

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Evaluación del grado de conversión de los
receptores HER2, RE y RPg entre el cáncer de mama
primario y sus respectivas metástasis**

Presentada por: Eduardo Martínez de Dueñas

Dirigida por: Prof. Dra. Ana Lluch Hernández

Valencia, febrero 2017

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Evaluación del grado de conversión de los
receptores HER2, RE y RPg entre el cáncer de mama
primario y sus respectivas metástasis**

Presentada por: Eduardo Martínez de Dueñas

Dirigida por: Prof. Dra. Ana Lluch Hernández

Valencia, febrero 2017

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Tesis Doctoral:

Evaluación del grado de conversión de los receptores HER2, RE y RPg entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis

Estudios de doctorado:

Programa de Doctorado en Medicina

Doctorando:

D. Eduardo Martínez de Dueñas

Directora:

Prof. Dra. Ana Lluch Hernández



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

La directora de tesis:

Ana Lluch Hernández, Catedrática de Oncología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefa del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "***Evaluación del grado de conversión de los receptores HER2, RE y RPg entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis***" ha sido realizada bajo mi dirección por Eduardo Martínez de Dueñas, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid, y reúne, a mi juicio, todos los requisitos para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado en Valencia, a 6 de febrero de 2017.

Fdo.: Prof. Ana Lluch Hernández

Nunca midas la altura de una montaña hasta que hayas alcanzado la cima; entonces podrás ver lo pequeña que era.

Dag Hammarskjöld

A mis padres

A Daniel, Alberto y Pablo

A Merche, por tu bondad, por tu paciencia
infinita, por estar siempre ahí...

AGRADECIMIENTOS

A Ana Lluch, mi *maestra*, por haberme infundido la ilusión de realizar esta tesis. Gracias por tu amistad y tu constante y generoso apoyo. Pero sobretodo, por tu ejemplo, tu compromiso, tu vocación, tus valores y tus consejos que han iluminado e inspirado mi carrera profesional y también mi vida personal. De corazón, ¡gracias, Ana!

A Ana María González Angulo, que inspiró y apoyó este estudio. Con el deseo de que sigas contribuyendo con nuevas y brillantes ideas al conocimiento del cáncer de mama y a avanzar en su tratamiento.

A GEICAM, porque su eficiente gestión y coordinación han hecho posible que este proyecto se haya desarrollado de forma impecable.

A todos los investigadores y profesionales que han colaborado en el estudio ConvertHER y que han hecho posible este trabajo.

A Octavio Burgués y a Jaime Ferrer, por su especial interés y dedicación a este proyecto.

A Roche, y en especial a Elena Bernedo y a Adela Martínez, por la financiación del estudio, por su apoyo e ilusión durante todo el proyecto.

A todos aquellos que sin nombrarlos expresamente han contribuido al desarrollo de este trabajo.

A las pacientes que han aceptado generosa y desinteresadamente participar en este estudio colaborando así al beneficio de otras pacientes.

A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Provincial de Castellón. Especialmente a Ángela López, por su humanidad con los pacientes, su compañerismo y su infatigable esfuerzo en el trabajo cotidiano; y a Santiago Olmos, por su amistad y su sincero y leal apoyo en los momentos complicados.

A Lola Chóver, de quien admiro su paciencia, su delicadeza con los pacientes, su humildad y su calidad humana y profesional. Ha sido un verdadero honor compartir el trabajo diario durante todos estos años.

A mis compañeros y amigos Vicente Carañana, Kino Gavilá, Begoña Bermejo, Ana Santaballa, Vega Iranzo, Amparo Ruiz y Antonio Llombart, con los que he ido creciendo profesionalmente y con los que he compartido muy buenos momentos.

A Teresa García, compañera de fatigas durante mi periodo de residencia y amiga entrañable, con la que he compartido mis primeras e inolvidables experiencias como médico y como oncólogo. De alguna manera, me siento en deuda con ella.

A todas y cada una de mis pacientes y sus familias, de las que he aprendido y sigo aprendiendo continuamente.

A mi familia por todo el tiempo robado y dedicado a esta tesis.

RESUMEN

Tradicionalmente, las decisiones terapéuticas tanto del cáncer de mama precoz como de los estadios avanzados se han basado en los marcadores predictivos del tumor primario, tales como el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RPg) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), asumiendo que éstos permanecían inmutables a nivel de la recaída metastásica.

El objetivo general de esta tesis era investigar si el estado de los receptores HER2, RE y RPg realmente puede cambiar durante la progresión del cáncer de mama y profundizar en las causas y en el impacto clínico de dichos cambios. El objetivo principal era determinar la tasa de conversión de los receptores HER2, RE y RPg entre los tumores primarios de mama y sus respectivas lesiones metastásicas.

Se incluyeron pacientes con cáncer de mama localmente recidivante o metastásico de 31 hospitales españoles, bien en primera recaída o tras sucesivas progresiones de la enfermedad, que disponían de una muestra apropiadamente conservada de su tumor primario y tenían programada una biopsia de una lesión supuestamente recidivante o metastásica. Se determinó el estado de los receptores hormonales y HER2 mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fluorescente en muestras pareadas (tumor primario – metástasis) de forma ciega y utilizando la misma metodología en un laboratorio central para minimizar la variabilidad inherente a las técnicas de análisis. Estos resultados se compararon con las determinaciones realizadas en las instituciones locales.

En total se incluyeron 196 pacientes, excluyéndose a 12 pacientes de la población evaluable por incapacidad para realizar la biopsia (n=4) o bien porque los resultados de la biopsia correspondieron a tejido normal (n=3), enfermedad benigna (n=3) o una segunda neoplasia (n=2). Las tasas de conversión de los receptores determinados en el laboratorio central, aun siendo menores que las determinadas en los laboratorios locales, eran clínicamente significativas (HER2: 3% vs 16%, RE: 13% vs 21%, RPg: 28% vs 35%, respectivamente). Al comparar los resultados de los laboratorios locales y el central, hubo una buena concordancia en la determinación de HER2 tanto en el tumor primario como en las metástasis, y en la expresión del RE en las metástasis, mientras que el RE en el tumor primario y el RPg mostraron una modesta concordancia.

Los oncólogos modificaron sus planes terapéuticos en el 31% de las pacientes cuyo subtipo tumoral había cambiado en la metástasis. Estos resultados refuerzan la recomendación de realizar biopsias confirmatorias de las metástasis de cáncer de mama, no sólo para evitar un diagnóstico erróneo de recaída, sino también para identificar cambios en los biomarcadores con la posibilidad de optimizar el tratamiento adaptándolo al perfil biológico de la enfermedad metastásica.

ÍNDICE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Generalidades del cáncer de mama	3
1.1.1 Datos epidemiológicos.....	6
1.1.2 Etiología	8
1.2. Diagnóstico y tratamiento del tumor primario	10
1.2.1 Diagnóstico del tumor primario.....	10
1.2.2 Estadío y clasificación TNM.....	11
1.2.3 Factores pronósticos y predictivos	11
1.2.4 Receptor Estrogénico (RE)	13
1.2.5 Receptor de Progesterona (RPg).....	19
1.2.6 Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2).....	19
1.2.7 Otros factores pronósticos y predictivos	25
1.2.7.1 Índice de proliferación nuclear Ki-67	25
1.2.7.2 Perfiles de expresión génica.....	27
1.2.8 Tratamiento del tumor primario.....	32
1.3. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva	35
1.3.1 Diagnóstico de la recidiva	35
1.3.1.1 Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF).....	38
1.3.1.2 Biopsia con aguja gruesa (BAG).....	39
1.3.1.3 Tissue Microarray (TMA).....	40
1.3.2 Tratamiento del cáncer de mama metastásico (CMM)	42
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	47
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
4. OBJETIVOS	55
4.1. Objetivo principal	55
4.2. Objetivos secundarios	55
5. PACIENTES Y MÉTODO	59
5.1. Diseño del estudio	59
5.2. Población de estudio	60
5.2.1 Criterios de inclusión	60
5.2.2 Criterios de exclusión.....	61
5.3. Procedimientos del estudio	61
5.3.1 Visitas del estudio	62
5.3.1.1 Visita de Registro.....	62
5.3.1.2 Visitas de seguimiento	62
5.4. Procesamiento de las muestras	63
5.4.1 Laboratorios locales.....	63
5.4.2 Laboratorio central	63
5.5. Fuente y tratamiento de la información.....	65

5.6. Variables del estudio	65
5.6.1 Variable principal	65
5.6.2 Variables secundarias	66
5.7. Análisis estadístico	66
5.7.1 Análisis planificados intermedio y final	67
5.7.2 Determinación del tamaño de la muestra	68
5.8. Aspectos éticos y legales.....	69
5.9. Financiación del estudio	69
6. RESULTADOS	73
6.1. Descripción general de la población del estudio.....	73
6.2. Características de las pacientes a la entrada en el estudio	75
6.2.1 Distribución por subtipos del tumor primario	77
6.2.1.1 Laboratorios Central.....	77
6.2.1.2 Laboratorio Locales.....	77
6.2.2 Estado de los receptores en el tumor primario	78
6.2.2.1 Laboratorio Central	78
6.2.2.2 Laboratorios Locales	78
6.2.3 Localización de la biopsia.....	79
6.2.4 Tratamiento recibido antes de la inclusión en el estudio	80
6.2.4.1 Tratamiento del tumor primario	80
6.2.4.2 Tratamiento de la recaída	81
6.2.5 Estado al cierre de la base de datos.....	81
6.3. Tasa de conversión del estado de los receptores entre el tumor primario y sus metástasis	81
6.3.1 Tasa de conversión según el laboratorio central	82
6.3.1.1 Conversión de HER2	82
6.3.1.2 Conversión del RE.....	83
6.3.1.3 Conversión del RPg.....	84
6.3.1.4 Conversión de los RH.....	84
6.3.1.5 Tasa de conversión de HER2, RE y RPg en los diferentes subtipos definidos por el laboratorio central	85
6.3.2 Tasa de conversión según laboratorios locales.....	87
6.3.2.1 Conversión de HER2	87
6.3.2.2 Conversión del RE.....	88
6.3.2.3 Conversión del RPg.....	89
6.3.2.4 Conversión de los RH.....	89
6.4. Cambios de subtipo tumoral entre el tumor primario y sus metástasis	91
6.4.1 Cambio de subtipo según laboratorio central	91
6.4.2 Cambio de subtipo según laboratorios locales	92
6.5. Concordancia en la expresión de receptores entre los laboratorios locales y el laboratorio central	95
6.6. Relación entre la conversión de los receptores y la localización de las biopsias	96
6.7. Relación entre la conversión de los receptores y el tratamiento previo.....	98
6.8. Influencia del resultado de la biopsia en el plan terapéutico posterior.....	105
6.8.1 Conversión de receptores y cambio de tratamiento	105

6.8.2	Influencia del cambio de subtipo tumoral en el plan terapéutico.....	107
6.9.	Influencia de la conversión de los receptores en la respuesta al tratamiento y el pronóstico	109
6.9.1	Influencia de la conversión de los receptores en la tasa de respuesta a los subsiguientes tratamientos	109
6.9.2	Influencia de la conversión de los receptores en el tiempo hasta la progresión a los subsiguientes tratamientos.....	111
6.9.3	Comparación de la SLP al primer tratamiento de las pacientes con/sin conversión de receptores	114
6.9.4	Supervivencia global	116
7.	DISCUSIÓN	121
7.1.	Análisis de los resultados.....	123
7.2.	Causas de las conversiones	130
7.3.	Contribuciones, fortalezas y limitaciones del estudio.....	133
7.4.	Recomendaciones actuales de las guías clínicas	135
8.	CONCLUSIONES	139
9.	BIBLIOGRAFÍA	143
10.	ANEXOS.....	161
10.1.	Aprobación por el CEIC de referencia	161
10.2.	Listado de centros e investigadores participantes en el estudio CONVERTHER	163
10.3.	Hoja de información al paciente	164
10.4.	Consentimiento informado	166
10.5.	Publicación	168

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA1, BRCA2	Genes de susceptibilidad al cáncer de mama 1, 2
CMM	Cáncer de mama metastásico
EBCTC	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
EMA	European Medicines Agency
ESMO	European Society for Medical Oncology
FDA	USA Food and Drug Administration
GEICAM	Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HR	Hazard Ratio (razón de riesgo)
IA	Inhibidores de Aromatasa
IHQ	Inmunohistoquímica
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
RE	Receptor Estrogénico
RPg	Receptor de Progesterona
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SG	Supervivencia Global
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
TOPO2A	Gen de la topoisomerasa II α

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cáncer de mama

En 2010, 1,6 millones de mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de mama a nivel mundial, casi tres veces más que en 1980, lo que convierte al cáncer de mama en el tumor maligno más frecuente en la población femenina. En 2012 se diagnosticaron en España 25.215 cánceres de mama, lo que representa un 29% de todos los cánceres diagnosticados en las mujeres. Además, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina española, contabilizando un 15,5% del total de fallecimientos por cáncer.

El cáncer de mama se clasifica actualmente en cuatro o cinco subtipos moleculares determinados en la práctica clínica mediante análisis inmunohistoquímicos (IHQ) del receptor estrogénico (RE), receptor de progesterona (RPg) e índice de proliferación celular (medido por la expresión de la proteína Ki-67) junto al análisis IHQ o hibridación *in situ* (ISH) del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). De esta manera quedan definidos cinco subtipos clínicamente útiles como el **luminal A** (RE- y/o RPg-positivo/HER2-negativo y Ki-67 bajo), **luminal B** (RE- y/o RPg-positivo/HER2-negativo y Ki-67 alto), **luminal B/HER2** (RE- y/o RPg-positivos/HER2-positivo), **HER2** (HER2-positivo/RE- y RPg-negativos) y **triple negativo** (RE-negativo/RPg-negativo y HER2-negativo) con diferentes características moleculares, diferente pronóstico y recomendaciones terapéuticas específicas.

El cáncer de mama localizado se trata habitualmente mediante la extirpación quirúrgica. A menudo se administra posteriormente un tratamiento adyuvante o complementario para erradicar posibles micrometástasis diseminadas y reducir el riesgo de recaída del cáncer de mama. Los tratamientos adyuvantes más importantes son la radioterapia, la quimioterapia, el tratamiento dirigido anti-HER2 y la hormonoterapia. A las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado se les ofrece un tratamiento preoperatorio o neoadyuvante de quimioterapia, terapia anti-HER2 u hormonoterapia (según el subtipo tumoral) para reducir la extensión del tumor y facilitar el tratamiento quirúrgico. Sin embargo, el tratamiento neoadyuvante también es un tratamiento estándar para las pacientes con cáncer de mama operable con la ventaja, respecto al mismo tratamiento adyuvante o postoperatorio, que permite adaptar el tratamiento en función de la respuesta obtenida. La revisión Cochrane de 2007 no demostró diferencias significativas en la supervivencia global (SG) entre las pacientes que recibieron quimioterapia pre- o postoperatoria.¹

La supervivencia a 5 y 10 años de las pacientes con cáncer de mama ha aumentado progresivamente durante los últimos 30 años. Es poco probable que esta mejoría de la supervivencia se deba a las mejores técnicas quirúrgicas, ya que las recomendaciones actuales abogan por extirpaciones más conservadoras, sino más bien a la detección más temprana a través de programas de cribado mamográfico y por el uso extendido de tratamientos adyuvantes cada vez más eficaces. Hace unas dos décadas se iniciaron los programas poblacionales de detección precoz de cáncer de mama para mujeres entre 50 y 70 años, tras la publicación de varios estudios aleatorizados que demostraron una reducción de la mortalidad por cáncer de mama.²

Por otro lado, periódicamente se han ido publicando las revisiones sistemáticas de Oxford realizadas por el *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG) basadas en metanálisis de los datos individuales de las pacientes incluidas en todos los estudios prospectivos y aleatorizados de tratamiento adyuvante. La actualización del metanálisis de 2011 demostraba que la quimioterapia adyuvante reducía en un 30% el riesgo de mortalidad por cáncer de mama a 10 años.³ Además, en las pacientes con tumores que expresaban el receptor estrogénico (RE) o RE-positivos, 5 años de tamoxifeno reducía en un tercio la mortalidad por cáncer de mama tras 15 años de seguimiento.⁴ Datos más recientes indican que 10 años de tamoxifeno aportan un beneficio discretamente mayor. A su vez, los inhibidores de aromatasa reducen la tasa de recaída en un 30% y la tasa de mortalidad por cáncer de mama a 10 años en un 15% respecto a tamoxifeno en mujeres postmenopáusicas; por lo tanto reducen aproximadamente en un 40% el riesgo de muerte respecto a no administrar ningún tratamiento hormonal.⁵ Y en las pacientes con tumores que sobreexpresan el receptor HER2 la combinación de trastuzumab con quimioterapia adyuvante produce un significativo beneficio en supervivencia libre de enfermedad (SLE; riesgo relativo [RR]=0.69) y en supervivencia global (SG; RR=0.78) comparado con quimioterapia sola.⁶ Finalmente, la radioterapia postoperatoria reducía tanto el riesgo de recaída local a 10 años como el riesgo de mortalidad por cáncer de mama a 15 años.⁷

La decisión de administrar un tratamiento (neo)-adyuvante a una paciente particular se basa en el pronóstico de la paciente y en los biomarcadores predictivos determinados a partir del tejido del tumor de mama primario. Los factores pronósticos y predictivos actualmente utilizados en la práctica clínica que nos permiten estimar el riesgo de recaída y de muerte y el potencial beneficio del tratamiento adyuvante son el tamaño del tumor, la afectación ganglionar, el grado y tipo histológicos, la edad, el estado de los receptores RE, RPg y HER2, y el índice de proliferación celular (determinado por la expresión de la proteína Ki-67).⁸

Aun así, a pesar de los indudables logros conseguidos con los tratamientos adyuvantes, aproximadamente el 20 % de todas las pacientes con cáncer de mama localizado sufrirá una recaída y la mayoría de ellas morirá como consecuencia de la

enfermedad metastásica. Anteriormente, el diagnóstico de la recaída del cáncer de mama se basaba con frecuencia en una combinación de signos clínicos y/o radiológicos y no siempre se confirmaba la recidiva con un diagnóstico anatomopatológico. Aún hoy en día el tratamiento sistémico de la enfermedad metastásica y/o de la recidiva local se basa en la evaluación de biomarcadores del tumor primario. Los receptores RE, RPg y HER2 son de particular interés ya que son predictores importantes de la sensibilidad al tratamiento hormonal y a las terapias anti-HER2, respectivamente. Sin embargo, datos emergentes indican un cierto nivel de discordancia de RE, RPg y HER2 entre el tumor primario y sus metástasis correspondientes, e incluso algunos estudios han encontrado un valor pronóstico de tales cambios en el estado de los receptores. Actualmente las guías clínicas tanto nacionales (SEOM)⁹ como internacionales (*ESMO guidelines*,^{10,11} *National Comprehensive Cancer Network [NCCN v.2.2016]*¹² y ASCO¹³) han incorporado la recomendación de biopsiar una posible recaída, siempre que sea posible, en pacientes con cáncer de mama. A pesar de estas recomendaciones (basadas en dos estudios clínicos prospectivos y una larga lista de estudios retrospectivos), la confirmación de una lesión recidivante mediante biopsia a menudo no se realiza sistemáticamente en algunas instituciones como parte de la rutina clínica. Las biopsias pueden confirmar el diagnóstico, revelar segundos tumores malignos o condiciones benignas, así como demostrar cambios en la expresión de los biomarcadores utilizados clínicamente como RE, RPg y HER2, cambiando el manejo clínico en una de cada 6-7 pacientes.

