguolo G, Miglietta F, Girardi F, Bisagni G, et al. Trastuzumab-lapatinib as neoadjuvant therapy for HER2-positive early breast cancer: Survival analyses of the CHER-Lob trial. *Eur J Cancer*. 2021 ;153:133–41.
  154. Tanioka M, Fan C, Parker JS, Hoadley KA, Hu Z, Li Y, et al. Integrated Analysis of RNA and DNA from the Phase III Trial CALGB 40601 Identifies Predictors of Response to Trastuzumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer; *Clin Cancer Res*. 2018 Nov 1;24(21):5292-5304.
  155. Fernandez-Martinez A, Pascual T, Singh B, Nuciforo P, Rashid NU, Ballman K V., et al. Prognostic and Predictive Value of Immune-Related Gene Expression Signatures vs Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Early-Stage ERBB2/HER2-Positive Breast Cancer: A Correlative Analysis of the CALGB 40601 and PAMELA Trials. *JAMA Oncol*. 2023 Apr;9(4):490-499.
  156. Paplomata E, O'regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: Targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*. 2014 Apr 1;6(4):154–66.
  157. Martínez-Saéz O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2020 May 13;22(1):1–9.
  158. 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. *Annals of Oncology*. 2016 Aug 1;27(8):1519–25.
  159. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Oct 10;32(29):3212–20.
  160. Denkert C, Lambertini C, Fasching PA, Pogue-Geile KL, Mano MS, Untch M, et al. Biomarker Data from the Phase III KATHERINE Study of Adjuvant T-DM1 versus Trastuzumab for Residual Invasive Disease after Neoadjuvant Therapy for HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2023 Apr 14;29(8): 1569-1581.
  161. Chia SKL, Martin M, Holmes FA, Ejlertsen B, Delaloge S, Moy B, et al. PIK3CA alterations and benefit with neratinib: Analysis from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III ExteNET trial. *Breast Cancer Research*. 2019 Mar 11;21(1):1–9.
  162. Guarneri V, Dieci MV, Bisagni G, Brandes AA, Frassoldati A, Cavanna L, et al. PIK3CA Mutation in the ShorthER randomized adjuvant trial for patients with early HER2<sup>+</sup> breast cancer: Association with prognosis and integration with PAM50 subtype. *Clinical Cancer Research*. 2020 Nov 15;26(22):5843–51.

163. Rasti AR, Guimaraes-Young A, Datko F, Borges VF, Aisner DL, Shagisultanova E. PIK3CA Mutations Drive Therapeutic Resistance in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *JCO Precis Oncol* 2022;6 e2100370.
164. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006 Aug ;7(8):606–19.
165. Stern HM, Gardner H, Burzykowski T, Elatre W, O'Brien C, Lackner MR, et al. PTEN Loss Is Associated with Worse Outcome in HER2-Amplified Breast Cancer Patients but Is Not Associated with Trastuzumab Resistance. *Clin Cancer Res.* 2015 May 1;21(9):2065–74.
166. Rimawi MF, de Angelis C, Contreras A, Pareja F, Geyer FC, Burke KA, et al. Low PTEN Levels and PIK3CA Mutations Predict Resistance to Neoadjuvant Lapatinib and Trastuzumab without Chemotherapy in Patients with HER2 Over-Expressing Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Nov 7;167(3):731.
167. Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, Chen B, Geiger XJ, Jenkins RB, et al. Impact of PTEN protein expression on benefit from adjuvant trastuzumab in early-stage human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 trial. *J Clin Oncol.* 2013 Jun 10;31(17):2115–22.
168. Nuciforo PG, 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 Jul 1;26(7):1494–500.
169. Carbognin L, Miglietta F, Paris I, Dieci MV. Prognostic and Predictive Implications of PTEN in Breast Cancer: Unfulfilled Promises but Intriguing Perspectives. *Cancers* 2019 Sep 19 ;11(9):1401.
170. 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. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2007 Apr 18;99(8):628–38.
171. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1515–9.