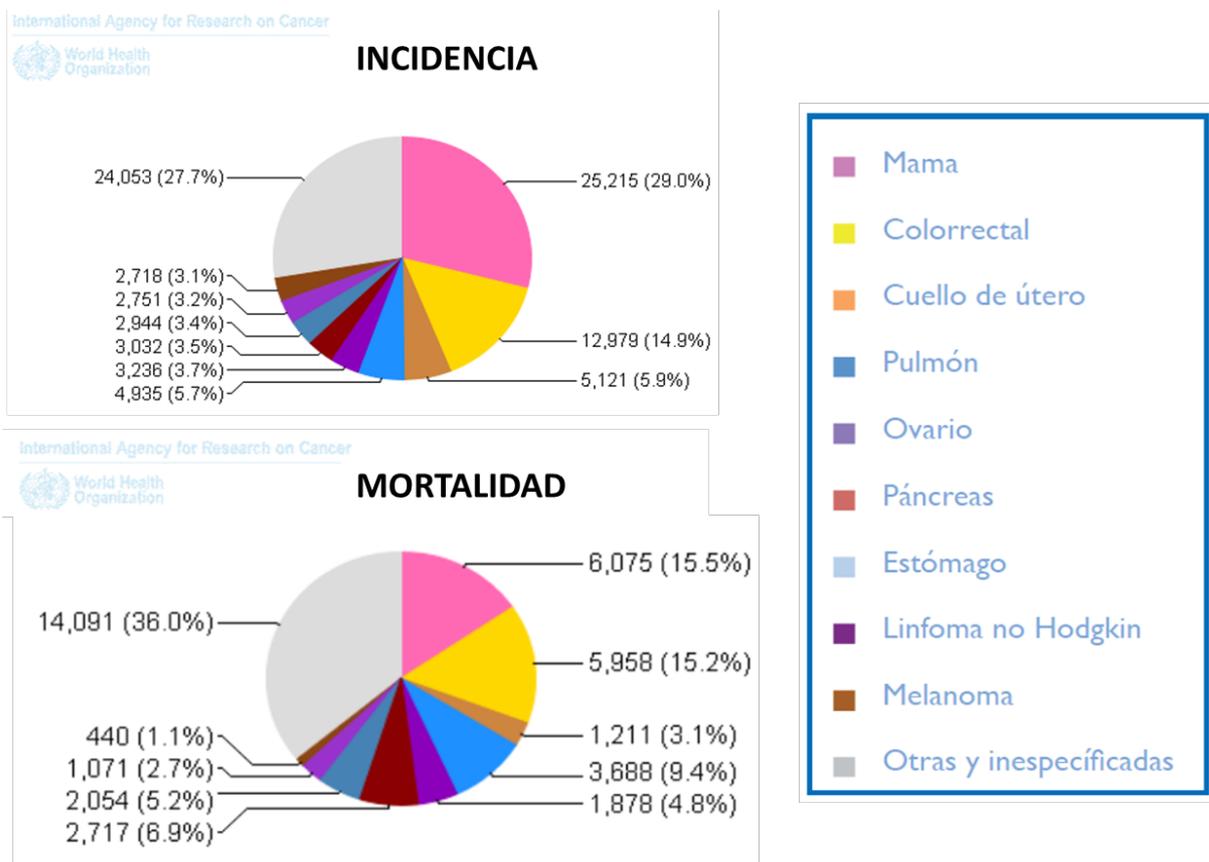
El tratamiento sistémico del cáncer de mama metastásico (estadio IV) prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida, pero por regla general no es curativo. Las pacientes con cáncer de mama metastásico se estratifican en función de la presencia o no de metástasis óseas, ya que el tratamiento con agentes moduladores de hueso (bisfosfonatos, denosumab) reduce el riesgo de complicaciones esqueléticas. Al mismo tiempo estos dos subgrupos de pacientes se estratifican adicionalmente por el estado de los receptores hormonales y HER2 del tumor. Las pacientes con tumores con receptores hormonales RE y/o RPg-positivos son candidatas a un primer tratamiento sistémico de tipo hormonal, que a su vez dependerá del estado hormonal de la mujer (pre-, peri- o postmenopáusica). Las pacientes con tumores con receptores hormonales (RH)-negativos generalmente asociados con metástasis viscerales sintomáticas, o que tienen tumores con RH-positivos refractarios al tratamiento hormonal deben recibir quimioterapia. Disponemos de diversos esquemas de quimioterapia adecuados, y la elección de uno u otro esquema se basan en un balance de eficacia, toxicidad, estado general y preferencias de la paciente y experiencia del clínico. Las pacientes con tumores HER2-positivo pueden beneficiarse de la adición de terapia dirigida anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab-emtansina y lapatinib) a un esquema de quimioterapia. Al igual que sucede con la hormonoterapia, a menudo se observan respuestas sucesivas con diferentes esquemas de quimioterapia (con/sin terapia anti-HER2), lo que apoya el uso secuencial de diversos esquemas terapéuticos en la misma

paciente. La imposibilidad de obtener una respuesta tumoral a 3 esquemas secuenciales de quimioterapia o el deterioro del estado funcional (ECOG ≥ 3) es indicación para un tratamiento exclusivamente sintomático/paliativo.

1.1.1 Datos epidemiológicos

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la población femenina. En 2015 se diagnosticaron en España 27.747 nuevos cánceres de mama, lo que representa un 28% de todos los nuevos tumores malignos diagnosticados en las mujeres, con una tasa ajustada de incidencia de 65,2 casos/ 100.000 habitantes y año.¹⁴ En España el riesgo de que una mujer sea diagnosticada de un cáncer de mama antes de los 85 años es del 9%, es decir, 1 de cada 18 mujeres.^{14,15} La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65 años. No obstante, no disponemos en España de un sistema nacional de registro de tumores para conocer las cifras exactas. Las tasas de incidencia están aumentando lentamente en España y en el mundo, probablemente debido a los programas de detección precoz y al envejecimiento de la población.

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los tumores más frecuentes en mujeres españolas (2012).¹⁵

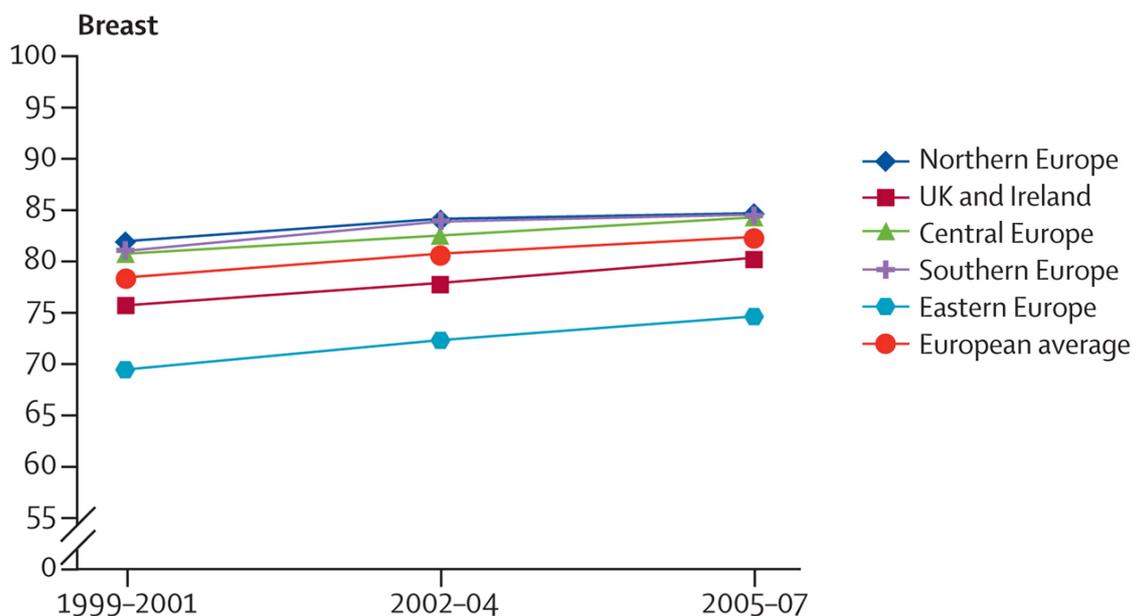


Por otro lado, este tumor supone también la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con un total de 6.213 fallecimientos en España en 2014 y una tasa ajustada de mortalidad de 11 fallecimientos por cada 100.000 habitantes/año, lo que representa el 15,1% de todas las muertes por cáncer en mujeres y el 3,0% del total de fallecimientos entre las mujeres en nuestro país (Figura 1).^{14,15} Es además la causa más frecuente de muerte en mujeres entre 25 y 45 años y la segunda a partir de los 45 años, después de las muertes de origen cardiovascular. No obstante, la mortalidad por cáncer de mama ha descendido en España y otros países europeos y en Norteamérica durante la pasada década.¹⁶

La prevalencia del cáncer de mama (o número de pacientes diagnosticadas que continúan vivas a los 5 años del diagnóstico) es alta, de 104.210 pacientes en los últimos 5 años, lo que representa un 17,9% de todos largos supervivientes de cáncer si consideramos ambos sexos.¹⁵

Según los datos disponibles del estudio EUROCORE-5, la supervivencia relativa a 5 años de las pacientes con cáncer de mama ha ido aumentando progresivamente, y en España es actualmente del 82,8% (IC 95%: 81,9-83,6%). Este aumento de la supervivencia es atribuible, por un lado, al diagnóstico en fases más tempranas y por otro, a los avances en el tratamiento sistémico.¹⁶⁻¹⁸

Fig. 2. Supervivencia relativa a 5 años para pacientes con cáncer de mama seguidas en 1999-2001, 2002-04 y 2005-07.¹⁷



1.1.2 Etiología

La etiología de la inmensa mayoría de los cánceres de mama es desconocida. Aunque se han reconocido numerosos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, el 66% de los cánceres de mama no se asocia a ninguno de ellos. Entre los factores de riesgo más importantes, además del sexo femenino y la edad avanzada, se encuentran la menarquia precoz, menopausia tardía, edad avanzada del primer embarazo a término, terapia hormonal sustitutiva prolongada, densidad mamográfica aumentada, exposición previa a radioterapia en pared torácica, historia personal de cáncer de mama o de enfermedad proliferativa benigna de la mama, historia familiar de cáncer de mama a una edad joven y mutación en genes de susceptibilidad como *BRCA1* y *BRCA2*. La Tabla 1 muestra una lista de los factores de riesgo establecidos para el cáncer de mama y su riesgo relativo.¹⁹

Tabla 1. Factores de riesgo de cáncer de mama.¹⁹

	Riesgo Relativo	Grupo de Riesgo
Edad	>10	Pacientes mayores
Localización geográfica	5	Países desarrollados
Densidad mamaria	>5	Mama densa
Edad de la menarquia	3	<11 años
Edad de la menopausia	2	>54 años
Edad del primer embarazo a término	3	>40 años
Historia familiar	≥2	Familiar de 1 ^{er} grado
Enfermedad benigna de la mama	4-5	Hiperplasia atípica
Cáncer de mama contralateral	>4	
Índice de Masa corporal		
• Premenopáusicas	0.7	Obesidad
• Postmenopáusicas	2	Obesidad
Consumo de Alcohol	1,07	7% aumento por cada bebida diaria
Exposición a radiaciones ionizantes	3	Exposición anormal a niñas >10 años
Lactancia y embarazos	El RR se reduce un 4.3% por cada año de lactancia además de un 7% por cada nacimiento	No lactancia
Tratamientos hormonales previos		
• Anticonceptivos orales	1.2	Uso actual
• Terapia Hormonal Sustitutiva	1.66	Uso actual

No obstante, como se ha señalado anteriormente, la mayoría de estos factores de riesgo, exceptuando el sexo femenino y la edad avanzada, se encuentran únicamente en una minoría de pacientes con cáncer de mama. Por ejemplo, las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* están presentes en tan solo un 5% de todos los casos de cáncer de mama, aunque confieren un elevado riesgo de entre 40-70% de desarrollar un cáncer de mama hasta los 70 años de vida.²⁰

La exposición a elevadas concentraciones de estrógenos endógenos aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama.²¹ Es por ello, muy probablemente, que una menarquia temprana y una menopausia tardía se asocien a un incremento del riesgo. En cambio, la irregularidad en los ciclos menstruales pudiera ser un factor protector como consecuencia de la alta incidencia de ciclos anovulatorios. El embarazo parece tener un doble efecto a corto y largo plazo, ya que se asocia a un incremento del riesgo inicial debido al aumento de hormonas circulantes; pero constituye un factor protector a largo plazo como consecuencia de la maduración del tejido mamario, que se traduce en una menor tasa de proliferación del mismo. Este efecto dual explicaría por qué las mujeres nulíparas tienen menor incidencia de cáncer de mama que las mujeres cuyo primer parto es tardío.

La exposición a estrógenos exógenos también se ha asociado a un incremento de riesgo de cáncer de mama. El uso de anticonceptivos orales parece incrementar el riesgo durante el uso de los mismos, sobre todo si su consumo es superior a diez o más años. Este incremento parece mayor en los tumores RE-negativos, y en especial en las mujeres entre 25 y 64 años con tumores triple negativos que habían iniciado la toma de los mismos antes de los 18 años. Por otro lado, también se ha demostrado en estudios observacionales que la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos incrementa el riesgo de cáncer de mama. Este efecto parece desaparecer al abandonar su uso y el riesgo es mayor en las mujeres que utilizan combinaciones de estrógenos y progesterona. El aumento de la densidad mamográfica (definida como la proporción de área mamaria ocupada en la mamografía por tejido radiológicamente denso) se ha asociado a un incremento del riesgo de cáncer de mama, posiblemente por la relación existente entre los niveles de estrógenos circulantes y la densidad mamaria.

La radiación ionizante recibida en la glándula mamaria especialmente a una edad temprana (entre los 10-20 años), como la que se administra para el tratamiento de cáncer infantil, también aumenta el riesgo de cáncer de mama.

Por último, al igual que con otros tipos de cáncer, los estudios continúan mostrando que diversos factores del estilo de vida pueden contribuir al desarrollo de cáncer de mama. El consumo de alcohol y la obesidad se han relacionado con un aumento de riesgo, mientras que la actividad física regular parece tener un efecto protector.

No obstante, recientes estudios revelan posibles distintos patrones de riesgo para los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama definidos por RE y RPg, lo que sugiere que pueden representar enfermedades etiológicamente distintas. Por ejemplo, el aumento de riesgo asociado con los factores reproductivos (menarquia precoz, nuliparidad, edad tardía en la primera gestación a término) y la obesidad postmenopáusica parece restringirse solamente a los tumores con receptores hormonales positivos, sin apreciarse ninguna elevación en los cánceres con receptores hormonales negativos.²²

1.2. Diagnóstico y tratamiento del tumor primario

1.2.1 Diagnóstico del tumor primario

Aproximadamente algo menos de la mitad de todos los cánceres de mama diagnosticados en España son detectados mediante una mamografía de *screening*, mientras que el resto son detectados clínicamente mediante autopalpación de una tumoración mamaria, normalmente no dolorosa, por parte de la propia paciente. A veces el signo inicial puede ser una retracción de la piel de la mama o una secreción por el pezón. De forma más infrecuente, cuando el tumor se detecta en fases más avanzadas pueden observarse cambios en el color de la piel o afectación de los ganglios axilares.

Tras la sospecha de un cáncer de mama el diagnóstico se basa en la realización de una mamografía y una biopsia. La mamografía sigue siendo la principal técnica de diagnóstico por imagen en la mama. El Colegio Americano de Radiología ha desarrollado un sistema de clasificación diagnóstica de las lesiones mamográficas que intenta estandarizar la terminología y el informe mamográfico (BI-RADS). Suele complementarse con la ecografía, técnica especialmente recomendada para mujeres jóvenes y tras la identificación en la mamografía de áreas de asimetría de densidad. Sin embargo, no detecta la mayoría de las microcalcificaciones. Asimismo, por la posibilidad de ser utilizada en tiempo real se convierte en una herramienta muy práctica para dirigir la aguja de biopsia. Opcionalmente puede también realizarse una resonancia magnética (RNM), especialmente útil en secreciones del pezón clínicamente sospechosas, carcinomas inflamatorios o cuando existe afectación ganglionar axilar con un primario mamográfica y ecográficamente oculto.

Tras identificar y localizar el tumor mediante las técnicas de imagen debe obtenerse una biopsia que confirme el diagnóstico. Esta consiste en la extracción de una muestra

de tejido de la zona sospechosa para realizar un examen anatomopatológico y poder determinar la naturaleza benigna o maligna de la lesión. Un componente esencial del estudio histológico es la recogida de factores pronósticos, incluyendo el tipo histológico (ductal, lobulillar u otros tipos especiales), el grado histológico (grado combinado de Nottingham) y el contenido de receptores hormonales (RE y RPg) y estado de HER2.

El estudio de extensión o estadificación del tumor permite una elección eficiente de las opciones de tratamiento local, proporciona una información pronóstica basal y ayuda a identificar las opciones de tratamiento sistémico. Suele incluir una analítica (hemograma, perfil hepático) y una radiografía de tórax. Si la paciente presenta síntomas respiratorios debe realizarse un TAC torácico. Y en caso de elevación de la fosfatasa alcalina, anomalías en las pruebas de función hepática o síntomas o signos físicos anormales en la exploración abdominal estaría indicado un estudio de imagen abdominal. El rastreo óseo estaría indicado en pacientes que presenten dolor óseo localizado o un valor elevado de fosfatasa alcalina. Estas exploraciones no están recomendadas de forma rutinaria en las pacientes con estadio I o II en ausencia de síntomas o signos de enfermedad diseminada, ya que permiten la identificación de metástasis en tan solo un 5% de los casos. En cambio sí están recomendadas en el estadio III.¹²

1.2.2 Estadio y clasificación TNM

El estadio del cáncer de mama se basa en la extensión anatómica del tumor en el momento del diagnóstico y está recogida en la clasificación TNM: tamaño del tumor (T), presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis a distancia (M). Las diferentes combinaciones de estos parámetros dividen a los pacientes en varios grupos con un pronóstico claramente diferente (ver Tabla 2 en la página siguiente).

1.2.3 Factores pronósticos y predictivos

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con varios subtipos definidos por diferentes perfiles biológicos que determinan a su vez un diferente comportamiento clínico y una diferente respuesta a los tratamientos. En consecuencia, el pronóstico de cada paciente es muy diferente al de las demás y por ello necesitamos **factores pronósticos** que de forma ideal pudieran predecir con la mayor precisión posible el riesgo de desarrollar una recidiva si la paciente no recibiera ningún tratamiento adyuvante.

Tabla 2. Estadio del cáncer de mama y clasificación TNM de la American Joint Committee on Cancer y la International Union for Cancer Control (7ª edición).²³

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1*	N0	M0
Stage IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Stage IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
Stage IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stage IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stage IIIC	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Tamaño del tumor primario (T)

T0 = Sin evidencia de tumor primario; Tis = Carcinoma in situ; T1 ≤ 20 mm; T2 >20-50 mm; T3 >50 mm; T4 = Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica y/o piel.

Estado de los ganglios linfáticos regionales (N)

N0 = Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales; N1 = metástasis axilares ipsilaterales móviles; N2 = metástasis axilares fijas o en cadena mamaria interna; N3 = Metástasis en ganglios supra/infraclaviculares o en cadena mamaria interna junto a metástasis axilares.

Metástasis a distancia (M)

M0 = Sin metástasis a distancia; M1 = Metástasis a distancia.

La medicina personalizada o de precisión persigue el objetivo de proporcionar el tratamiento correcto para la paciente apropiada en el momento adecuado. Para avanzar hacia una medicina más personalizada, el ofrecimiento de un tratamiento adyuvante está basado en el cálculo del riesgo de recidiva, beneficio esperado del tratamiento propuesto, así como los efectos secundarios relacionados con el tratamiento (además obviamente de las preferencias y expectativas de cada paciente). Para ello, además de

los factores pronósticos que nos estimen el riesgo de recaída necesitamos también **factores predictivos de respuesta** que nos permitan anticipar con fiabilidad la probabilidad de respuesta a un determinado tratamiento.

Desafortunadamente no existe un único factor pronóstico suficientemente potente que descarte una posible recaída ni un único factor predictivo suficientemente preciso que nos garantice la infalibilidad del tratamiento. Durante las últimas décadas se han evaluado multitud de factores pronósticos y predictivos, pero tan solo unos pocos han demostrado suficiente evidencia para orientar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama. Se han propuesto tres criterios que debe reunir un biomarcador para guiar el manejo terapéutico de una paciente con cáncer de mama.^{24,25} En primer lugar se requiere una elevada evidencia de su **validez analítica**, esto es, que el test que mide el biomarcador en cuestión sea preciso, reproducible y fiable. En segundo lugar, debemos estar seguros de su **validez clínica**, lo que significa que existe una asociación bien establecida entre el biomarcador y un resultado clínico (supervivencia, respuesta al tratamiento, etc.) y por tanto es capaz de dividir una población en dos o más grupos con diferente comportamiento clínico o biológico. Aunque es improbable que un test de un biomarcador tumoral tenga utilidad clínica si el biomarcador no tiene validez clínica, la validez clínica por sí sola es insuficiente para recomendar el uso de un test para guiar las decisiones terapéuticas. Es necesario además que el test del biomarcador tenga **utilidad clínica**, es decir, que haya demostrado con suficiente evidencia que proporciona información adicional y relevante que contribuya a mejorar la evolución clínica de la paciente. Su uso debe asociarse a un balance favorable entre beneficios y perjuicios comparado con el tratamiento de la paciente en ausencia del resultado del test. Para su validación se debe exigir al biomarcador un nivel de evidencia y un rigor similares al que deben demostrar los nuevos fármacos.^{25,26}

En la práctica clínica utilizamos un conjunto de factores pronósticos o marcadores predictivos que con suficiente acierto nos permiten evitar el tratamiento adyuvante a tan solo una minoría de pacientes: edad, estadio o clasificación TNM, grado histológico, estado del RE, estado del RPg, estado de HER2, el índice de proliferación celular medido por la expresión de Ki-67 y los perfiles de expresión génica (como el *Recurrence Score* de 21 genes [Oncotype DXTM], el perfil de 70 genes [MammaPrint[®]], o el test PAM50 [Prosigna]). Aunque el activador del plasminógeno urinario/inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (uPA/PAI-1) también ha demostrado utilidad clínica en este contexto, no se utiliza habitualmente.²⁷

1.2.4 Receptor Estrogénico (RE)

El receptor estrogénico (RE) se identificó por primera vez en la década de 1960, cuando el desarrollo de las hormonas radiomarcadas permitió demostrar la unión del

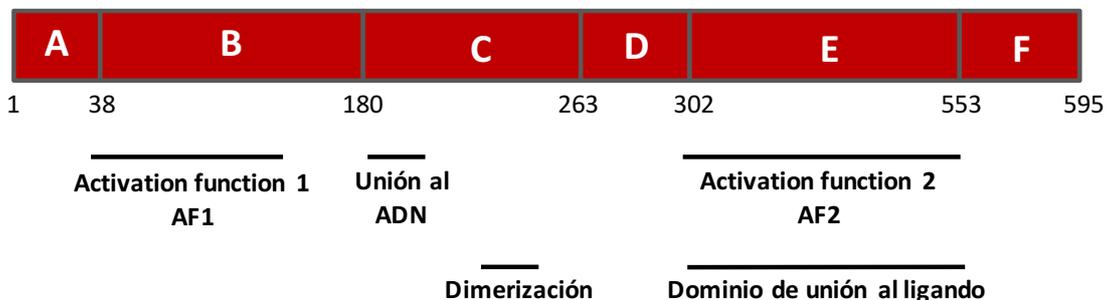
estrógeno a su receptor RE.^{28,29} Desde entonces se puso de manifiesto que el cáncer de mama depende en gran medida de los estrógenos y/o progesterona para su crecimiento y que este efecto está mediado a través del RE y RPg. El RE es un factor de transcripción nuclear y de forma normal está implicado en los procesos que controlan la proliferación celular y otras funciones clave como la apoptosis, invasión y angiogénesis. Los estrógenos estimulan el crecimiento tanto de las células mamarias normales como de las células tumorales que expresan RE. Aproximadamente el 75% de todos los cánceres de mama tienen células tumorales con expresión de RE y/o RPg (RE-positivos y/o RPg-positivos).