172. Nuciforo P, Pascual T, Cortés J, Llombart-Cussac A, Fasani R, Paré L, et al. A predictive model of pathologic response based on tumor cellularity and tumor-infiltrating lymphocytes (CelTIL) in HER2-positive breast cancer treated with chemo-free dual HER2 blockade. *Annals of Oncology.* 2018;29:170–7.
173. Prat A, Guarneri V, As Pascual T, Bras O-Maristany F, Sanfeliu E, Par L, et al. Development and validation of the new HER2DX assay for predicting pathological response and survival outcome in early-stage HER2-positive breast cancer. *EBioMedicine.* 2022;75:103801.
174. Guarneri V, Brasó-Maristany F, Dieci MV, Griguolo G, Paré L, Marín-Aguilera M, et al. HER2DX genomic test in HER2-positive/hormone receptor-positive breast cancer treated with neoadjuvant trastuzumab and pertuzumab: A correlative analysis from the PerELISA trial. *EBioMedicine* 2022; 85:104320.
175. Waks AG, Ogayo ER, Paré L, Marín-Aguilera M, Brasó-Maristany F, Galván P, et al. Assessment of the HER2DX Assay in Patients With ERBB2-Positive Breast Cancer Treated With Neoadjuvant Paclitaxel, Trastuzumab, and Pertuzumab. *JAMA Oncol.* 2023 Jun 1;9(6):835-840.
176. Villacampa G, Tung NM, Pernas S, Paré L, Bueno-Muiño C, Echavarría I, et al. Association of HER2DX with pathological complete response and survival outcomes in HER2-positive breast cancer. *Annals of Oncology.* 2023 Jun 9 ; S0923-7534(23)00721-4.
177. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Sauer AG, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Nov 1;69(6):438–51.

178. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2015 12:10. 2015 Jun 30;12(10):573–83.
179. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis SP, Renoir JM, Corbo L. Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocr Rev.* 2011 Oct 1;32(5):597–622.
180. Fallowfield LJ. Evolution of breast cancer treatments: Current options and quality-of-life considerations. *European Journal of Oncology Nursing.* 2004 Jan 1 ;8(SUPPL. 2):S75–82.
181. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018 Jul 1;25(7):1783–5.
182. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.* 2020 Aug 1;77(2):181–5.
183. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Research .* 2010 Aug 24;12(4):1–12.
184. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 2008 Aug 25;124(1):31–42.
185. Iwamoto T, Booser D, Valero V, Murray JL, Koenig K, Esteva FJ, et al. Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology.* 2012 Mar 1;30(7):729–34.
186. Azim HA, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clinical Cancer Research.* 2012 Mar 1 ;18(5):1341–51.
187. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005 May 14;365(9472):1687–717.
188. Cejalvo JM, Martínez de Dueñas E, Galván P, García-Recio S, Burgués Gasió O, Paré L, et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017 May 1;77(9):2213–21.
189. Finn R, Liu Y, Martin M, Rugo H, Dieras V, Im SA, et al. Abstract P2-09-10: Comprehensive gene expression biomarker analysis of CDK 4/6 and endocrine pathways from the PALOMA-2 study. *Cancer Res.* 2018 Feb;78(4 Supplement):P2-09-10-P2-09–10.
190. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow. *Cancer Treat Rev .* 2014 Apr 1;40(3):434–44.
191. Piccart MJ, Kalinsky K, Gray R, Barlow WE, Poncet C, Cardoso F, et al. Gene expression signatures for tailoring adjuvant chemotherapy of luminal breast cancer: stronger evidence, greater trust. *Annals of Oncology.* 2021 Sep 1;32(9):1077–82.
192. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast Cancer Subtypes as Defined by the Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) among Women with Invasive Breast Cancer in California, 1999–2004. *Breast J.* 2009 Nov 1 ;15(6):593–602.
193. Albain K, Anderson S, Arriagada R, Barlow W, Bergh J, Bliss J, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012 Feb 2;379(9814):432.