Biología Molecular

Tanto el RE como RPg son miembros de la superfamilia de receptores hormonales nucleares que incluyen también al receptor androgénico (RA), hormona tiroidea, vitamina D y receptor del ácido retinoico (RAR). Estos receptores se encuentran en el citoplasma de las células diana y funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando. La unión de una hormona (ligando) al dominio de unión al ligando destapa los sitios de unión al ADN en el receptor, seguido de la migración al núcleo y la unión al ADN a nivel de secuencias específicas cerca de los genes responsables de las acciones fisiológicas de la hormona.

Estructuralmente el RE contiene 6 dominios, denominados alfabéticamente de A hasta F (figura 3). Tanto el estradiol como los SERMs (tamoxifeno) se unen al sitio de unión al ligando en el dominio E, que también media la dimerización del RE. La función de unión a secuencias específicas del ADN requiere la dimerización del RE y reside en el dominio C. El dominio D contiene una señal de localización nuclear. Las regiones que promueven las funciones de activación de la transcripción están presentes en los dominios A/B (AF1) y E (AF2).

Figura 3. Estructura del receptor estrogénico (RE).



Existen dos formas diferentes del receptor de estrógeno, normalmente referidas como las formas α y β , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (*ESR1* y *ESR2*) situados en los cromosomas 6 y 14, respectivamente. Aunque similares en

muchos aspectos, las propiedades transcripcionales de ambos receptores son diferentes. La mayoría de los estudios clínicos se han realizado con el RE- α , que es la isoforma que se expresa habitualmente en los cánceres de mama, y la que es reconocida de forma específica por los anticuerpos monoclonales empleados para el estudio IHQ, por lo que en este trabajo de tesis me centraré únicamente en esta isoforma.

A diferencia de los otros receptores hormonales nucleares, el RE se localiza predominantemente en el núcleo tanto en presencia como en ausencia de los estrógenos. La unión del estrógeno al dominio de unión al ligando del RE da lugar a un cambio en su estructura tridimensional que favorece la formación de dímeros con otros receptores. A su vez esta activación conduce, bien a la unión directa del RE a secuencias específicas del ADN denominadas *elementos de respuesta a estrógeno* (ERE) localizadas en el promotor de los genes diana (actividad genómica o clásica), o bien a interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción unidos a sus respectivos promotores (regulación transcripcional no clásica).³⁰ En cualquier caso, la unión directa o indirecta al ADN activa o reprime la expresión de genes cuyos productos proteicos son responsables de las acciones fisiológicas de los estrógenos. Los pasos siguientes consisten en la transcripción de ARN mensajero (ARNm) y ARN ribosómico (ARNr) y la resultante síntesis de nuevas proteínas.

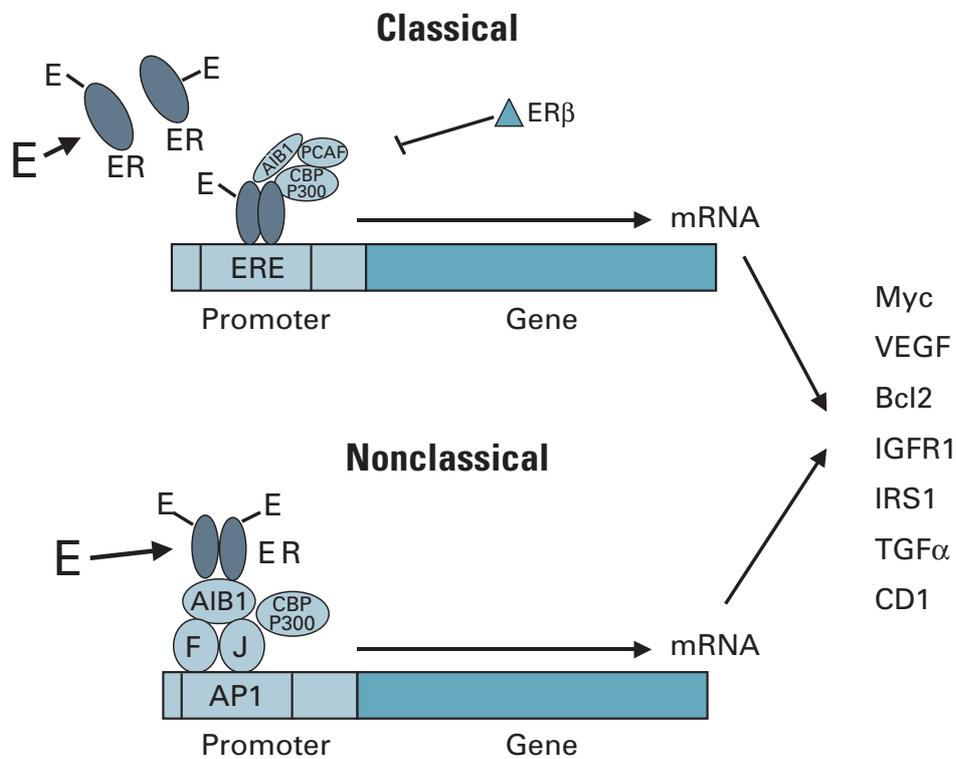
Los dímeros del RE unidos al promotor forman un complejo con proteínas reguladoras tales como AIB1 (SRC3) y CBP/P300 que actúan coordinadamente para influir en la transcripción de genes de respuesta a estrógenos. Estas otras proteínas nucleares a las que se une el RE son llamadas co-activadores y co-represores, y permiten una fina regulación de su función transcripcional siendo capaces de interpretar la diferencia entre diferentes ligandos unidos al RE (por ejemplo, estrógeno o tamoxifeno).³¹ Los coactivadores aumentan la actividad transcripcional del RE y, por el contrario, los co-represores limitan su actividad, manteniendo el receptor en un complejo proteína/ADN que no promueve la transcripción. El equilibrio en las concentraciones relativas y la actividad de los coactivadores y co-represores en las células del cáncer de mama determinan la capacidad de respuesta diferencial del RE a un agonista o un antagonista.³²

En la vía no-clásica, la unión del RE al estrógeno se convierte en un complejo co-activador para otros factores de transcripción tales como Fos (F) y Jun (J), para activar la transcripción de genes en otros locus promotores tales como AP-1.

Por otra parte, los estrógenos se unen con alta afinidad a otros componentes celulares, incluyendo la membrana plasmática. Algunos efectos de los estrógenos, como la inducción rápida de las vías de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) y la *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), parecen implicar la acción directa del RE en

la membrana plasmática en vez de una modulación genómica. Dado que esta actividad se produce sin la interacción RE-ADN, se le llama "no genómica".

Figura 4. Señalización del receptor estrogénico (RE) iniciada en el núcleo: actividad genómica (clásica) y actividad reguladora de la transcripción (no clásica).



Por último, cada vez estamos conociendo mejor las mutaciones adquiridas del RE, que parecen causar una activación constitutiva del RE dentro de las células tumorales, convirtiéndolas en células relativamente resistentes a los SERMs.³³

Valor pronóstico del RE

Múltiples estudios describen que los receptores hormonales se asocian generalmente a un mejor pronóstico de las pacientes con cáncer de mama, al menos a corto plazo. Los datos sugieren que la SG, la SLE y el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TFT) están relacionados positivamente con los niveles de RE y RPg.^{34,35} Sin embargo, mientras que la tasa anual de recaída de los tumores RE+ es menor en los primeros cinco años desde el inicio del tratamiento respecto a la de los tumores RE-negativos, los estudios sugieren que con un seguimiento más largo puede ser incluso mayor.^{36,37} Por ejemplo, en un estudio de más de 4000 pacientes con cáncer de mama operable incluidas en los ensayos clínicos I a V del *International Breast Cancer Study*

Group (IBCSG), las pacientes con enfermedad RE+ tenían un riesgo anual de recaída más bajo durante los primeros cinco años (9,9%) en comparación con aquellas con enfermedad RE-negativa (11,5%). Sin embargo, después de cinco años, las pacientes con enfermedad RE+ tenían un riesgo anual de recaída más alto (5 a 10 años: 5,4% frente a 3,3%; de 10 a 15 años: 2,9% frente a 1,3%; de 15 a 20 años: 2,8% frente a 1,2%).³⁷

Valor predictivo del RE

Además de su papel como factor pronóstico, el RE es un potente factor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal. La expresión del RE predice qué pacientes se beneficiarán de la terapia hormonal, ya que los tumores con RE+ tienen al menos 5 veces más probabilidades de responder a este tratamiento. El valor predictivo del RE se demuestra claramente en el metanálisis del *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG) de ensayos aleatorizados con tamoxifeno adyuvante.⁴ En las pacientes con tumores RE+, tamoxifeno reduce significativamente el riesgo de recaída en un 39% (HR 0,61) y el riesgo de muerte en un 30% (HR 0,696) a lo largo de 15 años de seguimiento. El beneficio era independiente del RPg, la edad, el estado ganglionar o el uso de quimioterapia adyuvante. Por el contrario, tamoxifeno no tuvo impacto en las tasas de recaída o de supervivencia en las pacientes con cáncer de mama RE-negativo.

Numerosos estudios han demostrado también la capacidad del RE para predecir la respuesta al tratamiento hormonal en cáncer de mama avanzado o metastásico.³⁸ La expresión tumoral de RE y/o RPg identifica a las mujeres que más probabilidades tienen de beneficiarse de sucesivos tratamientos hormonales. En cambio, los tumores que son negativos para RE y RPg tienen pocas probabilidades de responder a la terapia hormonal y se beneficiarán más de la quimioterapia citotóxica. Fundamentalmente debido a su valor predictivo, la determinación de estos receptores se ha convertido en una parte rutinaria de la evaluación de todos los cánceres de mama.

Características clínicas asociadas al RE

El estado del RE se asocia también un patrón específico de diseminación metastásica. Por razones poco claras, los tumores con RE+ son más propensos a desarrollar metástasis clínicamente evidentes en huesos, tejidos blandos, o tracto reproductivo/genital. Por el contrario, los tumores RE-negativos hacen metástasis con mayor frecuencia en cerebro e hígado, localizaciones asociadas con un peor pronóstico.³⁹ Además, los tumores RE+ son más propensos a ser histológicamente bien diferenciados, tener una menor fracción de células en división, y a ser diploides. También es menos probable que se asocien a mutaciones, pérdidas o amplificaciones de genes relacionados con el cáncer de mama como p53, HER2, o EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), todos ellos asociados con un peor pronóstico.

Determinación del RE

En la actualidad la determinación del RE es imprescindible por su indiscutible valor en la toma de decisiones clínicas. En cuanto a la forma de determinarlos, no está totalmente establecido cuál es el mejor método. Originalmente, la cuantificación del RE y RPg se realizó mediante un test que se basaba en la unión competitiva de un ligando esteroide radiomarcado al RE o RPg. Desde principios de 1990 estos métodos han sido reemplazados por métodos de inmunohistoquímica (IHQ), que se basan en el reconocimiento de la proteína a través del uso de anticuerpos específicos. Debido a la subjetividad en la interpretación de los resultados, los diferentes puntos de corte utilizados para definir su positividad y la diferente sensibilidad y especificidad de los anticuerpos empleados, es difícil comparar los diferentes métodos de determinación. Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), más sencillas y menos caras, son las más utilizadas en nuestros hospitales, a raíz de que numerosos estudios hayan avalado su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Se basan en la detección bioquímica de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al RE a nivel nuclear. Desafortunadamente, sin embargo, estos métodos han estado lastrados con cierta variabilidad que han dado lugar a resultados inexactos. Dado que estos test guían el uso de la hormonoterapia, la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) y el *College of American Pathologists* (CAP) reunieron a un panel de expertos en 2010 para abordar las causas de la variabilidad relacionada con la medición de RE y RPg por métodos IHQ.⁴⁰ Una tercera técnica de determinación más reciente es la medición de ARN mensajero del RE, ya sea por análisis de *northern blot* o por reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), a menudo como parte de un estudio de perfil de expresión génica (por ejemplo, Oncotype DX o MammaPrint®). Estas últimas técnicas no permiten asegurar si el ARNm analizado procede del componente infiltrante del tumor, del componente *in situ* o del tejido normal, y por otro lado todavía no han sido validadas para su uso clínico, por lo que en la actualidad no se recomiendan para sustituir a los test IHQ tradicionales.

El punto de corte utilizado clásicamente para la clasificación de un tumor como RE+ solía ser $\geq 10\%$ de células tumorales con expresión nuclear del RE.⁴ Sin embargo, más recientemente, diversas guías clínicas como St. Gallen o la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomiendan un punto de corte de $\geq 1\%$ de células tumorales RE-positivas para definir la probabilidad de respuesta a la hormonoterapia.^{8,40} Actualmente, hay opiniones contradictorias respecto a si la hormonoterapia debería ser el tratamiento de elección o no en pacientes con tumores con una expresión de RE en el intervalo de 1-9% (niveles equívocos), aunque estos casos representan una minoría.⁴¹

1.2.5 Receptor de Progesterona (RPg)

El RPg parece ser factor pronóstico independiente del RE. Esto se demostró en un gran estudio poblacional que incluyó a más de 1.000 mujeres con cáncer de mama precoz, todas ellas intervenidas del tumor primario con intención curativa.⁴² Un 29% de las pacientes recibieron quimioterapia (neoadyuvante o adyuvante) y un 80,5% hormonoterapia. En el análisis multivariado, la expresión del RPg fue un factor predictivo independiente de la SLE (HR 1,94; IC del 95% 1,32 a 2,85) y de la supervivencia específica por cáncer de mama (HR 2,12; IC del 95% 1,34 a 3,38). Además, el valor pronóstico del RPg parecía aumentar más allá del sexto año de seguimiento. Estos datos son compatibles con el hecho de que las pacientes con enfermedad RE-positiva/RPg-negativa tengan un subtipo más agresivo de cáncer de mama RH-positivo y a menudo se clasifiquen dentro del subtipo luminal B.

Aunque las pacientes con tumores RPg-positivos también tienen mejores resultados cuando se tratan con hormonoterapia, el estado del RPg depende en gran medida del RE; por lo tanto, no parece que el RPg conserve valor predictivo independiente cuando se conoce el estado del RE.⁴ El análisis del RPg es particularmente útil cuando el estado del RE es desconocido o negativo, puesto que hay evidencia de potencial beneficio para predecir la respuesta a la hormonoterapia en las pacientes con enfermedad RE-negativa/RPg-positiva, por lo general debido a que estos tumores pueden ser falsamente RE-negativos.⁴⁰ En cambio, los tumores que son negativos para RE y RPg tienen pocas probabilidades de responder a la hormonoterapia y su mejor opción terapéutica pasa por la quimioterapia citotóxica. La medición del RPg se ha convertido en una parte rutinaria de la evaluación de los cánceres de mama, fundamentalmente debido a su valor predictivo.

Al igual que con el RE, la proteína RPg existe como dos isoformas del receptor (en este caso, llamados A y B); pero estas isoformas son dos productos del mismo gen. Estas isoformas del RPg (A es una forma ligeramente truncada de B) se unen entre sí para crear homo y heterodímeros. Ha sido poco estudiada la importancia relativa de estas isoformas en cáncer de mama y su relevancia para la toma de decisiones clínicas, aunque esta es un área activa de investigación.

1.2.6 Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2)

Anteriormente conocido como HER2/neu o ErbB2, el protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*ERBB2* o *HER2*) está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (concretamente en la región 17q21.1) y codifica una glicoproteína transmembrana de 185 kDa que se trata de un receptor 'huérfano', ya que

hasta la fecha no se le conocen ligandos, y con actividad de tirosina quinasa en su dominio intracelular. El receptor HER2 pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR o HER), que son críticos en la activación de vías de transducción de señales intracelulares que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales y, posiblemente también, la angiogénesis. En cada célula normal existen dos copias del gen *HER2*, una copia en cada alelo del cromosoma 17, y hay aproximadamente 50.000 copias de la proteína HER2 en la superficie celular. Sin embargo, en las células tumorales puede existir más de dos copias del gen y más de un millón de copias del receptor HER2 en la superficie celular, favoreciendo la formación de homodímeros (HER2-HER2) y heterodímeros (HER1-HER2 y HER2-HER3) aumentando extraordinariamente la sensibilidad de la célula a los factores de crecimiento. La amplificación del oncogén *HER2* o la sobreexpresión de su proteína se observa en aproximadamente el 20% de los cánceres de mama.

Vía de señalización de HER2

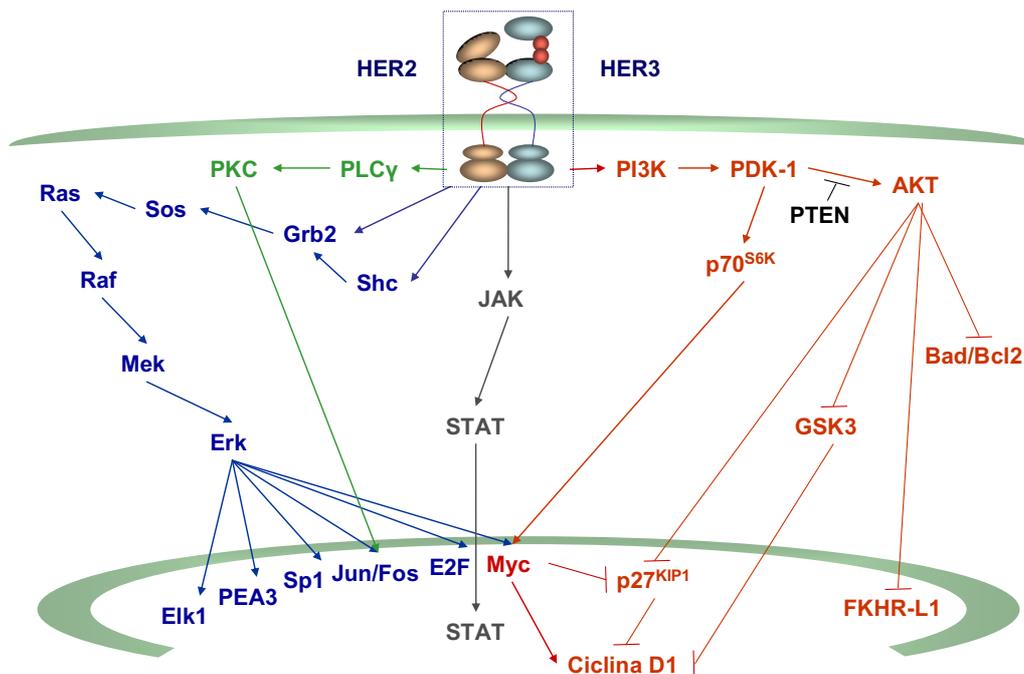
La hiperactivación de las vías de señalización mediadas por receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR o HER) induce alteraciones de la regulación del ciclo celular que puede conllevar un incremento de la proliferación y la transformación a células malignas. La activación de la vía de señalización HER2 se desencadena, como se ha comentado anteriormente, por la formación de homodímeros y heterodímeros con otros receptores HER, pareciendo no estar relacionada con la unión a ningún ligando conocido. Este fenómeno de formación de dímeros podría producirse con mayor facilidad en los casos de sobre-expresión de HER2 y se encuentra fundamentalmente asociado a la unión del receptor HER2 con HER3. Los heterodímeros HER2-HER3 han demostrado ser potencialmente oncogénicos debido principalmente a su repercusión sobre la vía de señalización de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK), relacionada entre otros procesos con la proliferación celular, y de la vía PI3K/Akt, implicada en la supervivencia celular y en el proceso anti-apoptótico.⁴³

Su implicación en la vía MAPK consiste fundamentalmente en la activación directa de un ligando de un receptor dimérico que se une a la proteína Grb2 mediante unas secuencias consenso de tirosina fosforiladas, o activación indirecta de Grb a través de la interacción con la proteína Shc. La proteína Grb2 se asocia a la Sos, un factor de intercambio de guanina específico de la proteína Ras, y Sos activa Ras. Ras interactúa con la proteína Raf y estimula una cascada de quinasas que culmina en la activación de Erk/MAPK. La proteína Erk fosforila diversos sustratos citoplasmáticos y de membrana, y es trasladado rápidamente al núcleo, donde activa una serie de factores de transcripción que incluyen Sp1, PEA3, E2F, elk1 y AP1 (formado por Jun y Fos) (Figura 5).