194. Nitz U, Gluz O, Clemens M, Malter W, Reimer T, Nuding B, et al. West German study PlanB trial: Adjuvant four cycles of epirubicin and cyclophosphamide plus docetaxel versus six cycles of docetaxel and cyclophosphamide in HER2-negative early breast cancer. *Journal of Clinical*

- Oncology. 2019 Feb 20;37(10):799–808.
195. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Dec 1;5(1):1–31.
  196. Blum JL, Flynn PJ, Yothers G, Asmar L, Geyer CE, Jacobs SA, et al. Anthracyclines in early breast Cancer: The ABC Trials—USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). *Journal of Clinical Oncology*. 2017 Aug 10;35(23):2647–55.
  197. Gray R, Bradley R, Braybrooke J, Liu Z, Peto R, Davies L, et al. Articles Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. *The Lancet*. 2019;393:1440–52.
  198. Burstein HJ. Systemic Therapy for Estrogen Receptor–Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Dec 24 ;383(26):2557–70.
  199. Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KA, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor–positive breast cancer: ASCO clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology*. 2019 Feb 10;37(5):423–38.
  200. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2018 Jun 1;186:1–24.
  201. Fisher B, Bryant J, Dignam JJ, Wickerham DL, Mamounas EP, Fisher ER, et al. Tamoxifen, radiation therapy, or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less. *Journal of Clinical Oncology*. 2002 Oct 15;20(20):4141–9.
  202. Bradley R, Burrett J, Clarke M, Davies C, Duane F, Evans V, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *The Lancet*. 2015 Oct 3;386(10001):1341–52.
  203. Baek SY, Noh WC, Ahn SH, Kim HA, Ryu JM, Kim S II, et al. Adding ovarian function suppression to tamoxifen in young women with hormone-sensitive breast cancer who remain premenopausal or resume menstruation after chemotherapy: 8-year follow-up of the randomized ASTRRA trial. 2022 Jun 2;40(16\_suppl):506–506.
  204. Francis PA, Fleming GF, Láng I, Ciruelos EM, Bonnefoi HR, Bellet M, et al. Adjuvant Endocrine Therapy in Premenopausal Breast Cancer: 12-Year Results From SOFT. *Journal of Clinical Oncology*. 2023 Mar 1;41(7):1370-1375.
  205. Francis PA, Pagani O, Fleming GF, Walley BA, Colleoni M, Láng I, et al. Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jul 12;379(2):122–37.
  206. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, Weber WP, Poortmans P, Regan MM, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol*. 2021 Oct 1;32(10):1216–35.
  207. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jul 12;379(2):111–21.
  208. Kalinsky K, Barlow WE, Gralow JR, Meric-Bernstam F, Albain KS, Hayes DF, et al. 21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021 Dec 16 ;385(25):2336–47.
  209. Piccart M, van 't Veer LJ, Poncet C, Lopes Cardozo JMN, Delaloge S, Pierga JY, et al. 70-gene signature as an aid for treatment decisions in early breast cancer: updated results of the phase 3 randomised MINDACT trial with an exploratory analysis by age. *Lancet Oncol*. 2021 Apr 1;22(4):476–88.

210. Lænkholm AV, Jensen MB, Eriksen JO, Rasmussen BB, Knoop AS, Buckingham W, et al. PAM50 Risk of Recurrence Score Predicts 10-Year Distant Recurrence in a Comprehensive Danish Cohort of Postmenopausal Women Allocated to 5 Years of Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 10 ;36(8):735–40.
211. Ohnstad HO, Borgen E, Falk RS, Lien TG, Aaserud M, Sveli MAT, et al. Prognostic value of PAM50 and risk of recurrence score in patients with early-stage breast cancer with long-term follow-up. *Breast Cancer Research*. 2017 Nov 14;19(1):1–12.
212. Sestak I, Martín M, Dubsky P, Kronenwett R, Rojo F, Cuzick J, et al. Prediction of chemotherapy benefit by EndoPredict in patients with breast cancer who received adjuvant endocrine therapy plus chemotherapy or endocrine therapy alone. *Breast Cancer Res Treat*. 2019 Jul 30;176(2):377–86.
213. Ayala de la Peña F, Andrés R, Garcia-Sáenz JA, Manso L, Margelí M, Dalmau E, et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). *Clinical and Translational Oncology*. 2019 Jan 25;21(1):18–30.
214. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, et al. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jun 20 ;380(25):2395–405.
215. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Sep 6;98(17):1183–92.
216. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016 Aug 25;375(8):717–29.
217. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
218. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Aug 10;24(23):3726–34.
219. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Feb 2;26(5):721–8.
220. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Nov 19;373(21):2005–14.
221. TAILORx Update: 12-Year Recurrence and Survival Outcomes for Patients With Early-Stage Breast Cancer - The ASCO Post May 2023.
222. Partridge AH, Hughes ME, Warner ET, Ottesen RA, Wong YN, Edge SB, et al. Subtype-Dependent Relationship Between Young Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 20;34(27):3308–14.
223. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast Cancer in Young Women: Poor Survival Despite Intensive Treatment. *PLoS One*. 2009 Nov 11;4(11):e7695.
224. Azim HA, Partridge AH. Biology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Research*. 2014 Aug 27;16(4):1–9.
225. Luen SJ, Viale G, Nik-Zainal S, Savas P, Kammler R, Dell'Orto P, et al. Genomic characterisation of hormone receptor-positive breast cancer arising in very young women. *Annals of Oncology*. 2023 Apr;34(4):397-409.
226. Villarreal-Garza C, Ferrigno AS, De La Garza-Ramos C, Barragan-Carrillo R, Lambertini M, Azim HA. Clinical utility of genomic signatures in young breast cancer patients: a systematic review.

- NPJ Breast Cancer 2020 Sep 6:46.
227. Swain SM, Jeong JH, Geyer CE, Costantino JP, Pajon ER, Fehrenbacher L, et al. Longer Therapy, Iatrogenic Amenorrhea, and Survival in Early Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010 Jun 3 ;362(22):2053–65.
  228. Walshe JM, Denduluri N, Swain SM. Amenorrhea in premenopausal women after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Dec 20;24(36):5769–79.
  229. Berliere M, Dalenc F, Malingret N, Vindevogel A, Piette P, Roche H, et al. Incidence of reversible amenorrhea in women with breast cancer undergoing adjuvant anthracycline-based chemotherapy with or without docetaxel. *BMC Cancer*. 2008 Feb 21;8(1):1–9.
  230. Dellapasqua S, Colleoni M, Gelber RD, Goldhirsch A. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(8):1736–50.
  231. Poorvu PD, Hu J, Zheng Y, Gelber SI, Ruddy KJ, Tamimi RM, et al. Treatment-related amenorrhea in a modern, prospective cohort study of young women with breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2021 7:1. 2021 Jul 27;7(1):1–7.
  232. Swain SM, Land SR, Ae MWR, Ae JPC, Cecchini RS, Eleftherios AE, et al. Amenorrhea in premenopausal women on the doxorubicin-and-cyclophosphamide-followed-by-docetaxel arm of NSABP B-30 trial.
  233. Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, Paskett ED, Naftalis EZ, Singletary SE, et al. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *J Clin Oncol*. 2006 Mar 1;24(7):1045–51.
  234. Swain SM, Jeong JH, Wolmark N. Amenorrhea from Breast Cancer Therapy — Not a Matter of Dose. *New England Journal of Medicine*. 2010 Dec 2;363(23):2268–70.
  235. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016 Nov 17;375(20):1925–36.
  236. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Annals of Oncology*. 2018 Jul 1;29(7):1541–7.
  237. Tripathy D, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Harbeck N, et al. Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Jul;19(7):904-915.
  238. Johnston S, Martin M, Di Leo A, Im SA, Awada A, Forrester T, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2019 5:1. 2019 Jan 17;5(1):1–8.
  239. Finn RS, Rugo HS, Dieras VC, Harbeck N, Im SA, Gelmon KA, et al. Overall survival (OS) with first-line palbociclib plus letrozole (PAL+LET) versus placebo plus letrozole (PBO+LET) in women with estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer (ER+/HER2- ABC): Analyses from PALOMA-2. [https://doi.org/10.1200/JCO20224017\\_supplLBA1003](https://doi.org/10.1200/JCO20224017_supplLBA1003). 2022 Jun 8;40(17\_suppl):LBA1003–LBA1003.