En el caso de la vía PI3K/Akt, los heterodímeros HER2-HER3 participan en la activación de PI3K y la producción de las proteínas PDK-1 y Akt/PKB. Akt se une a la

membrana plasmática y es fosforilado por PDK-1, desencadenando su activación y translocación al núcleo donde actuará sobre dianas reguladoras de la apoptosis o del crecimiento celular. En este proceso, la fosfatasa lipídica PTEN actúa como supresor tumoral revirtiendo la actividad de PI3K y reduciendo la actividad de PDK-1 y de Akt (Figura 5).

Figura 5. Principales vías de señalización de los heterodímeros HER2-HER3.



Además, ambas vías pueden modular la actividad de la ciclina D1, la cual ha mostrado jugar un papel relevante como promotor de la progresión celular en el cáncer de mama.

Por otro lado, la activación de las vías Ras/Raf/MAPK y/o la vía PI3K también puede producirse como consecuencia de la poderosa señal proliferativa y antiapoptótica generada por la unión de los ligandos IGF al receptor transmembrana tirosina-quinasa IGF-IR. Esta señal proliferativa se encuentra mediada por proteínas relacionadas con el ciclo celular entre las que se encuentran las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), implicadas en la activación y progresión del ciclo celular, y su inhibidor p27^{Kip1}. Esta última proteína se encuentra involucrada en el control de la proliferación, fundamentalmente a nivel de la transición G1-S, por lo que el aumento de la degradación de la proteína p27^{Kip1} detectado en los casos de activación del gen HER2/*neu* conlleva la activación de la proliferación celular.

Utilidad clínica de HER2

Todas las guías clínicas recomiendan su determinación rutinaria en todos los cánceres de mama, ya que el estado de HER2 es un factor pronóstico y un marcador predictivo de respuesta terapéutica.

Por un lado, la sobreexpresión de HER2 se asocia con un **alto riesgo de recaída y de muerte** en ausencia de tratamiento sistémico adyuvante, tanto en pacientes con ganglios positivos⁴⁴ como con ganglios negativos⁴⁵ o tumores de pequeño tamaño.⁴⁶ Sin embargo, en la actualidad el valor de esta información pronóstica en la práctica clínica es relativo porque queda difuminado por el uso precoz de tratamientos anti-HER2 en el contexto adyuvante. Además, para mujeres con cáncer de mama RH-positivo/HER2-negativo, la expresión del gen *HER2* es un componente importante del perfil genómico Oncotype DX /*Recurrence Score* de 21 genes (constituye uno de esos 21 genes), que se utiliza para guiar las decisiones con respecto a la administración de quimioterapia adyuvante en estas pacientes.

El principal motivo de analizar la amplificación o sobreexpresión de HER2 es la identificación de mujeres que se beneficiarán del **tratamiento con agentes dirigidos contra el receptor HER2**. Varios ensayos aleatorizados han demostrado un beneficio significativo en la supervivencia con la adición de trastuzumab en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama precoz HER2-positivo.⁴⁷⁻⁵⁰ Además, en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo trastuzumab es notablemente eficaz tanto en monoterapia como en combinación con quimioterapia. El estado HER2-positivo también predice el beneficio de otros tratamientos dirigidos anti-HER2, como lapatinib,⁵¹⁻⁵³ pertuzumab,⁵⁴ trastuzumab-emtansina⁵⁵ o neratinib.⁵⁶⁻⁵⁸

Por otro lado, la positividad para HER2 se asocia con resistencia a la **hormonoterapia** con tamoxifeno e inhibidores de aromatasas.⁵⁹⁻⁶¹ Los estudios preclínicos ya sugerían una interacción fisiológica entre las vías de transducción de señales HER2 y RE. Un meta-análisis de ocho estudios que incluyeron a 1925 pacientes con cáncer de mama avanzado con RE-positivo/RE-desconocido estudió la interacción entre la sobreexpresión de HER2 y la respuesta a la hormonoterapia. El riesgo de progresión en los seis primeros meses del tratamiento fue mayor para los tumores HER2-positivos que para los tumores HER2-negativos (RR=1,45; IC del 95%: 1,34 a 1,57).⁶² En la enfermedad localizada, aunque algunos estudios sugieren que la sobreexpresión de HER2 se asocia a una resistencia relativa a la hormonoterapia adyuvante, particularmente con tamoxifeno, los datos son menos concluyentes. En particular, los datos disponibles no se consideran suficientemente sólidos para utilizar el estado de HER2 como un factor de selección de un inhibidor de aromatasas sobre tamoxifeno. Las guías de ASCO sobre biomarcadores en cáncer de mama recomiendan que el estado de HER2 no se utilice

para evitar la hormonoterapia a una paciente con un cáncer de mama RH-positivo, ni para seleccionar un tipo específico de terapia hormonal sobre otra.²⁷

Por último, el estado de HER2 parece predecir la sensibilidad al tratamiento quimioterápico con **antraciclinas**. Varios estudios han observado una relación entre la positividad de HER2 y unos mejores resultados de la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. Un metanálisis de ocho estudios que compararon quimioterapia adyuvante con antraciclinas versus no-antraciclinas llegó a la conclusión de que el beneficio de las antraciclinas se limitaba a las mujeres con tumores HER2-positivos (HR 0,71 y 0,73 para SLE y SG, respectivamente), mientras que no parecían beneficiar a las pacientes con tumores HER2-negativos (HR 1,00 y 1,03 para SLE y SG, respectivamente).⁶³ Otro metanálisis de cinco estudios randomizados de adyuvancia (antraciclinas vs. CMF), concluía que aunque la amplificación de HER2 podía tener algún valor en la predicción de la respuesta a antraciclinas (HR 0,71 y 0,73 para SLE y SG, respectivamente, en HER2-amplificado frente a HR 0,89 y 0,91 para HER2-no amplificado; $p_{\text{interacción}}=0,07$), sin embargo no apoyaba el uso *exclusivo* de antraciclinas en pacientes con tumores HER2-amplificados.⁶⁴ Estos metanálisis están limitados por la omisión de trastuzumab, que actualmente se utiliza de forma rutinaria en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama precoz HER2-positivo. La asociación entre la positividad de HER2 y la respuesta a las antraciclinas en el contexto de la enfermedad metastásica está menos clara. Sin embargo, al igual que en el escenario adyuvante, la coexpresión de topoisomerasa 2-alfa (TOP2A) puede ser el factor crítico para la respuesta a antraciclinas más que la propia expresión de HER2. Esto se demostró en un estudio que incluyó a más de 5000 pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo tratadas con quimioterapia (con o sin trastuzumab). La coamplificación de TOP2A se asoció con una significativa mejor supervivencia solo cuando se utilizó quimioterapia con antraciclinas, en comparación con los cánceres HER2-positivos sin coamplificación TOP2A.⁶⁵

Determinación de HER2

Hay muchas formas de medir la actividad del oncogén HER2, y el mejor método, tanto en términos del tipo de análisis como de la mejor manera de realizar cada tipo de test, es controvertido. Los métodos disponibles son los siguientes:

- La sobreexpresión del receptor HER2 (proteína) mediante **inmunohistoquímica** (IHQ), *Western blotting* o ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).
- Amplificación del gen *HER2* por **hibridación *in situ* (ISH)** - hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o hibridación *in situ* con plata (SISH)- o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) diferencial.
- La sobreexpresión de ARN de *HER2* mediante *Northern blotting* o PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

De acuerdo con las guías de la *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)*,⁶⁶ el algoritmo recomendado para el análisis de HER2 mediante IHQ y FISH sería el siguiente:

- El test de HER2 se debe realizar en el componente infiltrante utilizando un método de IHQ o ISH validado.
- Los criterios que se utilizan para la interpretación de la **IHQ** de HER2 son:
 - IHQ 3+ si hay tinción de membrana circunferencial completa e intensa en >10% de las células tumorales. Todos los tumores IHQ 3+ se consideran HER2-positivos. Este criterio IHQ refleja el criterio de selección de los ensayos clínicos aleatorios que evaluaron trastuzumab adyuvante.
 - IHQ 2+ si hay tinción de membrana circunferencial incompleta y/o moderada en >10% de las células tumorales, o si la tinción de membrana circunferencial es completa e intensa pero en <10% de las células tumorales. Todos los tumores con IHQ 2+ se consideran HER2 no concluyente (o equívoco).
Un resultado de HER2 no concluyente debe dar lugar a la determinación de HER2 mediante ISH en la misma muestra o a un nuevo test (utilizando una muestra diferente, ya sea con IHQ o ISH).
 - IHQ 1+ si hay tinción de membrana incompleta débil o apenas perceptible en >10% de las células tumorales. Todos los tumores IHQ 1+ se consideran HER2-negativo.
 - IHQ 0 si no se observa tinción o si hay tinción de membrana incompleta débil o apenas perceptible en <10% de las células tumorales. Estos tumores también se consideran HER2-negativo.
- Los criterios que se utilizan para la interpretación de la **ISH** tienen en cuenta tanto la relación entre el número de señales de HER2 y la sonda de enumeración del cromosoma 17 o sonda centromérica (CEP17), como el promedio de señales de HER2 por núcleo. Los posibles resultados serían:
 - ISH positivo si la relación $HER2/CEP17 \geq 2.0$, independientemente de la media del número de copias de HER2/célula.
 - La positividad por ISH también incluye una relación $HER2/CEP17 < 2.0$ si el promedio del número de copias de HER2/célula ≥ 6.0 .
 - ISH equívoca si la relación $HER2/CEP17 < 2.0$ y el promedio del número de copias de HER2/célula ≥ 4.0 y < 6.0 señales.
 - ISH negativo si la relación $HER2/CEP17 < 2.0$ y el promedio del número de copias de HER2/célula < 4.0 señales.
 - Los resultados ISH dudosos o equívocos deberían dar lugar a una repetición del test con IHQ en la misma muestra, un test con un método alternativo de ISH, o un nuevo test (utilizando una muestra diferente, ya sea con IHQ o ISH).

Las guías de ASCO/CAP de 2013 sugieren repetir el test en pacientes con cáncer de mama de reciente diagnóstico que tengan rasgos histopatológicos discrepantes. Por ejemplo, estado HER2-positivo en un carcinoma con grado histológico 1 y RH-positivos o histología mucinosa, cribiforme o adenoide quística. O por el contrario, un estado HER2-negativo en un tumor grado 3 con escaso componente infiltrante o en un tumor morfológicamente diferente al de la biopsia inicial en la que se obtuvo el resultado negativo de HER2. Para las pacientes que presentan cáncer de mama metastásico, el nivel de discordancia en el estado de HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis oscila entre 2 y 25%, con un promedio alrededor del 10%.⁶⁷

No se ha establecido la utilidad clínica de evaluar o monitorizar los niveles séricos del dominio extracelular de HER2 (cECD) durante el tratamiento dirigido anti-HER2. Las guías de ASCO sobre biomarcadores recomiendan no utilizar cECD sérico en ninguna situación clínica.^{13,27}

1.2.7 Otros factores pronósticos y predictivos

Además de los receptores hormonales y el estado de HER2, otros factores clinicopatológicos convencionales como la edad de la paciente (<35-40 años), estado menopáusico, tamaño tumoral, afectación ganglionar, estadio tumoral, invasión linfovascular, presencia de micrometástasis o células tumorales aisladas en el ganglio centinela, extensión extracapsular de metástasis ganglionares, grado histológico, presencia de carcinoma inflamatorio y los marcadores de proliferación tumoral siguen siendo útiles para estimar el pronóstico de un cáncer de mama. Las implicaciones pronósticas de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, los perfiles de expresión génica y la respuesta clínico-patológica al tratamiento neoadyuvante ofrecen nuevas oportunidades para afinar la toma de decisiones clínicas en cáncer de mama.

La actividad proliferativa del cáncer de mama también parece tener un valioso papel pronóstico. Se han estudiado numerosas formas de medir la actividad proliferativa de las células tumorales incluyendo el recuento o índice mitótico, citometría de flujo y fracción de fase S, marcaje con timidina tritiada, timidina-kinasa, ciclinas D y E y sus inhibidores p27 y p21, topoisomerasa II α , p53, bax, bcl-2 y Ki-67, entre otros. Sin embargo, el método más comúnmente utilizado es realizar la inmunohistoquímica del antígeno nuclear Ki-67.

1.2.7.1 Índice de proliferación nuclear Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear codificada por el gen *MKI67* y que está estrictamente asociada con -y puede ser necesaria para- la proliferación celular. Más aún, está asociada con la transcripción del ARN ribosómico. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede detectarse exclusivamente dentro del núcleo celular, mientras que en la mitosis la

mayor parte de la proteína se reubica en la superficie de los cromosomas. La proteína Ki-67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero está ausente en las células en reposo (G0). Por ello Ki-67 es un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población celular. Los anticuerpos monoclonales Ki-67 y MIB-1 están dirigidos contra diferentes epítomos del mismo antígeno relacionado con la proliferación. Ki-67 y MIB1 se pueden utilizar en secciones fijadas. MIB-1 se utiliza en la clínica para determinar el índice de marcaje Ki-67. Una de sus principales ventajas sobre el anticuerpo Ki-67 original (y la razón fundamental por la que lo ha suplantado en su uso clínico) es que puede utilizarse en secciones fijadas en formol e incluidas en parafina. Su principal limitación es la escasa reproducibilidad entre laboratorios.

La relación entre el estado de Ki-67 y el pronóstico del cáncer de mama precoz ha sido ampliamente estudiado. Este marcador de proliferación se ha evaluado utilizando la herramienta REMARK⁶⁸ y se ha determinado que es un **factor pronóstico independiente** para SLE (HR 1,05-1,72) en el análisis multivariado de ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados. Además, en el entorno neoadyuvante, un valor elevado de Ki-67 se asocia con una respuesta completa patológica (pCR).⁶⁹

Se han publicado varios metanálisis sobre el valor pronóstico y predictivo de Ki-67 en cáncer de mama.⁷⁰⁻⁷² Uno de estos metanálisis⁷² incluía 71 estudios de Ki-67, 17 de ellos prospectivos. Diez estudios con 9.185 pacientes evaluaron su valor pronóstico, tres estudios con 411 pacientes su valor pronóstico y predictivo y cuatro estudios con 520 pacientes su valor predictivo. Ki-67 fue un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante de SLE (HR 1.05-1.72) en 7 estudios, pero era pronóstico para SG en un solo estudio. Las puntuaciones REMARK para los estudios incluidos oscilaron entre 9 y 18 (mediana de 12), y el nivel de evidencia (NE) para Ki-67 como factor pronóstico de SLE fue de IB, ya que los ensayos eran aleatorizados y hubo una revisión centralizada de las muestras. También se analizó la relación entre el nivel de expresión de Ki-67 y la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y el pronóstico, aunque sólo un estudio con un NE IIB concluyó que el Ki-67 elevado era predictivo de sensibilidad a la quimioterapia.

No cabe duda de que Ki-67 proporciona una información pronóstica sólida y que los valores altos predicen el beneficio de la adición de la quimioterapia citotóxica. Sin embargo, la utilidad clínica de Ki-67 como marcador pronóstico en la práctica clínica es controvertida debido a la dificultad de definir un único punto de corte, tanto porque Ki-67 muestra una distribución continua como por las barreras analíticas y pre-analíticas para estandarizar su evaluación. Así, mientras que los valores altos y bajos son reproducibles y clínicamente útiles, no parece haber ningún punto de corte óptimo, al menos para predecir la pCR. Un estudio multicéntrico demostró una escasa validez analítica inter-laboratorios, incluso entre algunos de los laboratorios más prestigiosos del mundo.⁷³ La colaboración internacional ha procurado mejorar la reproducibilidad y

concordancia de la evaluación de Ki-67.⁷⁴ Fruto de esta controversia, mientras que algunos grupos y consensos proponen combinar Ki-67 con RE, RPg y HER2 para una evaluación pronóstica y para la distinción entre los subtipos luminal A y luminal B,^{75,76} otros no recomiendan la utilización de este biomarcador como factor pronóstico.^{27,77}

Por otro lado, la hormonoterapia inhibe profundamente la proliferación tumoral. En el estudio IMPACT se comparó la expresión de Ki-67 en muestras de biopsia tumoral adquiridas antes y después de 2 semanas de tratamiento neoadyuvante con anastrozol, tamoxifeno o anastrozol más tamoxifeno en 158 pacientes con tumor primario RE+. Anastrozol suprimía la expresión de Ki-67 a las 2 y 12 semanas en un 76% y 82%, respectivamente, en comparación con el 60% y el 62% de tamoxifeno y el 64% y el 61% de la hormonoterapia combinada. En el análisis multivariante, un nivel alto de Ki-67 después del tratamiento hormonal se asociaba significativamente con una peor SLE, mientras que un valor basal elevado de Ki-67 no mostraba esta asociación.⁷⁸ Se ha desarrollado un índice pronóstico de hormonoterapia preoperatoria (PEPI *score*) para el riesgo de recaída basado en el estudio P024, un estudio que comparó letrozol y tamoxifeno durante 4 meses antes de la cirugía en 228 mujeres posmenopáusicas con tumores RE+ con estadios II-III. El índice PEPI integra el estado postratamiento del RE, Ki-67, grado histológico, tamaño tumoral patológico y el estado ganglionar para predecir la recaída. Las pacientes con una puntuación de PEPI de 0 y bajo estadio patológico (estadio 0-1) en la cirugía después de la hormonoterapia neoadyuvante tenían una tasa baja de recaída, mientras que aquellas con una alta PEPI tenían una alta tasa de recaída.⁷⁹ Este índice se validó de forma retrospectiva con pacientes del estudio IMPACT.

Las guías de ASCO no recomiendan basarse en el valor de Ki-67 para determinar si una paciente debería o no recibir quimioterapia ni para guiar la elección de la quimioterapia o de la hormonoterapia adyuvante.²⁷

1.2.7.2 Perfiles de expresión génica

Los perfiles de expresión génica utilizan la tecnología de *microarrays* que permite medir simultáneamente la actividad (expresión) de miles de genes en una célula de cáncer de mama. De esta manera hemos podido profundizar en la clasificación del cáncer de mama identificando varios subtipos diferentes de cáncer de mama (luminal A, luminal B, HER2-enriquecido y basal) con claras diferencias en su pronóstico y en la expresión de dianas terapéuticas.^{80,81} La lista de genes que diferencian estos subtipos se denomina *lista de genes intrínsecos* y se compone de varios grupos de genes relacionados con el receptor estrogénico (RE) -el grupo luminal-, el receptor HER2, la proliferación, y una agrupación específica de genes denominada grupo basal. Esta clasificación en subtipos intrínsecos predice significativamente el pronóstico y la eficacia de la quimioterapia neoadyuvante, con un valor predictivo negativo del 97% para la respuesta completa patológica, es decir, identificando de pacientes que muy

probablemente no responderán de forma completa a la quimioterapia. Sin embargo, esta clasificación molecular mediante *microarrays* es actualmente inaccesible para la mayoría de las pacientes. Por ello, la Conferencia de Consenso de St. Gallen adoptó una clasificación similar de subtipos basada en técnicas inmunohistoquímicas definida por los receptores RE, RPg, HER2 y el índice de proliferación Ki-67, más ampliamente disponible y con costes más asumibles.⁷⁶ No obstante, esta clasificación auxiliar a veces puede originar infra- o sobretamientos.

Los perfiles genómicos proporcionan por tanto una información pronóstica y predictiva más precisa y útil que complementa la que nos aportan los factores clínico-patológicos clásicos (edad, estadio tumoral, receptores hormonales, HER2, grado histológico, etc.). Se han desarrollado diferentes perfiles de expresión de múltiples genes como el *Recurrence Score* (RS) de 21 genes,⁸² el perfil de 70 genes,⁸³ *Prediction Analysis of Microarray 50* (PAM50),⁸⁴ EndoPredict, los índices del Grado Genómico (GGI) y el *Breast Cancer Index* (BCI) y otros más para ayudar a estimar de forma más precisa e individualizada el riesgo de recaída en una paciente concreta. Estos perfiles multigenéticos se han desarrollado a partir de estudios retrospectivos, y se han puesto en marcha varios estudios prospectivos para confirmar su validez y definir su utilidad clínica.

El **Recurrence Score (RS) de 21 genes** (Oncotype DX) es el perfil pronóstico mejor validado para pacientes con cáncer de mama RE-positivo, y puede además identificar a las pacientes con más probabilidades de beneficiarse de la quimioterapia adyuvante. El desarrollo del RS de 21 genes se basó en datos de pacientes con cáncer de mama RE-positivo con ganglios axilares negativos que habían sido incluidas en el estudio NSABP B-14 y fueron tratadas con tamoxifeno. La tasa de recidiva a distancia a 10 años en el grupo de bajo riesgo fue significativamente menor que la del grupo de alto riesgo (6,8 vs. 30,5%, $p < 0,001$).⁸² Por otro lado, el análisis retrospectivo del RS de 21 genes en el estudio NSABP B-20 en pacientes con cáncer de mama RE-positivo y ganglios negativos mostró un mayor beneficio de la adición de quimioterapia (CMF) en comparación con tamoxifeno solo en el grupo de pacientes que tenían un RS elevado (>30) (SLE a distancia a 10 años 88% vs. 60%, respectivamente; HR 0.26, IC 95% 0.13-0.53). Sin embargo, no se evidenció beneficio con la adición de CMF en las pacientes con un RS bajo (<18) o intermedio (19-30).⁸⁵ Estos análisis retrospectivos de ensayos clínicos prospectivos sugieren que el perfil de 21 genes puede predecir el beneficio de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama ER-positivo y ganglios negativos y un RS >30 , mientras que parece razonable no administrar quimioterapia adyuvante en aquellas pacientes con un RS <18 . Se han puesto en marcha varios grandes ensayos aleatorios para confirmar estos resultados, como el estudio TAILORx (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment [Rx]*) o el estudio RxPONDER (*Rx for Positive Node, Endocrine Responsive Breast Cancer*). Recientemente se han publicado los primeros resultados de este estudio. De las 10.253 pacientes incluidas con cáncer de mama RE-

positivo, HER2-negativo y ganglios negativos, las 1.626 mujeres (15,9%) que tenían un RS entre 0 y 10 fueron todas ellas asignadas a recibir hormonoterapia sola (sin quimioterapia). A los 5 años, en esta población de pacientes de bajo riesgo, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) invasiva era del 93,8% (IC 95%: 92,4-94,9), la SLE a distancia del 99,3% (IC 95%: 98,7-99,6), la supervivencia libre de recaída locorregional o a distancia fue del 98,7% (IC 95%: 97,9-99,2), y la supervivencia global del 98,0% (IC 95% 97,1 - 98,6).⁸⁶ Estos primeros resultados apoyan la utilidad clínica del RS de 21 genes para identificar pacientes con muy buen pronóstico en las que se podría evitar de forma segura la quimioterapia adyuvante. Aún están pendientes los resultados de las pacientes con un RS intermedio y alto. Del mismo modo, en el ensayo clínico PlanB del grupo alemán que incluía aproximadamente 2.400 pacientes con cáncer de mama RE-positivo y enfermedad pN0-1, en 348 pacientes (15,3%) con un RS ≤ 11 se omitió la quimioterapia adyuvante por recomendación del protocolo. Tras una mediana de seguimiento de 55 meses, en estas pacientes con un RS ≤ 11 y tratadas con hormonoterapia sola, la SLE a 5 años era del 94%, vs. 94% y 84% en las pacientes con RS 12-25 y RS > 25 que sí recibieron quimioterapia, respectivamente.⁸⁷ En un análisis exploratorio de subgrupos presentado recientemente, el subgrupo de 109 pacientes con 1-3 ganglios positivos y RS ≤ 11 tratadas con hormonoterapia sola tenían también un excelente pronóstico a pesar de no recibir quimioterapia, con una SLE a 5 años del 94%; prácticamente la misma que la de las 239 pacientes con ganglios es bajo.⁸⁸

El **perfil de 70 genes de Ámsterdam** se desarrolló como un marcador pronóstico a partir de microarrays de ADN de muestras congeladas de 98 pacientes < 55 años con cáncer de mama con ganglios negativos. Se comparó a las pacientes que recayeron en los primeros 5 años con las que seguían libre de enfermedad después de ≥ 5 años, y mediante un modelo matemático se calculó un *score* que diferenciaba a las pacientes con buen pronóstico de las de mal pronóstico.⁸³ A pesar de que el test fue aprobado inicialmente para su uso con tejido congelado no fijado, actualmente se ha adaptado para usarse con tejido fijado en formol e incluido en parafina. En la actualidad, el ensayo clínico MINDACT (*Microarray In Node-negative and 1–3 node-positive Disease may Avoid ChemoTherapy*) está investigando prospectivamente la utilidad clínica del perfil de 70 genes. A casi 6.700 mujeres incluidas con 0-3 ganglios axilares afectados se les realizó una doble evaluación del riesgo de recaída tanto por criterios clínicos (usando *Adjuvant! Online*) como por el perfil de 70 genes. Las pacientes con un riesgo discordante por la predicción genómica y la clínica fueron aleatoriamente asignadas a recibir o no quimioterapia adyuvante. Hubo 1.550 pacientes (23%) con un alto riesgo de recaída por factores clínicos pero un bajo riesgo por el perfil genético (incluyendo un 48% de pacientes con ganglios positivos, un 58% de tumores > 2 cm y un 29% de tumores de grado 3). La supervivencia libre de metástasis a distancia a 5 años en este subgrupo discordante fue del 95%, independientemente de si recibieron o no quimioterapia.⁸⁹ Estos resultados preliminares sugieren que este perfil genético puede identificar un

subgrupo de pacientes con tumores RE-positivos con un buen pronóstico con hormonoterapia sola a pesar de tener características clínicas de alto riesgo (incluyendo tamaño tumoral >2 cm y 1-3 ganglios positivos). Estos resultados podrían justificar el uso del perfil de 70 genes en pacientes con alto riesgo clínico, con una potencial reducción del uso de quimioterapia en un 46% en este subgrupo. Estamos a la espera del informe final de los datos del estudio MINDACT para confirmar estos resultados con un mayor seguimiento y valorar la utilidad clínica real de esta plataforma en la práctica clínica.

Como se ha comentado anteriormente, Perou et al. describieron varios subtipos específicos de cáncer de mama identificados tras un agrupamiento jerárquico no supervisado, denominados luminal, basal-like, normal-like, y HER2-enriquecido.⁸⁰ Estos subtipos intrínsecos fueron reproducidos en otras series⁸¹, y se diferenciaban en su evolución clínica, patrón de recaída y respuesta a la quimioterapia,⁹⁰ apoyando la idea de que representaban verdaderas entidades clínicas biológicamente diferentes. Sin embargo, estos primeros estudios se vieron limitados por el hecho de que se requería tejido fresco congelado. Para superar este obstáculo, Parker et al. desarrollaron un test clínico basado en qRT-PCR para el diagnóstico de los subtipos intrínsecos que podía realizarse en tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. El test, denominado **PAM50** (*The Predictor Analysis of Microarray 50*), se desarrolló a partir de 1.906 genes "intrínsecos" que fueron obtenidos por agrupamiento jerárquico, reduciéndolo a un set de 50 genes capaz de reproducir la clasificación de subtipos intrínsecos de forma fiable. Además, proporciona un índice numérico compuesto por el subtipo intrínseco (definido por el PAM50) y el tamaño del tumor, denominado *risk of recurrence* (ROR) *score* que permite clasificar a las pacientes en categorías de bajo, intermedio y alto riesgo. El ROR tenía un impacto pronóstico independiente y significativo en pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos⁸⁴. Con el fin de demostrar su utilidad clínica con un alto nivel de evidencia, se han realizado numerosos estudios prospectivos-retrospectivos que han confirmado el valor pronóstico independiente de PAM50 en cáncer de mama.⁹¹⁻⁹³ En un análisis retrospectivo realizado en 1.478 pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama con RE-positivos y ganglios negativos o positivos tratadas con hormonoterapia que participaron en el ensayo clínico ABCSG-8, las tasas de supervivencia libre de recaída a distancia a 10 años eran del 96,7%, 91,3% y 79,9% en los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, respectivamente, basados en el PAM50 ROR *score*.⁹⁴ Además, el índice ROR *score* puede identificar a pacientes con cáncer de mama con RE-positivos tratados con hormonoterapia con riesgo de recaída tardía. El grupo de bajo riesgo tenía un riesgo de metástasis tardías del 2,4% en comparación con 17,5% del grupo de alto riesgo.⁹⁵ Un análisis combinado de los estudios ABCSG-8 y ATAC comunicó similares resultados, que podrían ayudar a seleccionar a las pacientes que más podrían beneficiarse de la hormonoterapia extendida más allá de los 5 años de tratamiento.⁹⁶ En otro análisis de 1.017 pacientes posmenopáusicas tratadas con tamoxifeno o anastrozol adyuvante del

ensayo ATAC, el índice ROR tenía una relación continua con el riesgo de recaída a distancia a 10 años, tanto en pacientes con ganglios negativos como con ganglios positivos y añadía información pronóstica significativa en todos los subgrupos de pacientes. En el mismo análisis retrospectivo del ensayo ATAC se comparó la capacidad pronóstica del ROR *score* con el RS de 21 genes (Oncotype DX). Ambos test clasificaron un porcentaje similar de pacientes con tumores RE-positivos/HER2-negativo y ganglios negativos como de bajo riesgo con un riesgo de recaída similar, pero el ROR identificó más pacientes en el grupo de alto riesgo y menos en el grupo intermedio en comparación con el RS de 21 genes.⁹⁷

Prosigna® (NanoString Technologies, Seattle, EE.UU.) es un clasificador de subtipos y de riesgo basado en PAM50 que utiliza la plataforma NanoString nCounter® Dx para realizar el test de forma descentralizada en laboratorios convencionales. El test comercial proporciona una estimación precisa del riesgo de recaída a distancia en cáncer de mama con RE-positivos en consonancia con el test PAM50 basado en RT-PCR publicado anteriormente, habiéndose confirmado su validez analítica.⁹⁸

El perfil pronóstico **EndoPredict** (EP) está basado en ARN y utiliza la RT-PCR de 11 genes (8 genes relacionados con el cáncer y 3 genes de referencia) para calcular un *score* pronóstico. Fue validado utilizando los datos de dos ensayos clínicos randomizados del grupo austríaco (ABCSG-6 y ABCSG-8), en los que su valor pronóstico era independiente de los factores pronósticos clásicos.⁹⁹ EP parece ser útil para identificar un subgrupo de pacientes con tumores ER-positivos, HER2-negativo (y ganglios negativos) con un riesgo muy bajo de recaída sin quimioterapia adyuvante, y también parece identificar a las pacientes con bajo riesgo de recaída tardía.¹⁰⁰ Además, el EP *score* también se ha combinado con la afectación ganglionar y el tamaño tumoral para calcular un *score* de riesgo más completo denominado EPclin. El valor pronóstico de EPclin también se ha validado en los dos ensayos clínicos austríacos, en los que las tasas de recaída a distancia a 10 años eran del 4% y 4% en los subgrupos EPclin de bajo riesgo y del 28% y 22% en las pacientes con EPclin de alto riesgo en ABCSG-6 ($p < 0,001$) y ABCSG-8 ($p < 0,001$), respectivamente, siendo superior a todos los factores de riesgo clínico-patológicos clásicos y a las clasificaciones pronósticas derivadas de las guías clínicas habituales como la NCCN, alemana S3 y St. Gallen 2011.¹⁰¹

El impacto pronóstico de EP y EPclin se ha investigado también en 555 tumores ER-positivos y HER2-negativo del estudio GEICAM 9906, en el que 1.246 pacientes con tumores con ganglios positivos fueron aleatorizadas a quimioterapia adyuvante con FEC vs. FEC seguido de paclitaxel, seguido de hormonoterapia. EP era un potente marcador pronóstico independiente, no sólo en mujeres posmenopáusicas (HR 3,3, IC 95% 1.3-8.5; $p = 0,0109$), sino también en premenopáusicas (HR 6,7, IC 95% 2,4-18,3; $p = 0,0002$), demostrando que el significado pronóstico no estaba relacionado con el estado menopáusico.¹⁰² En esta misma cohorte de pacientes se ha comparado recientemente

EP con la versión de investigación de PAM50 (no estandarizada), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos test.¹⁰³ EP está comercializado en Europa y se puede realizar en laboratorios convencionales de biología molecular usando muestras incluidas en parafina tanto de las biopsias diagnósticas como de las piezas quirúrgicas.^{104,105}

1.2.8 Tratamiento del tumor primario

El tratamiento estándar del cáncer de mama consiste en la extirpación quirúrgica del tumor. Las técnicas quirúrgicas van desde una extirpación del tumor o de un segmento de la mama en el que asienta el tumor (cirugía conservadora de la mama) o una extirpación total de la glándula (mastectomía). El tipo de cirugía depende del tamaño y la localización del tumor, tamaño de la glándula mamaria y de la preferencia de la paciente. En el caso de optar por una cirugía conservadora, posteriormente se administrará un tratamiento radioterápico para reducir el riesgo de recidivas loco-regionales. Varios estudios con seguimiento a largo plazo han demostrado que la cirugía conservadora seguida de radioterapia es tan efectiva como la mastectomía radical para las pacientes con estadios I y II de cáncer de mama.^{7,106} La cirugía de la axila se realiza como procedimiento de estadificación del tumor, es decir, para definir la extensión de la enfermedad y así conocer mejor su pronóstico y poder tomar futuras decisiones de tratamiento. Puede tratarse de un muestreo, como la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) o de una extirpación amplia de los ganglios axilares (linfadenectomía axilar). El ganglio centinela es el ganglio linfático que presumiblemente recibe en primer lugar el drenaje linfático del tumor mamario. Varios estudios han demostrado que la BSGC es el abordaje preferible en la predicción del estado de los ganglios axilares, por su aceptable fiabilidad y por la disminución de la morbilidad relacionada con la cirugía axilar. Si la BSGC es negativa no es necesaria una cirugía adicional en la axila.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

La radioterapia post-operatoria se administra para eliminar posibles micrometástasis en el parénquima mamario, pared torácica y/o axila. Debería ofrecerse a todas las mujeres a las que se les ha practicado una cirugía conservadora de la mama. El metanálisis de Oxford, centrándose en las pacientes sometidas a cirugía conservadora de la mama, ha demostrado que la radioterapia post-operatoria reduce tanto el riesgo de recaída local a 10 años (de un 35% a un 19,3%) como el riesgo de muerte por cáncer de mama a 15 años (de un 25,2% a un 21,4%).⁷ Además, en las mujeres tratadas con mastectomía y vaciamiento axilar y que tenían afectación ganglionar, el riesgo de recidiva local a 5 años se redujo de 23,0% a 6,0% (reducción absoluta del 17%) y la mortalidad por cáncer de mama a 15 años disminuyó de un 60.1% a 54.7% (reducción absoluta del 5,4%) en el grupo que recibió radioterapia post-mastectomía frente al que no la recibió.¹¹¹

El tratamiento sistémico adyuvante se administra para eliminar posibles micro-metástasis que se hubieran podido implantar en cualquier parte del cuerpo antes o durante el procedimiento quirúrgico. Consiste en quimioterapia, hormonoterapia y/o tratamiento dirigido anti-HER2 con anticuerpos monoclonales. La quimioterapia adyuvante se introdujo alrededor del año 1970. Los clásicos ensayos clínicos de Bernard Fisher¹¹² y Gianni Bonadonna¹¹³ demostraron que la quimioterapia adyuvante después de la resección quirúrgica del cáncer de mama mejoraba significativamente la supervivencia. Gianni Bonadonna inició el primer ensayo clínico aleatorio que compara la poliquimioterapia versus no quimioterapia en pacientes con cáncer de mama con ganglios positivos. El resultado a largo plazo de la combinación de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo (CMF) demostró un beneficio en la supervivencia frente a no recibir quimioterapia.¹¹³ En la década de 1990 las antraciclinas se incorporaron al arsenal terapéutico adyuvante. El metanálisis de Oxford de 2005 demostró que la poliquimioterapia basada en antraciclinas producía una modesta mayor supervivencia en comparación con la poliquimioterapia tipo CMF.¹¹⁴ La siguiente gran contribución vino con la incorporación de los taxanos a la adyuvancia en la década de 2000, consiguiéndose un ligero aumento adicional de la supervivencia.¹¹⁵ La adición de los taxanos a un esquema de antraciclinas reducía la mortalidad por cáncer de mama en un 14 %, aunque de forma no estadísticamente significativa cuando se comparaba con esquemas de antraciclinas de mayor duración o intensidad de dosis más alta.³ El metanálisis de Oxford desde 2012 demuestra que el esquema CMF reduce la mortalidad por cáncer de mama en torno al 20-25%. Los modernos esquemas de quimioterapia (combinaciones o secuencias de antraciclinas y taxanos) reducen un 15-20% adicional en la mortalidad por cáncer de mama respecto a CMF.³ En resumen, el beneficio estimado de la administración de quimioterapia adyuvante es de una reducción relativa de la mortalidad por cáncer de mama a 10 años en un tercio respecto a no recibir quimioterapia, independientemente de la edad, la afectación ganglionar, tamaño tumoral, grado, estado de los receptores hormonales o el uso de tamoxifeno.³

El tratamiento quimioterápico preoperatorio en pacientes con cáncer de mama permite monitorizar la respuesta al tratamiento. No se han demostrado diferencias significativas en la SG entre las pacientes con cáncer de mama operable que reciben quimioterapia pre o postoperatoria.¹ Sin embargo, el grupo alemán ha demostrado en el estudio GeparTrio que el tratamiento preoperatorio guiado por la respuesta consigue una supervivencia libre de enfermedad significativamente más larga que el tratamiento convencional.¹¹⁶ Por otra parte, los resultados de un metanálisis del *Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer* (CTNeoBC) demuestran que las pacientes que obtienen respuesta completa patológica (RCp) en la mama y la axila (ypT0 ypN0) tenían mejor SG en comparación con las pacientes con tumor residual (HR 0,36; IC 95%, 0,31 - 0,42). Este impacto en la supervivencia se veía sobre todo en las pacientes con tumores más agresivos.¹¹⁷

La hormonoterapia adyuvante se ofrece únicamente a las pacientes con cáncer de mama con RE-positivo, ya que las pacientes con tumores RE-negativo no se benefician de este tratamiento.¹¹⁴ En las pacientes con cáncer de mama RE-positivo, 5 años de tamoxifeno reduce la mortalidad por cáncer de mama en aproximadamente un tercio después de 15 años de seguimiento. El efecto beneficioso del tamoxifeno es independiente del estado del RPg.¹¹⁸ Además, datos recientemente publicados han demostrado que en las mujeres con cáncer de mama RE-positivo continuar tamoxifeno hasta diez años en comparación con los cinco años de tratamiento reduce aún más la mortalidad por cáncer de mama, de 15,0% a 12,2% durante el seguimiento de 5 a 14 años (reducción de la mortalidad absoluta 2.8 %).¹¹⁹ A principios de la década del 2000, los inhibidores de aromataasa se incorporaron al tratamiento hormonal adyuvante para mujeres postmenopáusicas con cáncer RE-positivo.¹²⁰⁻¹²² Los inhibidores de aromataasa se pueden utilizar bien en monoterapia durante cinco años o como un tratamiento secuencial tras 2-3 años o tras 5 años de tamoxifeno. En comparación con tamoxifeno, los inhibidores de aromataasa reducen la tasa de recaídas a 5 años en torno a un 3% en términos absolutos y producen un efecto marginal sobre la supervivencia.¹²³

Las pacientes con tumores que sobre-expresan HER2 reciben tratamiento adyuvante con agentes biológicos como trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor HER2. Trastuzumab reduce el riesgo de recidiva en un 50 % y el riesgo de muerte en un 30 % como tratamiento adyuvante.^{48,49} Desde el año 2005 se ofrece 1 año de tratamiento con trastuzumab a las pacientes con cáncer de mama HER2-positivo que reciben quimioterapia adyuvante. La duración óptima del tratamiento con trastuzumab ha sido objeto de varios estudios. El estudio HERA no demostró ningún beneficio de 2 años frente a 1 año de tratamiento con trastuzumab,¹²⁴ y el estudio PHARE no pudo demostrar que 6 meses de tratamiento no era inferior a 1 año.¹²⁵ Sin embargo, el pequeño estudio FinnHER con un corto tratamiento de tan solo 9 semanas de trastuzumab mostró un beneficio en SLE para el tratamiento con trastuzumab, aunque no estadísticamente significativo (HR 0,65, IC 95%, 0,38-1,12; p=0,12).⁴⁷ Por ello, el tratamiento estándar hasta el momento sigue siendo 1 año de tratamiento con trastuzumab en combinación con quimioterapia.^{8,118,126} Recientemente, pertuzumab, otro anticuerpo monoclonal anti-HER2 ha sido aprobado por la FDA (*USA Food and Drug Administration*) y por la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento preoperatorio de las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tras publicarse los resultados de los estudios NeoSphere y TRYPHAENA. Las pacientes que recibieron una combinación de pertuzumab, trastuzumab y docetaxel obtuvieron una tasa de pCR significativamente mayor que aquellas que sólo recibieron trastuzumab y docetaxel, lo que posiblemente se asociará con una ventaja de supervivencia a largo plazo. Aunque el estudio no estaba diseñado formalmente para estudiar la supervivencia, de forma descriptiva se han comunicado las tasas de SLP a los 5 años de 81% (IC 95% 71-87) para

el grupo A, 86% (77-91) para el grupo B, 73% (64-81) para el grupo C y 73% (63-81) para el grupo D (HR 0,69 [95% CI 0,34-1,40] grupo B vs grupo A).^{127,128}

1.3. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva

Aunque el cáncer de mama metastásico (CMM) o estadio IV es una enfermedad incurable, la supervivencia ha aumentado progresivamente durante las últimas décadas, lo que probablemente esté relacionado, entre otros factores, con la introducción de nuevos tratamientos sistémicos.^{129,130} Según datos del estudio CASCADE sobre un total de 443 pacientes con CMM procedentes de 13 hospitales españoles, la mediana de supervivencia global es de 32,8 meses, con un rango de unos pocos meses a muchos años.¹³¹ Las pacientes con cáncer de mama en las que se detecta la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico (CMM de inicio o *de novo*) constituyen un 5-6%, y su pronóstico es ligeramente mejor al de aquellas diagnosticadas como recaída locorregional o a distancia de un tumor de mama inicialmente localizado tras un intervalo libre de enfermedad más o menos largo (mediana de SG 38,8 vs. 31,7 meses, respectivamente; $p=0.01$).¹³¹ Y el pronóstico de las pacientes con tumores luminales o HER2+ es significativamente mejor que el de las pacientes con tumores triple negativo (mediana de SG 38,6 vs. 19,0 meses; $p=0.01$).¹³²

1.3.1 Diagnóstico de la recidiva

Aún a pesar de los esfuerzos conjuntos de los distintos tratamientos adyuvantes, alrededor del 20% de las mujeres con cáncer de mama primario desarrollarán con posterioridad una recaída de su enfermedad que en la mayoría de las ocasiones será incurable y de la que finalmente fallecerán.