  240. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Hart L, et al. Overall Survival with Ribociclib plus Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Mar 10;386(10):942–50.
  241. Lu YS, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Cardoso F, et al. Updated Overall Survival of Ribociclib plus Endocrine Therapy versus Endocrine Therapy Alone in Pre-and Perimenopausal Patients with HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> Advanced Breast Cancer in MONALEESA-7: A Phase III Randomized Clinical Trial. *Clin Cancer Res*. 2022;28:851–60.
  242. Goetz et al; MONARCH-3 interim overall survival (OS) results of abemaciclib plus a nonsteroidal aromatase inhibitor (NSAI) in patients (pts) with HR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup> advanced breast cancer (ABC).



- Abstract. *Annals of Oncology* (2022) 33 (suppl\_7): S808-S869.
243. Loibl S, Marmé F, Martin M, Untch M, Bonnefoi H, Kim SB, et al. Palbociclib for residual high-risk invasive HR-positive and HER2-negative early breast cancer-the penelope-B trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2021 May 10;39(14):1518–30.
  244. Gnant M, Dueck AC, Frantal S, Martin M, Burstein HJ, Greil R, et al. Adjuvant Palbociclib for Early Breast Cancer: The PALLAS Trial Results (ABCSG-42/AFT-05/BIG-14-03). *J Clin Oncol*. 2022 Jan 20;40(3):282–93.
  245. Johnston SRD, Toi M, O’Shaughnessy J, Rastogi P, Campone M, Neven P, et al. Abemaciclib plus endocrine therapy for hormone receptor-positive, HER2-negative, node-positive, high-risk early breast cancer (monarchE): results from a preplanned interim analysis of a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2023 Jan 1;24(1):77–90.
  246. Slamon DJ, Fasching PA, Patel R, Verma S, Hurvitz SA, Chia SKL, et al. NATALEE: Phase III study of ribociclib (RIBO) + endocrine therapy (ET) as adjuvant treatment in hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-) early breast cancer (EBC). 2019 May 26;37(15\_suppl):TPS597–TPS597.
  247. Novartis Kisqali® Phase III NATALEE trial meets primary endpoint at interim analysis demonstrating clinically meaningful benefit in broad population of patients with early breast cancer | Novartis.
  248. FDA approves abemaciclib with endocrine therapy for early breast cancer | FDA.
  249. FDA expands early breast cancer indication for abemaciclib with endocrine therapy | FDA.
  250. Giordano SH, Freedman RA, Somerfield MR, Chavez-MacGregor M, Comander AH, Dayao Z, et al. Abemaciclib With Endocrine Therapy in the Treatment of High-Risk Early Breast Cancer: ASCO Optimal Adjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy Guideline Rapid Recommendation Update. *J Clin Oncol*. 2022 Jan 20;40(3):307–9.
  251. Johnston S, Puhalla S, Wheatley D, Ring A, Barry P, Holcombe C, et al. Randomized Phase II Study Evaluating Palbociclib in Addition to Letrozole as Neoadjuvant Therapy in Estrogen Receptor-Positive Early Breast Cancer: PALLET Trial. *J Clin Oncol*. 2019 Jan 20;37(3):178–89.
  252. Hurvitz SA, Martin M, Press MF, Chan D, Fernandez-Abad M, Petru E, et al. Potent Cell-Cycle Inhibition and Upregulation of Immune Response with Abemaciclib and Anastrozole in neoMONARCH, Phase II Neoadjuvant Study in HR+/HER2- Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020 Feb 1;26(3):566–80.
  253. Ma CX, Gao F, Luo J, Northfelt DW, Goetz M, Forero A, et al. NeoPalAna: Neoadjuvant Palbociclib, a Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor, and Anastrozole for Clinical Stage 2 or 3 Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug;23(15):4055–65.
  254. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131–49.