El diagnóstico de recaída del cáncer de mama a menudo se ha basado en una combinación de signos clínicos y/o radiológicos de recaída y no siempre por confirmación patológica de la sospecha de recaída. Antes de iniciar el tratamiento de la enfermedad metastásica, sea ésta diagnosticada al inicio (CMM *de novo*) o como recaída de un tumor de mama localizado diagnosticado anteriormente, las lesiones sospechosas de metástasis deberían ser biopsiadas como parte de la evaluación de la enfermedad metastásica. Esto asegura una confirmación de la extensión metastásica de la enfermedad y determina la histología tumoral y los factores pronósticos y predictivos de respuesta a los subsiguientes tratamientos sistémicos, como el RE, RPg y HER2. Esto es especialmente importante al inicio de la enfermedad metastásica para establecer el diagnóstico y descartar lesiones de otra naturaleza (lesiones benignas o segundos tumores malignos insospechados) y evitar tratamientos innecesarios o inadecuados. Y

también es especialmente importante si el tumor primario era negativo para RE, RPg y/o HER2, ya que una conversión de negativo a positivo cambiaría por completo la estrategia terapéutica.

Hasta hace unos pocos años se había considerado que la maquinaria molecular básica de un tumor individual no se modificaba en el curso de la enfermedad y los estudios con perfiles de expresión genómica demostraron que las muestras emparejadas de tumores primarios de mama y sus correspondientes metástasis de la misma paciente seguían siendo más similares entre ellas que con cualquier tumor de otra paciente.^{133,134} Por lo tanto se suponía que la expresión de receptores era asimismo estable en la evolución de un mismo tumor y no se consideraba necesario repetirlos en el tejido metastásico, a menudo difícil de obtener. Por ello, el manejo sistémico del cáncer de mama avanzado se ha basado durante muchos años en los biomarcadores del tumor primario, a pesar de que las recaídas se hayan producido años después del mismo.

Sin embargo, datos clínicos más recientes (incluyendo los datos de esta tesis) sugieren que las discordancias de los marcadores RE, RPg y HER2 entre el tumor primario y la enfermedad metastásica pueden ser clínicamente importantes, habiéndose comunicado discordancias de hasta un 33% en la determinación de HER2 entre el tumor primario y las metástasis en pequeños estudios retrospectivos, con un promedio alrededor del 10%.^{67,135-138} De igual forma se han comunicado hasta un 34% de conversiones en alguno de los receptores RE, RPg y/o HER2 en el subgrupo de tumores triple negativos.¹³⁸ En un análisis combinado de dos estudios prospectivos que incluyeron 289 pacientes, las tasas de discordancia de RE, RPg y HER2 entre el tumor primario y sus correspondientes metástasis fueron 13, 31 y 5,5%, respectivamente.¹³⁹ Estas discordancias consisten tanto en conversiones de estado negativo a estado positivo como en pérdidas de expresión del receptor en las recaídas de tumores primariamente positivos. Estos cambios de expresión del receptor parecen asociarse a un peor pronóstico para estas pacientes, posiblemente debido a que se les podría estar administrando un tratamiento inefectivo, o bien omitiendo un tratamiento efectivo.^{138,140-142} De hecho, se han comunicado respuestas cuando a las pacientes en las que se observó conversión del estado HER2 en la metástasis recibieron tratamiento con terapias anti-HER2.¹⁴³

No obstante, el significado clínico de estas observaciones resulta controvertido. En particular no está aclarado si estas observaciones suponen: 1) una discordancia técnica o error en la medición, (asociadas a la variabilidad en la interpretación y evaluación de las muestras, en los procedimientos de fijación y tinción, o en los límites de detección de las técnicas empleadas); la reproducibilidad de la metodología para determinar la expresión de HER2 es de un 80-85%, incluso dentro de un mismo laboratorio, como se ha puesto en evidencia en los recientes estudios internacionales de adyuvancia; 2) si son

fundamentalmente debidas a la heterogeneidad intratumoral, de manera que existirían simultáneamente regiones dentro del tumor con diferente expresión de receptores, aunque sólo uno de estos componentes daría lugar a la metastatización; o 3) suponen una adaptación biológica de las células del tumor que contribuye al mecanismo de resistencia y a la evolución hacia un fenotipo más agresivo. En todo caso, la detección de estas discordancias aumenta la posibilidad de identificar pacientes que podrían beneficiarse de un cambio en la estrategia terapéutica, por ejemplo, añadiendo una terapia anti-HER2 a pacientes con conversión HER2+ en sus metástasis.

Por ello, siempre que sea factible es aconsejable realizar una biopsia a las pacientes con enfermedad metastásica y particularmente cuando se diagnostica la recaída por primera vez, lo que no sólo establecerá el diagnóstico de cáncer de mama metastásico, sino que también permitirá un re-examen del estado de los biomarcadores.^{11,12} La realización de una biopsia de las lesiones metastásicas modifica el manejo clínico en el 14% de las pacientes.¹³⁹ Sin embargo, hay que tener en cuenta la ausencia de datos prospectivos de que la verificación del estado de receptor en las nuevas metástasis y los consecuentes cambios en el manejo clínico conduzcan finalmente a mejorar la calidad de vida y la supervivencia de las pacientes. Las guías clínicas basadas en consenso de expertos recomiendan, cuando hay discordancia de RE, RPg o HER2 entre el tumor primario y sus metástasis, utilizar los receptores de la metástasis para orientar el tratamiento sistémico, si es compatible con el contexto clínico y con los objetivos de la paciente.¹³

Aunque las biopsias de la enfermedad metastásica se recomiendan en la mayoría de las pacientes para confirmar el diagnóstico y re-evaluar los marcadores, puede haber alguna paciente en la que la información disponible en el tumor primario sea suficiente y compatible con el curso evolutivo de su enfermedad; por ejemplo, la aparición de metástasis óseas de difícil acceso en una paciente con un tumor primario originariamente RE+/HER2- tras un largo intervalo libre de enfermedad. Por otro lado, se debe tener precaución en la interpretación de la información obtenida a partir de biopsias óseas, ya que el procesamiento (descalcificación) puede alterar los resultados del RE y/o HER2, o las biopsias puede contener escasas células tumorales y los resultados pueden no ser fiables. Las dificultades técnicas que afectan al examen del tejido debido a la localización de la metástasis (por ejemplo, el hueso) se deben discutir con el patólogo de antemano.

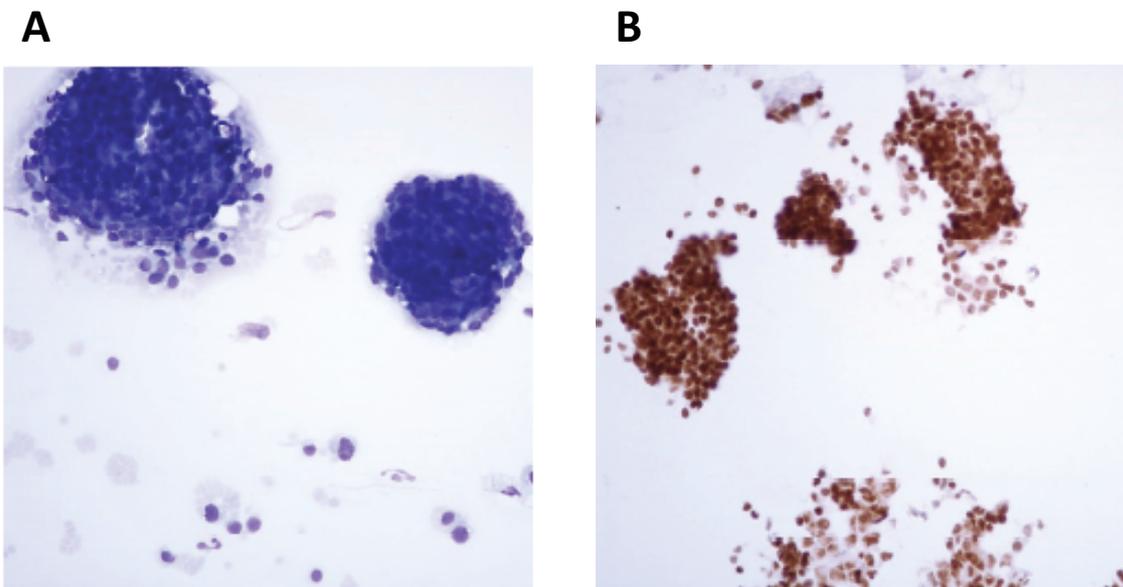
La mayoría de las localizaciones metastásicas están disponibles con métodos mínimamente invasivos. Las biopsias de las lesiones superficiales y palpables se pueden realizar sin la ayuda de técnicas de imagen.¹⁴⁴ Otras lesiones se pueden evaluar con técnicas percutáneas asistidas por imagen relativamente sencillas y con pocas complicaciones.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

Por último, la sospecha clínica de recaída debe incluir un estudio de extensión de rutina que incluya exploración física, pruebas bioquímicas (hemograma, función hepática, fosfatasa alcalina y marcadores tumorales) y técnicas de imagen. Las pruebas de imagen deben incluir tórax, abdomen (\pm pelvis) y esqueleto. Además, si estuvieran clínicamente indicadas, deberían realizarse otras exploraciones dirigidas a la sintomatología o signos clínicos que presente la paciente (como TAC o RNM cerebral, RNM de raquis, RNM hepática, radiografía convencional, etc.).¹²

1.3.1.1 Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF)

La PAAF es un método establecido utilizado desde hace décadas en el diagnóstico preoperatorio de lesiones sospechosas de la mama. Es fácil de realizar, causa muy pocas molestias a la paciente y conlleva un riesgo insignificante de complicaciones tanto en el tumor primario como en la metástasis.¹⁴⁵ Además, el desarrollo de anticuerpos monoclonales utilizados para la evaluación del RE, RPg y HER2 han hecho posible caracterizar biológicamente las muestras citológicas.¹⁴⁹ La fiabilidad de la PAAF en la evaluación de los receptores hormonales se ha documentado en numerosos trabajos,¹⁵⁰⁻¹⁵³ aunque para ello el uso de una fijación óptima en la PAAF es de gran importancia, ya que influirá decisivamente en la visualización de determinados antígenos (Fig. 6).^{149,153}

Figura 6. Punción Aspirativa con Aguja Fina (PAAF): A. Células tumorales en hígado en una recaída por cáncer de mama. B. Células tumorales de cáncer de mama RE-positivas en hígado.

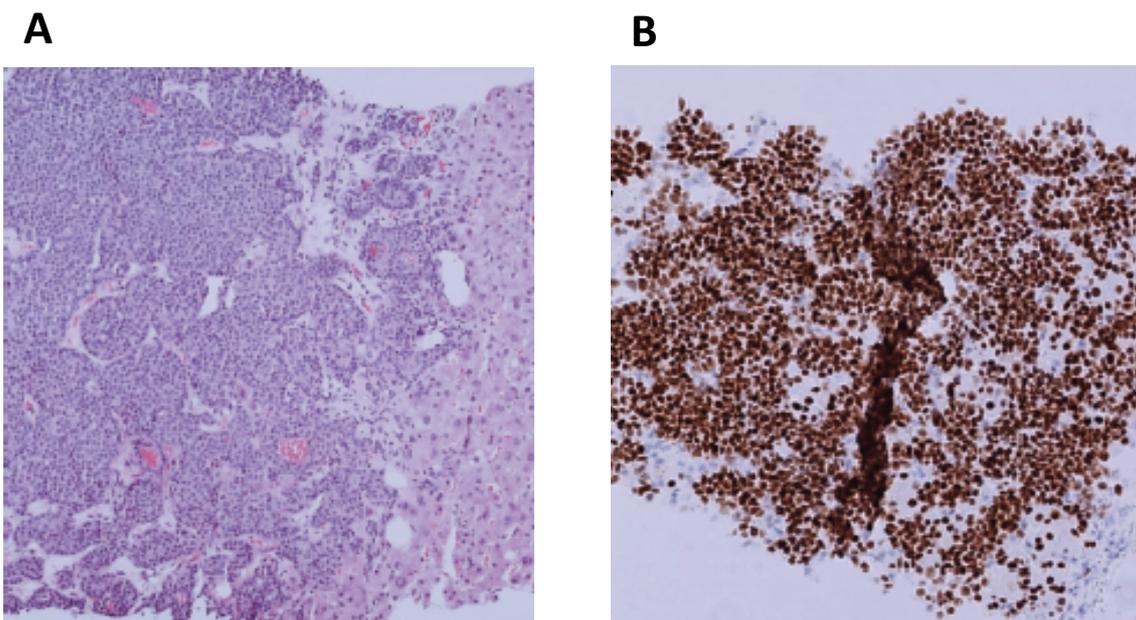


1.3.1.2 Biopsia con aguja gruesa (BAG)

La principal ventaja de la biopsia con aguja gruesa (BAG) es que permite tanto el análisis de un fragmento de tejido tumoral como del estroma circundante (Fig. 7). Investigaciones de los últimos años demuestran que los componentes del estroma pueden albergar funciones importantes para la progresión del cáncer de mama.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

La comparación de las dos técnicas PAAF y BAG en el cáncer de mama primario ha demostrado una mayor sensibilidad y una especificidad equivalente o mayor con la BAG respecto a la PAAF.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Varios estudios han revelado un alto nivel de concordancia en la evaluación del RE, RPg y HER2 entre los hallazgos obtenidos por inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.^{162,163} Por otro lado, otros estudios han demostrado una buena correlación entre la BAG y la biopsia escisional tanto para el RE (98,2%) como para HER2 (98,8%).¹⁶⁴

Figura 7. Biopsia con aguja gruesa (BAG). A. Células tumorales en hígado en una recaída por cáncer de mama. B. Células tumorales de cáncer de mama RE-positivas en hígado.



Sin embargo, tanto la PAAF como la BAG tienen la limitación potencial de que pueden dar lugar a un resultado falso negativo. Los mejores resultados se obtienen cuando un patólogo experimentado evalúa *in situ* la idoneidad de la muestra.¹⁴⁴ Además, para interpretar adecuadamente la inmunotinción, debería utilizarse preferiblemente siempre un control negativo y otro positivo para minimizar el riesgo de obtener falsos positivos y falsos negativos. Como se ha comentado anteriormente, hay que prestar especial atención al proceso de fijación, ya que contribuirá definitivamente a la visualización de determinados antígenos.^{149,153} Los antígenos nucleares como el RE

y RPg se visualizan mejor mediante la fijación de las muestras secadas al aire y después en formol.¹⁴⁹

Por otra parte, se requiere especial cuidado en la evaluación de las biopsias óseas, ya que el procedimiento de descalcificación ósea puede influir y reducir la tinción de RE, RPg y HER2.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

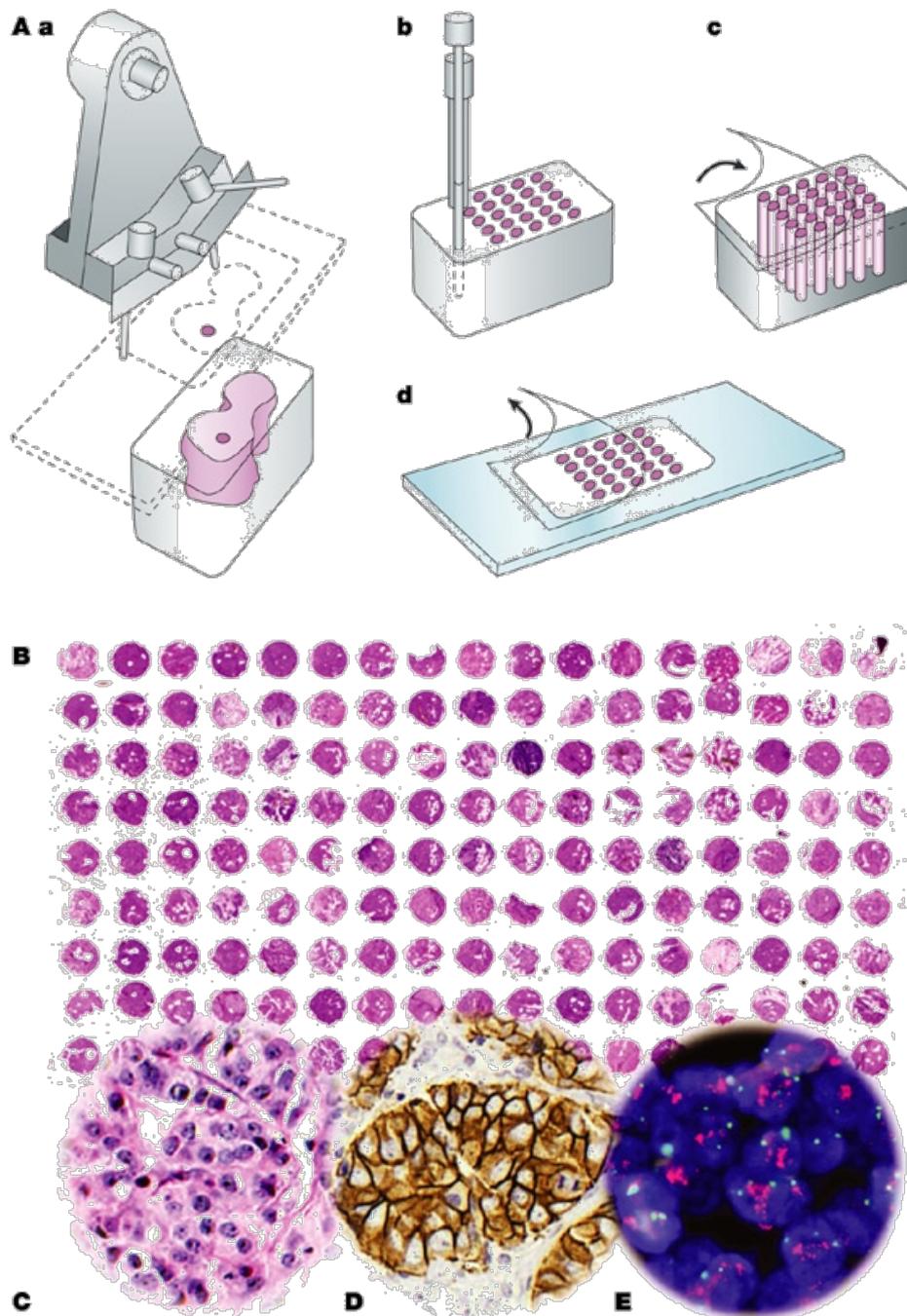
Un estudio prospectivo que evaluaba la confirmación histológica de pacientes con cáncer de mama metastásico con PAAF y BAG (121 biopsias) demostró un pequeño retraso en el inicio del tratamiento de aproximadamente 15 días y un evento adverso grave (hemorragia de una biopsia de la piel que se resolvió con medidas conservadoras). Sin embargo, este procedimiento ofrecía una mayor seguridad diagnóstica a los clínicos y mayor confianza a las pacientes, y la mayoría de las pacientes a las que se realizó una biopsia recomendaron la misma pauta de actuación a otras pacientes con sospecha de recidiva de un cáncer de mama.¹⁶⁸

1.3.1.3 Tissue Microarray (TMA)

La técnica de *Tissue Microarrays* (TMA) o micromatrices de tejido permite analizar numerosos biomarcadores en ADN y ARN (por hibridación in situ o FISH) y proteínas (inmunohistoquímica) en un gran número de tumores agrupados en una sola laminilla microscópica con un interés diagnóstico, pronóstico o predictivo de respuesta. A partir de los bloques tumorales, se seleccionan cilindros tisulares de diámetro variable (entre 0,5 y 5 mm) y se transfieren a otro bloque de parafina receptor con múltiples celdillas. La técnica, que se desarrolló en los años noventa, permite un considerable ahorro de tiempo y de tejido.¹⁶⁹ La fiabilidad del uso de los TMA en la evaluación de RE, RPg y HER2 en muestras tumorales está bien documentada.¹⁷⁰⁻¹⁷³ La concordancia descrita entre las TMA y las correspondientes secciones de cortes enteros para RE, RPg y HER2 fue de aproximadamente 85-95%, 81-88% y 90-100%, respectivamente.¹⁷⁴ Se observó una menor correlación para RPg lo que se ha atribuido a una expresión más heterogénea del RPg en el tumor en comparación con el RE.^{170,171,174}

En la figura 8 en la página siguiente se explica el proceso de construcción y resultado de un TMA.

Figura 8. Fabricación de TMA. A) Se extraen cilindros de tejido (generalmente de 0,6 mm de diámetro) de un bloque ("donante") de parafina convencional usando un *microarrayer* de tejido y se colocan en los orificios prefabricados de un bloque ("receptor") de parafina vacío. Se utilizan microtomos para cortar secciones de microarrays de tejido. El uso de un sistema de laminillas recubiertas con cinta adhesiva facilita la transferencia de secciones de TMA en el portaobjetos y minimiza la pérdida de tejido. B) Visión de conjunto de una sección de TMA teñida con hematoxilina-eosina (H&E). C-E) Ampliaciones de sectores de pocillos de tejido de diferentes experimentos: C) Tinción de H&E de tejido de cáncer de mama. D) IHQ de cáncer de mama usando el HercepTest (DAKO). E) Análisis FISH del mismo caso mostrando la amplificación de HER2 (señales rojas) con un número normal de copias del centrómero 17 (señales verdes).¹⁷⁵



1.3.2 Tratamiento del cáncer de mama metastásico (CMM)

Los objetivos principales del tratamiento sistémico del cáncer de mama metastásico (CMM) son la prolongación de la supervivencia, el alivio de los síntomas y la mejoría o mantenimiento de la calidad de vida a pesar de la toxicidad asociada con el tratamiento. Como se ha comentado anteriormente, la mediana de supervivencia global para el CMM es de 32,8 meses según datos del estudio CASCADE,¹³¹ con un rango de unos pocos meses a muchos años en función del subtipo tumoral, localizaciones metastásicas y carga tumoral.

Aunque ningún ensayo clínico prospectivo aleatorio ha demostrado que el tratamiento sistémico prolongue la supervivencia comparado con el mejor cuidado de soporte, sin embargo, la supervivencia media de las pacientes con CMM parece haber aumentado con el paso del tiempo. Esta tendencia se ha atribuido fundamentalmente a la disponibilidad de nuevos fármacos más eficaces, entre ellos los taxanos, los inhibidores de la aromataasa, fulvestrant y trastuzumab. Y determinados fármacos, en monoterapia o en combinación, han demostrado aumentar la supervivencia respecto a sus respectivos controles.^{54,176-178} Por tanto, se acepta que el tratamiento sistémico del CMM prolonga la supervivencia, mejora el control de síntomas y la calidad de vida, pero no es curativo. Por ello es preferible utilizar tratamientos asociados con un bajo perfil de toxicidad.

Existe controversia sobre cuál es la manera óptima de medir la eficacia terapéutica. La SG es el objetivo estándar para comparar tratamientos, pero requiere un seguimiento prolongado y puede contaminarse por los efectos de los subsiguientes tratamientos. Sin embargo, no se ha demostrado que ningún otro criterio de valoración -incluyendo la supervivencia libre de progresión (SLP), el tiempo hasta la progresión o la tasa de respuesta- sean un buen sustituto de la SG.¹⁷⁹ Las tasas de respuesta se han usado con frecuencia para comparar la eficacia relativa de un nuevo tratamiento, pero una tasa de respuesta elevada no necesariamente se traduce en incrementos de supervivencia clínicamente relevantes. Además, el control de síntomas sin una respuesta objetiva medible y la consecución de una enfermedad estable prolongada en comparación con la progresión de enfermedad pueden ser clínicamente importantes.

La selección de una determinada estrategia terapéutica depende tanto de la biología tumoral como de factores clínicos y preferencias de la paciente. Aunque un subgrupo de pacientes con enfermedad oligometastásica puede beneficiarse de un abordaje locorregional más intensivo, la mayoría de las pacientes con CMM reciben tratamiento sistémico que consiste en quimioterapia, hormonoterapia, terapias biológicas y cuidados de soporte.

Las pacientes con CMM se estratifican inicialmente en función de la presencia o no de metástasis óseas, ya que el tratamiento con agentes moduladores de hueso (bisfosfonatos, denosumab) reduce el riesgo de complicaciones esqueléticas (fracturas patológicas, compresión medular o necesidad de radioterapia o intervención quirúrgica sobre el hueso).^{180,181} Estos dos subgrupos de pacientes se estratifican a su vez por el estado de los receptores hormonales y HER2.

Las pacientes con CMM y RH positivos muy probablemente se beneficiarán de un primer tratamiento sistémico de tipo hormonal, de escasa toxicidad, que a su vez dependerá del estado hormonal de la mujer (pre/peri- o postmenopáusica). En mujeres postmenopáusicas, fulvestrant¹⁸² y los inhibidores de aromataasa¹⁸³ son los tratamientos hormonales más eficaces. Las mujeres premenopáusicas pueden recibir tratamiento con tamoxifeno o bien se realiza una ablación/supresión ovárica y después se añade un tratamiento hormonal como el de cualquier mujer postmenopáusica.¹⁸⁴ Diversos tratamientos han demostrado un beneficio significativo al combinarse al tratamiento hormonal en primera o sucesivas líneas, incrementando su eficacia y/o revirtiendo las resistencias, como los inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas (palbociclib, ribociclib)^{185,186} e inhibidores de mTOR (everolimus).¹⁸⁷

La hormonoterapia, en cambio, no es apropiada para pacientes con tumores RH-negativos, generalmente asociados con metástasis viscerales sintomáticas y cuyo tratamiento de elección es la quimioterapia. La quimioterapia está indicada para el CMM hormonorrefractario, es decir, pacientes con tumores RH-negativos (o aquellos con RH-positivos que han adquirido resistencia a la terapia hormonal), y para pacientes con CMM con RH-positivos y hormonosensibles pero en situación clínica comprometida con crisis visceral o con enfermedad sintomática rápidamente progresiva. Estas situaciones son poco frecuentes, pero en ocasiones no resulta fácil decidir cuándo utilizar la quimioterapia en lugar de la hormonoterapia como tratamiento inicial para pacientes con CMM con RH-positivos. En estos casos, después de que la respuesta a la quimioterapia se estabilice (generalmente después de 4-6 meses), cambiar a una hormonoterapia de mantenimiento es una estrategia habitual, que puede reducir los efectos secundarios del tratamiento sin comprometer la supervivencia global.¹⁸⁸ Del mismo modo, tampoco es obvio cuándo utilizar una quimioterapia de combinación en vez de monoquimioterapia, o cuál es la mejor forma de incorporar las terapias biológicas. La quimioterapia combinada (en lugar de la monoquimioterapia secuencial) es más apropiada cuando se considera que es más importante obtener la mayor probabilidad de respuesta que una potencial mayor toxicidad del tratamiento debido al riesgo de disfunción orgánica inminente ocasionada por la enfermedad metastásica. Sin embargo, no existen datos prospectivos que demuestren que la poli-quimioterapia de combinación mejore la SG respecto a la monoquimioterapia secuencial. Entre los fármacos preferidos se incluyen las antraciclinas (adriamicina, epirrubicina y adriamicina liposomal), los taxanos (paclitaxel, docetaxel y nab-paclitaxel), los anti-metabolitos

(capecitabina y gemcitabina) y los anti-microtúbulos no taxanos (eribulina y vinorelbina).¹²

Por último, las pacientes con CMM HER2-positivo obtienen un considerable beneficio de supervivencia con la adición de terapia dirigida anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab-emtansina y lapatinib) a un esquema de quimioterapia.^{52,54,55,189}

La imposibilidad de obtener una respuesta tumoral o beneficio clínico a 3 esquemas secuenciales de quimioterapia o el deterioro del estado funcional (ECOG ≥ 3) son indicaciones para suspender el tratamiento oncológico y proceder a un manejo exclusivamente sintomático o paliativo.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Como se ha comentado anteriormente en la [sección 1.3.1](#), hasta hace unos pocos años se había considerado que la maquinaria molecular básica de un tumor en particular no se modificaba a lo largo del curso de la enfermedad. Los estudios con perfiles de expresión genómica demostraron que las muestras apareadas de tumores primarios de mama y sus correspondientes metástasis de la misma paciente seguían siendo más similares entre ellas que con cualquier tumor de otra paciente.^{133,134} Por lo tanto se suponía que la expresión de receptores era asimismo estable en la evolución de un mismo tumor y no se consideraba necesario repetirlos en el tejido metastásico, a menudo difícil de obtener. Por ello, el manejo sistémico del cáncer de mama avanzado se ha basado durante muchos años en los biomarcadores del tumor primario, a pesar de que las recaídas se hayan producido años después del mismo.

Sin embargo, datos clínicos más recientes (incluyendo los datos que se aportan en esta tesis) sugieren que las discordancias de los marcadores RE, RPg y HER2 entre el tumor primario y la enfermedad metastásica pueden ser clínicamente importantes, habiéndose comunicado variaciones de hasta un 34% en alguno de los receptores en estudios pequeños y en la mayoría de los casos retrospectivos.^{67,135-138} Estas discordancias consisten tanto en conversiones de estado negativo a estado positivo como en pérdidas de expresión del receptor, lo que conlleva claras implicaciones pronósticas y terapéuticas, por cuanto se podría estar administrando un tratamiento inefectivo, o bien omitiendo un tratamiento efectivo.

Estas discordancias en el estado de los receptores RE, RPg y HER2 podría deberse a la adaptación biológica y **selección clonal** derivada de la adquisición de nuevas alteraciones genéticas durante la progresión tumoral y favorecida por el propio tratamiento adyuvante.¹⁹⁰ Sin embargo, otra posible explicación es la **heterogeneidad** intratumoral en cáncer de mama, ya que no es infrecuente la existencia de tumores poligenómicos compuestos por diferentes subclones que conviven de forma simultánea incluso dentro de la misma lesión metastásica. Estos tumores heterogéneos se componen generalmente de tan solo unas pocas subpoblaciones principales, que pueden estar anatómicamente separadas o mezcladas entre sí.^{191,192} A estos dos fenómenos biológicos se suma la **variabilidad de las técnicas** inmunohistoquímicas e ISH, en el manejo de las muestras, en los procedimientos de fijación y tinción, en la evaluación e interpretación y en los límites de detección y puntos de corte de las técnicas empleadas. Varios grandes estudios internacionales (ECOG 2197, ALTO, BIG 1-98)¹⁹³⁻¹⁹⁶ han abordado la concordancia entre la determinación del RE, RPg y/o HER2 en el laboratorio local donde se incluyó a la paciente y de manera centralizada en laboratorios académicos de alto volumen. En general, la tasa de falsos negativos para el RE estaba en el orden del 10%, mientras que la tasa de falsos positivos era del 5%

(laboratorio central versus laboratorio local). Para reducir toda esta variabilidad se han aprobado documentos de consenso con recomendaciones específicas respecto a la manipulación de las muestras, fijación y métodos de análisis, puntos de corte para la interpretación de resultados negativos, controles de calidad y estrategias de monitorización para laboratorios individuales, que probablemente mejorarán la reproducibilidad de estos biomarcadores.^{40,66}

Por todo ello, la comprobación del estado de los receptores RE, RPg y HER2 en las lesiones metastásicas podría representar un procedimiento fundamental para optimizar el tratamiento sistémico de las pacientes. La existencia de estas discrepancias, así como las mencionadas implicaciones clínicas y terapéuticas de las mismas conlleva la necesidad de profundizar en la caracterización del proceso de conversión de estos biomarcadores durante el proceso metastásico. En este sentido, el presente estudio pretende ampliar el conocimiento disponible acerca de este fenómeno, que podría repercutir en una optimización del tratamiento sistémico y, en consecuencia, en una mejoría en el pronóstico y calidad de vida de nuestras pacientes.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El estado de los receptores HER2 y RE se modifica a lo largo de la evolución del cáncer de mama en aproximadamente un 10% y un 20% de los tumores, respectivamente (con un porcentaje algo mayor para el receptor RPg), convirtiendo un estado inicialmente negativo en el tumor primario a un estado positivo en la metástasis, o al contrario (pérdida del estado positivo). Estos cambios en el estado de los receptores se producen en todos los subtipos tumorales (tumores RH-positivos/HER2-negativos, HER2-positivos y triple negativos) y se traducen también en cambios de subtipos moleculares entre el tumor primario y las metástasis, por lo que implican un cambio en el pronóstico y en el manejo terapéutico de las pacientes.

Estas conversiones en el estado de los receptores se deben al menos en parte a la variabilidad técnica en su determinación, que pueden ser minimizada evaluando los biomarcadores en un laboratorio central de referencia con amplia experiencia en cáncer de mama, en el que se analice de forma simultánea y con la misma metodología ambos tejidos (tumor primario y metastásico).

Sin embargo, las discrepancias en los receptores también pueden deberse a la heterogeneidad intratumoral del propio cáncer de mama y a la adaptación biológica de las células tumorales que a lo largo de la evolución de la enfermedad, impulsadas por presiones selectivas cambiantes, adquieren un fenotipo más agresivo en las metástasis. Probablemente los propios tratamientos sistémicos anti-tumorales y la radioterapia contribuyen a la aparición de subclones con mutaciones relacionadas con la resistencia que se convierten en dominantes en el tumor, lo que contribuye a la evolución hacia un fenotipo más resistente y agresivo. Por ello nuestra hipótesis es que los cambios más frecuentes en el estado de los receptores consisten en la pérdida de los receptores hormonales y la ganancia de HER2.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

El objetivo principal de esta tesis era determinar prospectivamente la tasa de conversión del estado de HER2 entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis en la población global y en cada subtipo de tumor primario (RH-positivo/HER2-negativo, HER2-positivo y triple negativo) definidos por técnicas IHQ/ISH, según las evaluaciones del laboratorio central.

4.2. Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios del estudio son:

1. Determinar prospectivamente la tasa de conversión de HER2, RE y RPg en la población global y en cada subtipo de tumor primario según las evaluaciones de los laboratorios locales, y la tasa de conversión de los receptores hormonales RE y RPg según las evaluaciones del laboratorio central.
2. Describir la tasa de conversión de subtipo tumoral (RH-positivo/HER2-negativo, HER2-positivo y triple negativo definidos por métodos IHQ/ISH) entre el tumor primario y sus respectivas metástasis, según las determinaciones del laboratorio central y de los laboratorios locales.
3. Analizar la variabilidad en la medición de los receptores HER2, RE y RPg entre los laboratorios locales y el laboratorio central.
4. Evaluar la asociación entre la tasa de conversión de los receptores HER2, RE y RPg determinada por el laboratorio central, la localización de las metástasis biopsiadas y el tratamiento previamente recibido.
5. Comparar la respuesta y el pronóstico de las pacientes con/sin conversión de receptores en términos de: tasa de respuesta objetiva, tiempo hasta la progresión y supervivencia libre de progresión al siguiente tratamiento tras la realización de la biopsia, y supervivencia global.
6. Analizar en qué medida las discordancias de HER2, RE y RPg entre el tumor primario y las metástasis modifican el manejo clínico de las pacientes.

PACIENTES Y MÉTODO

5. PACIENTES Y MÉTODO

5.1. Diseño del estudio

Para llevar a cabo los objetivos de esta tesis se propuso un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico. Se eligió un diseño prospectivo para evitar los sesgos de selección de los estudios previos que habían abordado hasta el momento esta misma cuestión. Y puesto que no existía suficiente evidencia de que las discordancias en los biomarcadores existieran realmente o de que pudieran implicar un peor pronóstico, ni que las modificaciones en la estrategia terapéutica pudieran mejorar los resultados en tales casos, nuestro estudio debía ser observacional. Por otro lado, el tamaño de la muestra solo podía alcanzarse con un esfuerzo conjunto de múltiples investigadores.

Dada la naturaleza del estudio (observacional, prospectivo y multicéntrico) se propuso su coordinación por el Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM), que aceptó en junta directiva (mayo/2009) actuar como promotor del estudio (Estudio CONVERTHER/GEICAM 2009-03). Los coordinadores del estudio fueron la directora y el doctorando de la presente tesis doctoral.

El protocolo del estudio fue a su vez aprobado por la Comisión de Investigación y el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de referencia del Hospital Provincial de Castellón, según los requisitos de la legislación española (anexo 2), y fue registrado en clinicaltrials.gov con el identificador NCT01377363. En mayo/2011 se aprobó una enmienda por la que se aprobaba aumentar el tamaño de la muestra, así como realizar determinaciones moleculares adicionales (en genes relacionados con el cáncer y con resistencia a terapias anti-HER2) en el MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas, EE.UU.).

El estudio fue llevado a cabo en los servicios de Oncología Médica de 31 hospitales españoles. El listado de los hospitales e investigadores participantes en el estudio se incluye en el anexo 1.

Para minimizar la variabilidad intrínseca de las técnicas IHQ y de ISH y reducir así la tasa de cambios en los receptores entre el tumor primario y sus metástasis atribuibles a la reproducibilidad de la técnica, tanto las muestras del tumor primario como del tejido metastásico serían re-analizadas en un laboratorio centralizado. Como laboratorio central se eligió el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por tratarse de un laboratorio académico de alto volumen con gran experiencia en estas técnicas y en particular en cáncer de mama. En este laboratorio dos

patólogos experimentados (OBG y JFL) realizaron el análisis centralizado, simultáneo y ciego de los receptores RE, RPg y HER2 de las muestras pareadas tumor primario-metástasis para cada paciente.

Los procedimientos de estudio se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki, revisada en 2008, y las directrices de Buena Práctica Clínica. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todas las pacientes antes de su inclusión en el estudio. En los anexos 3 y 4 se reproducen las copias de la hoja de información al paciente y formulario de consentimiento informado.

5.2. Población de estudio

La población de pacientes incluida en nuestra base de datos la componen mujeres diagnosticadas de un carcinoma primario de mama con sospecha clínica de presentar lesiones localmente recidivantes o metastásicas entre dic/2009 y marzo/2011. El tamaño muestral inicialmente previsto era de 175 pacientes, aunque posteriormente se aprobó una enmienda por la que se ampliaba la inclusión a 232 pacientes. Las pacientes debían además cumplir los criterios de selección descritos a continuación.

5.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado por escrito para su participación en el estudio.
- Mujeres mayores de 18 años.
- Paciente que haya sido diagnosticada de cáncer de mama y además esté diagnosticada o exista sospecha de recidiva loco-regional o enfermedad metastásica.
- Disponibilidad de una muestra parafinada del tumor primario.
- Paciente que tenga prevista durante las seis próximas semanas la realización de una biopsia mediante PAAF (punción aspirativa con aguja fina), BAG (biopsia con aguja gruesa) o biopsia quirúrgica de la lesión sospechosa de recidiva loco-regional o metástasis, según la práctica clínica habitual del centro.

Estas lesiones podían incluir una recaída local en la pared torácica, recaída ganglionar, metástasis cutáneas o subcutáneas y otros tejidos blandos accesibles, metástasis óseas, metástasis viscerales (pulmonares, hepáticas, cerebrales, etc.) o drenaje de líquido pleural, ascítico, pericárdico o cefalorraquídeo.