  255. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, Prado M Del, Lallena MJ, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs*. 2014;32(5):825–37.
  256. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy. *Cancer Discov*. 2016 Apr 1;6(4):353–67.
  257. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A’Hern R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Jan ;99(2):167–70.
  258. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Goncalves R, Sanati S, Creighton CJ, et al. Ki67 proliferation index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: Results from the American college of surgeons oncology group

- Z1031 trial (alliance). *Journal of Clinical Oncology*. 2017 Apr 1;35(10):1061–9.
259. Smith I, Robertson J, Kilburn L, Wilcox M, Evans A, Holcombe C, et al. Long-term outcome and prognostic value of Ki67 after perioperative endocrine therapy in postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer (POETIC): an open-label, multicentre, parallel-group, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Nov 1;21(11):1443–54.
  260. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Goncalves R, Sanati S, Creighton CJ, et al. Ki67 Proliferation Index as a Tool for Chemotherapy Decisions During and After Neoadjuvant Aromatase Inhibitor Treatment of Breast Cancer: Results From the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). *J Clin Oncol*. 2017 Apr 1;35(10):1061–9.
  261. Cottu P, Dureau S, Lerebours F, Desmoulins I, Heudel P e, Duhoux FP, et al. Letrozole and palbociclib versus chemotherapy as neoadjuvant therapy of high-risk luminal breast cancer. *Annals of Oncology*. 2018;29:2334–40.
  262. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, Boughey JC, Coles C, Curigliano G. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NACBG collaboration. *Ann. Oncol*. 2015 Jul;26(7):1280-91.
  263. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 1;25(28):4414–22.
  264. Delaloge S, Dureau S, D'Hondt V, Desmoulins I, Heudel PE, Duhoux FP, et al. Survival outcomes after neoadjuvant letrozole and palbociclib versus third generation chemotherapy for patients with high-risk oestrogen receptor-positive HER2-negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2022 May 1;166:300–8.
  265. Prat A, Saura C, Pascual T, Hernando C, Muñoz M, Paré L, et al. Ribociclib plus letrozole versus chemotherapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative, luminal B breast cancer (CORALLEEN): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan 1;21(1):33–43.
  266. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics* . 2015 Aug 22;8(1):1–14.
  267. Agostinetti E, Gligorov J, Piccart M. Systemic therapy for early-stage breast cancer: learning from the past to build the future. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2022 19:12. 2022 Oct 17;19(12):763–74.
  268. Hayes D. Predictive and Prognostic Markers in Cancer. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2011Feb; 9(2):130-2.
  269. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287–312.
  270. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, et al. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Jun 20;380(25):2395–405.
  271. Nitz UA, Gluz O, Christgen M, Grischke EM, Augustin D, Kuemmel S, et al. De-escalation strategies in HER2-positive early breast cancer (EBC): Final analysis of the WSG-ADAPT HER2+/HR- phase II trial: Efficacy, safety, and predictive markers for 12 weeks of neoadjuvant dual blockade with trastuzumab and pertuzumab ± weekly paclitaxel. *Annals of Oncology*. 2017 Nov 1;28(11):2768–72.
  272. Kwa M, Makris A, Esteva FJ. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Oct 1;14(10):595–610.

273. Brandão M, Caparica R, Malorni L, Prat A, Carey LA, Piccart M. What is the real impact of estrogen receptor status on the prognosis and treatment of HER2-positive early breast cancer? *Clin Cancer Res*. 2020 Jun 6 ;26(12):2783.
274. Vaz-Luis I, Francis PA, Di Meglio A, Stearns V. Challenges in Adjuvant Therapy for Premenopausal Women Diagnosed With Luminal Breast Cancers. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2021 Jun 14;(41):e47–61.
275. Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. *Lancet*. 2007 May 19;369(9574):1711–23.
276. Pagani O, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Láng I, Gomez HL, et al. Adjuvant Exemestane With Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer: Long-Term Follow-Up of the Combined TEXT and SOFT Trials. *J Clin Oncol*. 2023 Mar 1;41(7).
277. Namuche F, Ruiz RE, Morante Cruz ZD, Urrunaga D, Ziegler G, Mantilla R, et al. Oncotype Dx results in patients ≤40 years: Does age matter? New insights. *Annals of Oncology*. 2018 Oct 1;29:viii67–8.
278. Saha P, Regan MM, Pagani O, Francis PA, Walley BA, Ribí K, et al. Treatment efficacy, adherence, and quality of life among women younger than 35 years in the international breast cancer study group TEXT and SOFT adjuvant endocrine therapy trials. *Journal of Clinical Oncology*. 2017 Sep 20;35(27):3113–22.
279. Bernhard J, Ribí K, Bernhard J, Luo W, Ribí K, Colleoni M, et al. Patient-reported outcomes with adjuvant exemestane versus tamoxifen in premenopausal women with early breast cancer undergoing ovarian suppression (TEXT and SOFT): a combined analysis of two phase 3 randomised trials. *Articles Lancet Oncol*. 2015;16:848–58.
280. Goel S, Decristo MJ, Watt AC, Brinjones H, Sceneay J, Li BB, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*. 2017 Aug 24;548(7668):471–5.
281. Lelliott EJ, Kong IY, Zethoven M, Ramsbottom KM, Martelotto LG, Meyran D, et al. CDK4/6 Inhibition Promotes Antitumor Immunity through the Induction of T-cell Memory. *Cancer Discov*. 2021 Oct 1;11(10):2582–601.
282. Scirocchi F, Scagnoli S, Botticelli A, Filippo A Di, Napoletano C, Zizzari IG, et al. Immune effects of CDK4/6 inhibitors in patients with HR + /HER2 À metastatic breast cancer: Relief from immunosuppression is associated with clinical response; *EBioMedicine*. 2022 May 1;79.
283. Torres-Guzmán R, Calsina B, Hermoso A, Baquero C, Alvarez B, Amat J, et al. Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*. 2017 May 10;8(41):69493–507.
284. Scirocchi F, Scagnoli S, Botticelli A, Di Filippo A, Napoletano C, Zizzari IG, et al. Immune effects of CDK4/6 inhibitors in patients with HR+/HER2- metastatic breast cancer: Relief from immunosuppression is associated with clinical response. *EBioMedicine*. 2022 May 1;79.
285. Rugo HS, Delord JP, Im SA, Ott PA, Piha-Paul SA, Bedard PL, et al. Clinical Trials: Immunotherapy Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2018 Jun 15;24(12):2804–2811.
286. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, Huber L, Forest A, Amaladas N, et al. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep*. 2018 Mar 13;22(11):2978–94.
287. Rugo HS, Kabos P, Beck JT, Jerusalem G, Wildiers H, Sevillano E, et al. Abemaciclib in combination with pembrolizumab for HR+, HER2– metastatic breast cancer: Phase 1b study. *NPJ Breast Cancer* 2022 8:1. 2022 Nov 5;8(1):1–8.

288. Masuda J, Tsurutani J, Masuda N, Tanabe Y, Iwasa T, Takahashi M, et al. Abstract PS12-10: Phase II study of nivolumab in combination with abemaciclib plus endocrine therapy in patients with HR+, HER2- metastatic breast cancer: WJOG11418B NEWFLAME trial. *Cancer Res.* 2021 Feb 15;81(4\_Supplement):PS12-10.
289. ESMO-BC 2022: Neoadjuvant nivolumab (NIVO) + palbociclib (PALBO) + anastrozole (ANA) for estrogen receptor-positive (ER+)/human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2\_) primary breast cancer (BC): CheckMate 7A8 [Internet].
290. Santa-Maria C, Wang C, Cimino-Mathews A, Roussos-Torres E, Connolly R, Wolff A, et al. Abstract OT3-02-03: IMMUNE mOdulation in early stage estrogen receptor positive breast cancer treated with neoADjuvant Avelumab, Palbociclib, and Tamoxifen: The ImmunoADAPT study (NCT03573648). *Cancer Res.* 2019 Feb 15 ;79(4\_Supplement):OT3-02-3.