5.2.2 Criterios de exclusión

- Recaídas locales en mama homolateral o a distancia en mama contralateral.
- Pacientes diagnosticadas de una segunda neoplasia, a excepción del carcinoma de cérvix *in situ* y carcinoma de piel no melanoma correctamente tratados.
- Pacientes con un deterioro cognitivo que pudiera impedir la comprensión de lo redactado en el consentimiento informado, según el criterio del investigador.

5.3. Procedimientos del estudio

Para evitar los sesgos de selección de los estudios que habían abordado hasta el momento esta misma cuestión elegimos para nuestro estudio un diseño prospectivo. Por ello el protocolo del estudio no permitía la inclusión de pacientes a los que ya se hubiera realizado una biopsia con anterioridad.

Una vez se hubiera propuesto y planificado la biopsia de la lesión supuestamente metastásica o localmente recidivante según la práctica habitual de cada centro, la paciente podía ser incluida en el estudio. La visita de registro se realizaba previamente a la biopsia planificada de la lesión metastásica, y el plazo máximo permitido entre el registro de la paciente y la realización de la biopsia era de 6 semanas.

Para cada paciente se recogían la fecha de nacimiento, estado menopáusico, estadio tumoral, grado histológico, estado de los receptores (RE, RPg y HER2) del tumor primario según el laboratorio local, tipo de cirugía realizada y tratamiento antitumoral recibido hasta el momento, localización de la lesión metastásica y si se trataba de una primera recaída o una progresión de la enfermedad metastásica. En esta visita, el investigador declaraba el plan de tratamiento previsto para la paciente.

Las biopsias de las lesiones con sospecha de ser localmente recidivantes o metastásicas se analizaban en el laboratorio local, y del material sobrante se remitía una fracción junto con una muestra disponible del tumor primario de la misma paciente al laboratorio central (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia). En el laboratorio central dos patólogos experimentados (OBG y JFL) realizaron el análisis centralizado y ciego de los receptores RE, RPg y HER2 y del índice de proliferación nuclear Ki-67 de las muestras emparejadas tumor primario-metástasis para cada paciente. Una vez disponibles los resultados de la biopsia a nivel local, el oncólogo médico responsable evaluaba si existía o no discordancia en el estado de los biomarcadores entre el tumor primario y el tejido metastásico y si el plan de tratamiento debía ser modificado según su criterio y práctica asistencial. La decisión terapéutica adoptada tras la realización de la biopsia era de nuevo registrada en el cuaderno de recogida de datos.

En el caso de que existieran posteriores progresiones o recaídas locales y se procediera a la realización de una nueva biopsia de la lesión a criterio del oncólogo y según su práctica clínica habitual, era posible proceder del modo descrito anteriormente en el análisis del estado de los receptores en la metástasis.

5.3.1 Visitas del estudio

Durante el estudio se han realizado una visita basal denominada visita de registro, seguida de una primera visita de seguimiento 10 semanas después, posteriores visitas de seguimiento cada 6 meses y una visita final un año después de la inclusión de la última paciente en el estudio. Las visitas del estudio coincidían con las visitas programadas de la paciente según la práctica clínica habitual del centro. En dichas visitas se registraba la información disponible acerca de las variables descritas en el apartado 5.6. La recogida de la información en cada visita se ha realizado como se describe a continuación:

5.3.1.1 Visita de Registro

La visita de registro se llevaba a cabo tras haber propuesto a la paciente la realización de una biopsia de la enfermedad metastásica o recidiva locorregional, pero siempre antes de su realización. Se consideró que, tras la visita de registro, 6 semanas era un plazo de tiempo suficiente para llevar a cabo la biopsia y que, en caso de no realizarse en ese momento y plantearse una nueva biopsia en un momento posterior, debía obtenerse un nuevo consentimiento informado y repetir la visita de registro.

En la visita de registro del estudio se obtenía el consentimiento informado por escrito de la paciente y además se recogía la información disponible sobre datos demográficos, datos relacionados con el tumor primario y datos relacionados con las lesiones supuestamente metastásicas o localmente recidivantes.

5.3.1.2 Visitas de seguimiento

La primera visita de seguimiento se realizaba varias semanas (máximo 10) después de la visita de registro, es decir, cuando ya se disponía de los resultados de la biopsia analizada por el laboratorio local. Durante esta primera visita se recogieron los datos relacionados con las lesiones recidivantes y metastásicas, fecha y localización de la biopsia, resultado anatomo-patológico de la biopsia de acuerdo a las determinaciones del laboratorio local y decisión terapéutica adoptada tras la realización de la biopsia.

Del remanente de la muestra del tumor primario y de la lesión metastásica se enviaba una fracción al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la evaluación del estado de los receptores hormonales (RE y RPg) y HER2. Posteriormente, de las muestras sobrantes del análisis centralizado

se enviaron también al laboratorio del *MD Anderson Cancer Center* de Houston (Texas, EE.UU.) para el estudio de alteraciones genómicas mediante secuenciación masiva de 202 genes relacionados con el cáncer¹⁹⁷ y al laboratorio del Instituto de Oncología del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) para la determinación del subtipo molecular mediante la plataforma PAM50.¹⁹⁸

El resto de visitas de seguimiento se realizaban aproximadamente cada 6 meses y hasta un año después de la inclusión de la última paciente en el estudio, coincidiendo con las visitas realmente realizadas según la práctica clínica habitual del centro. Durante estas visitas se registraba el tratamiento antitumoral recibido, valoración de la respuesta y evaluación de la supervivencia. Si con posterioridad se hubiese realizado una nueva biopsia, también se recogían las determinaciones resultantes de RE, RPg y HER2.

5.4. Procesamiento de las muestras

5.4.1 Laboratorios locales

Se recuperaron de la historia clínica los informes anatómo-patológicos del diagnóstico del tumor primario. Las biopsias de las metástasis se analizaron en el laboratorio local en el momento de la recaída o tras sucesivas progresiones de enfermedad. La metodología utilizada para el análisis de estas muestras por IHQ e ISH a nivel local no estaba estandarizada y cada centro utilizó los instrumentos y anticuerpos comerciales de acuerdo a sus propios criterios y procedimientos de trabajo.

El protocolo del estudio no contemplaba que los laboratorios locales re-analizaran las muestras correspondientes al tumor primario. El tiempo transcurrido entre el diagnóstico del tumor primario y la aparición de las metástasis podía ser desde unos pocos meses a muchos años, y los procedimientos de análisis de ambas muestras, aun perteneciendo al mismo laboratorio, podían ser muy diferentes respecto a la forma de manipular las muestras, distintos anticuerpos monoclonales, distintos patólogos, controles de calidad, modificación de los puntos de corte para la interpretación de resultados, etc. Por ello era esperable que los resultados proporcionados por los laboratorios locales ofrecieran una mayor variabilidad.

5.4.2 Laboratorio central

El envío de las muestras pareadas (tumor primario y metástasis) al laboratorio central se realizó una vez completado el diagnóstico histopatológico definitivo de la lesión metastásica en el laboratorio local. La determinación del estado de los receptores

hormonales (RE y RPg), de HER2 y de Ki-67 se realizó de forma centralizada a partir de una fracción del remanente de las muestras del tumor primario y de las metástasis obtenidas por la práctica clínica habitual del centro. Todas las muestras estaban anonimizadas y se identificaron con el código del estudio, el número de la paciente, número del centro, la fecha de obtención y la indicación de si procedía del tumor primario o de la lesión localmente recidivante o metastásica.

En el caso de que las pacientes hubieran recibido quimioterapia neoadyuvante, se envió la muestra del tumor primario correspondiente a la biopsia diagnóstica, previa al inicio del tratamiento. Se solicitó además incluir representación del parénquima mamario yuxtatumoral, que sirviera de control interno para las determinaciones IHQ de los receptores hormonales (independientemente de la inclusión de controles positivos y negativos en cada ensayo).

Todas las muestras emparejadas correspondientes al tumor primario y a la lesión metastásica se analizaron al mismo tiempo y utilizando la misma metodología. La expresión del RE y el RPg se analizó en un equipo automatizado BenchMark XT (Ventana®) utilizando los correspondientes anticuerpos CONFIRM® (Ventana Medical Systems, Inc.). Para su cuantificación se utilizó el sistema de Allred, que valora tanto el porcentaje de células tumorales teñidas como la intensidad de la tinción. Los tumores con tinción nuclear en $\geq 1\%$ de las células tumorales o un Allred score ≥ 3 se consideraron RE-positivo o RPg-positivo.^{40,199} El análisis IHQ para la expresión de HER2 se llevó a cabo usando el anticuerpo monoclonal PATHWAY® anti-HER2 (clon 4B5) (Ventana Medical Systems, Inc.), considerando la expresión negativa (0, 1+), no concluyente (2+) o positiva (3+) en función de la intensidad y extensión de la tinción.²⁰⁰ En los casos de resultado no concluyente o equívoco para HER2 (2+)²⁰⁰ o cuando se observó un resultado discordante entre tumor primario y metástasis, se llevó a cabo hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando el Kit *HER2* FISH PharmDx® (Dako Denmark A/S) y los resultados se interpretaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Asimismo, se estudiaron directamente mediante FISH los casos que presentaron artefactos leves de fijación y las muestras citológicas.

El resultado de todas estas determinaciones fue analizado por dos patólogos con amplia experiencia en cáncer de mama de forma ciega e independiente (OBG y JFL). El análisis centralizado de las muestras procedentes del H. Clínico de Valencia (donde se ubicaba el laboratorio de referencia) fue realizado por JFL, que había participado en una fracción minoritaria de la evaluación local de dichos casos. Estos dos patólogos se encargaron también de introducir los datos en el eCRD, sin tener acceso al resto de datos clínicos de las pacientes.

5.5. Fuente y tratamiento de la información

La información se ha obtenido, en todos los casos, de la historia clínica de las pacientes que otorgaron su consentimiento por escrito para la utilización de sus datos, recogiendo las condiciones de actuación médica según la práctica clínica habitual.

Del remanente de la muestra del tumor primario y de la biopsia de la recaída o metástasis se envió una fracción al laboratorio central para el análisis centralizado de los receptores RE, RPg y HER2. Además, se han analizado las alteraciones genómicas de 202 genes relacionados con el cáncer mediante secuenciación masiva¹⁹⁷ y el subtipo intrínseco molecular mediante la plataforma PAM50, tanto en el tumor primario como en las metástasis.¹⁹⁸ Estos análisis moleculares se han realizado como parte de un subestudio en el centro MD Anderson Cancer Center de Houston (Texas, USA) y en el Instituto de Oncología Vall d'Hebron). Las pacientes debían expresar voluntariamente su consentimiento para la participación en el estudio y para el análisis de las muestras extraídas dentro de la práctica clínica habitual.

Toda la información clínica y el resultado de los análisis de laboratorio se introducían de forma anonimizada en un cuaderno de recogida de datos electrónico (eCRD) que se cumplimentaba a través de una página web mediante la metodología e-Clinical, asignándose de forma automática un código a cada paciente. Para ello a cada investigador se le entregó un código de usuario y una contraseña confidenciales e intransferibles. Los datos quedaban almacenados en una base de datos en los servidores centrales de Dynamic Solutions S.L., compañía responsable de la gestión de datos del estudio, y se registró ante la Agencia de Protección de Datos. Un año después de la inclusión de la última paciente en el estudio, después del registro de todos los datos de las visitas finales, se cerró la base de datos y fue transferida a la unidad de biometría y estadística de Dynamic Solutions S.L., que realizó el análisis de los datos. Tras completarse el análisis estadístico, la base de datos central fue transferida al promotor del estudio (GEICAM).

5.6. Variables del estudio

Las variables detalladas a continuación se han obtenido en las visitas del estudio, en la mayoría de los casos estaban disponibles en la historia clínica de la paciente.

5.6.1 Variable principal

La variable principal del estudio era la tasa de conversión del estado de HER2 entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis en cada subtipo de tumor

primario (RH-positivo/HER2-negativo, HER2-positivo y triple negativo) definido por técnicas IHQ e ISH, según la evaluación del laboratorio central.

La conversión de HER2 se define como la variación del estado de HER2 entre el tumor primario y las metástasis, tanto de un estado inicialmente negativo a positivo como de un estado inicialmente positivo a negativo.

La definición de los diferentes subtipos de cáncer de mama primario por métodos inmunohistoquímicos e ISH es la siguiente:

1. Subtipo RH-positivo: RE-positivo y/o RPg-positivo y HER2-negativo
2. Subtipo HER2-positivo: HER2-positivo, independientemente del estado de los RH
3. Subtipo Triple negativo: RE-negativo, RPg-negativo y HER2-negativo.

5.6.2 Variables secundarias

Las variables secundarias del estudio consisten en:

- Tasa de conversión del estado de HER2 en cada subtipo del tumor primario según la evaluación de los laboratorios locales.
- Tasa de conversión del estado del RE y RPg en cada subtipo del tumor primario según las determinaciones del laboratorio central y según las determinaciones de los laboratorios locales.
- Tasa de cambio del subtipo clínico (IHQ/ISH) entre el tumor primario y sus respectivas metástasis según las determinaciones del laboratorio central y según las determinaciones de los laboratorios locales.
- Viabilidad de la biopsia: Realizada o no realizada. Si se realizó finalmente la biopsia: Analizable o no analizable (material insuficiente para diagnóstico o resultado no concluyente).
- Grado de concordancia entre las determinaciones del estado de los receptores obtenidos por los laboratorios locales y por el laboratorio central.

5.7. Análisis estadístico

El 30 de julio de 2012, un año después de la inclusión de la última paciente en el estudio y después del registro de los datos de las visitas finales, se cerró la base de datos y fue transferida al departamento de biometría de Dynamic Solutions S.L. (Madrid), responsable del análisis estadístico.

El objetivo principal de esta tesis es determinar la tasa de conversión del estado de HER2 entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis en la población evaluable y en cada subtipo de tumor primario (RH-positivo, triple negativo y HER2)

definido por técnicas IHQ/ISH, según las evaluaciones del laboratorio central. Para este objetivo hemos presentado la estadística descriptiva de la estimación puntual (con los intervalos de confianza al 95%) de las proporciones de las pacientes que tras la recidiva loco-regional o metastásica han presentado conversión del estado HER2 según los diferentes subtipos de cáncer de mama primario (RH-positivo/HER2-negativo, HER2-positivo y triple negativo).

Para el resto de los objetivos, las variables cuantitativas se han descrito con medidas de centralización y de dispersión (media, mediana, desviación típica, cuartiles, mínimo y máximo). Las variables cualitativas se han descrito mediante las frecuencias absolutas y relativas. Se han calculado los intervalos de confianza al 95%, cuando ha sido preciso. No se han hecho imputaciones sobre los datos en ausencia, dejándose como valores perdidos.

En el análisis inferencial se han utilizado test paramétricos para aquellas variables continuas que cumplieran las condiciones de aplicación (por ejemplo, t-test) y los no paramétricos (por ejemplo, Chi-cuadrado, U de Mann-Whitney, Wilcoxon, etc.) para las variables ordinales, categóricas o que no cumplieran criterios paramétricos. Los test de hipótesis realizados han sido en todos los casos bilaterales y con un nivel de significación de 0,05.

Para evaluar la concordancia entre los resultados de la expresión de los receptores entre los laboratorios locales y el laboratorio central se ha utilizado el índice *kappa* de Cohen y se ha interpretado de acuerdo con Landis y Koch.²⁰¹ Todos estos análisis se han realizado utilizando el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.).

Las curvas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia post-recaída entre las pacientes con y sin conversión de HER2 se han comparado mediante el test log-rank.

5.7.1 Análisis planificados intermedio y final

El protocolo del estudio contemplaba la realización de un análisis estadístico intermedio una vez que se hubieran recogido todos los datos de la primera visita de seguimiento de la mitad de pacientes incluidas en el estudio. Tras este análisis preliminar se decidió presentar una enmienda relevante para ampliar el tamaño de la muestra y para realizar un análisis detallado de las mutaciones somáticas en 202 genes relacionados con cáncer y resistencia a terapias anti-HER2 mediante *Next Generation Sequencing* (NGS) en el centro MD Anderson de Houston (Texas, USA) y la determinación del subtipo molecular mediante la plataforma PAM50 en el Instituto de Oncología del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona). Estas modificaciones fueron recogidas en la

enmienda nº 1 (versión 1.0 de 30 de marzo de 2011) y aprobadas por el CEIC de referencia (anexo 1).

Además, tras el cierre del estudio estaba previsto realizar otro análisis estadístico para generar el informe final. El informe final del estudio fue remitido al promotor y al CEIC de referencia.

5.7.2 Determinación del tamaño de la muestra

El objetivo principal de esta tesis consistía en estimar la tasa de conversión del estado de HER2 entre los tumores primarios y sus respectivas metástasis en pacientes con cáncer de mama avanzado, en la población global evaluable y en cada subtipo de tumor primario.

Según los estudios retrospectivos previos, la tasa de conversión estimada de HER2 determinada por IHQ o FISH era de alrededor del 10% (rango 4-20%). Suponiendo que esta tasa de conversión era similar en cada subtipo molecular, con un error alfa de 0,05 para un contraste bilateral y una precisión de $\pm 0,09\%$, se necesitarían 43 pacientes para cada subtipo molecular, requiriendo la inclusión de 129 pacientes (43 x 3 subtipos moleculares).²⁰²

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{d^2} = \frac{1,96^2 * 0,10 * 0,90}{0,09^2} = 42,7$$

donde:

- $Z^2 = 1,96$ (ya que el nivel de confianza es del 95%)
- $p =$ proporción esperada (tasa de conversión estimada de 10% = 0,10)
- $q =$ probabilidad de fracaso, $1 - p$ (en este caso $1 - 0,10 = 0,90$)
- $d =$ precisión o error máximo admisible (en nuestro caso deseamos un 9%)

Estimamos que el 25% de las pacientes se perderían para el análisis debido a biopsias no viables o resultados no concluyentes (muestra insuficiente, tumor benigno, segundas neoplasias malignas, tumor primario archivado no válido, etc.), por lo que se requería un total de 172 pacientes para alcanzar el objetivo principal del estudio.

Sin embargo, tras realizar el análisis intermedio planificado (reseñado en la sección anterior) después de incluir las primeras 84 pacientes, la tasa de conversión de HER2 observada fue 3,57% (bastante más baja del 10% estimado inicialmente). Por este motivo se calculó de nuevo el tamaño de la muestra estimando en esta ocasión una tasa de conversión de HER2 del 4% (aproximación del 3,57% observado), un intervalo de confianza al 95% para un contraste bilateral y una precisión de $\pm 0,05\%$ (más ajustada a la nueva proporción esperada). Con estas premisas resultaba necesario incluir 59

pacientes válidas para cada subtipo molecular, requiriendo la inclusión de 177 pacientes en total. Añadiendo un 25% de pérdidas el tamaño muestral necesario para alcanzar los objetivos del estudio era de 222 pacientes.²⁰² Con estos cálculos estaba previsto alcanzar un mínimo de 7 casos de conversión en el estado de HER2 ($177 \cdot 4\% = 7,1$).

5.8. Aspectos éticos y legales

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Provincial de Castellón (CEIC de referencia), así como la enmienda nº 1 (versión 1.0 de 30 de marzo de 2011).

Puesto que se trataba de un estudio observacional, no se ha generado ningún riesgo adicional sobre las pacientes incluidas al no contemplarse ningún cambio en los procedimientos diagnósticos ni terapéuticos respecto a los que se sometería la paciente en condiciones de práctica clínica habitual.

Se ha obtenido el consentimiento informado por escrito de todas las pacientes incluidas en el estudio y para realizar los subanálisis moleculares. El estudio se ha llevado a cabo según los requerimientos de las normas internacionales relativas a la realización de estudios epidemiológicos, recogidas en las *International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies* (Council for the International Organizations of Medical Sciences – CIOMS-, Ginebra, 1991), así como en la Declaración de Helsinki (revisión de Seúl, octubre de 2008) que define los principios que deben ser escrupulosamente respetados por todas las personas implicadas en la investigación.

Asimismo, se ha respetado la ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica respecto a la utilización de las muestras biológicas con fines de investigación. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todas las participantes se ha ajustado a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

5.9. Financiación del estudio

Este estudio ha recibido una subvención sin condiciones de Roche. Esta financiación ha incluido el coste de los procesos de presentación y registro ante el CEIC y autoridades sanitarias, el diseño, mantenimiento y gestión de la base de datos, los honorarios de los profesionales involucrados en la recogida de datos, el coste derivado del análisis centralizado de las muestras, el análisis estadístico y las comunicaciones y publicaciones que se han generado. La financiación ha sido en todo caso independiente de los resultados del estudio.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Descripción general de la población del estudio

Durante 16 meses, desde el 11/diciembre/2009 hasta el 22/marzo/2011, se preseleccionaron 236 pacientes procedentes de 31 hospitales, de las cuales solo 196 cumplieron los criterios de selección y fueron incluidas en el estudio. Los motivos de exclusión de las 40 pacientes preseleccionadas y no incluidas se detallan a continuación:

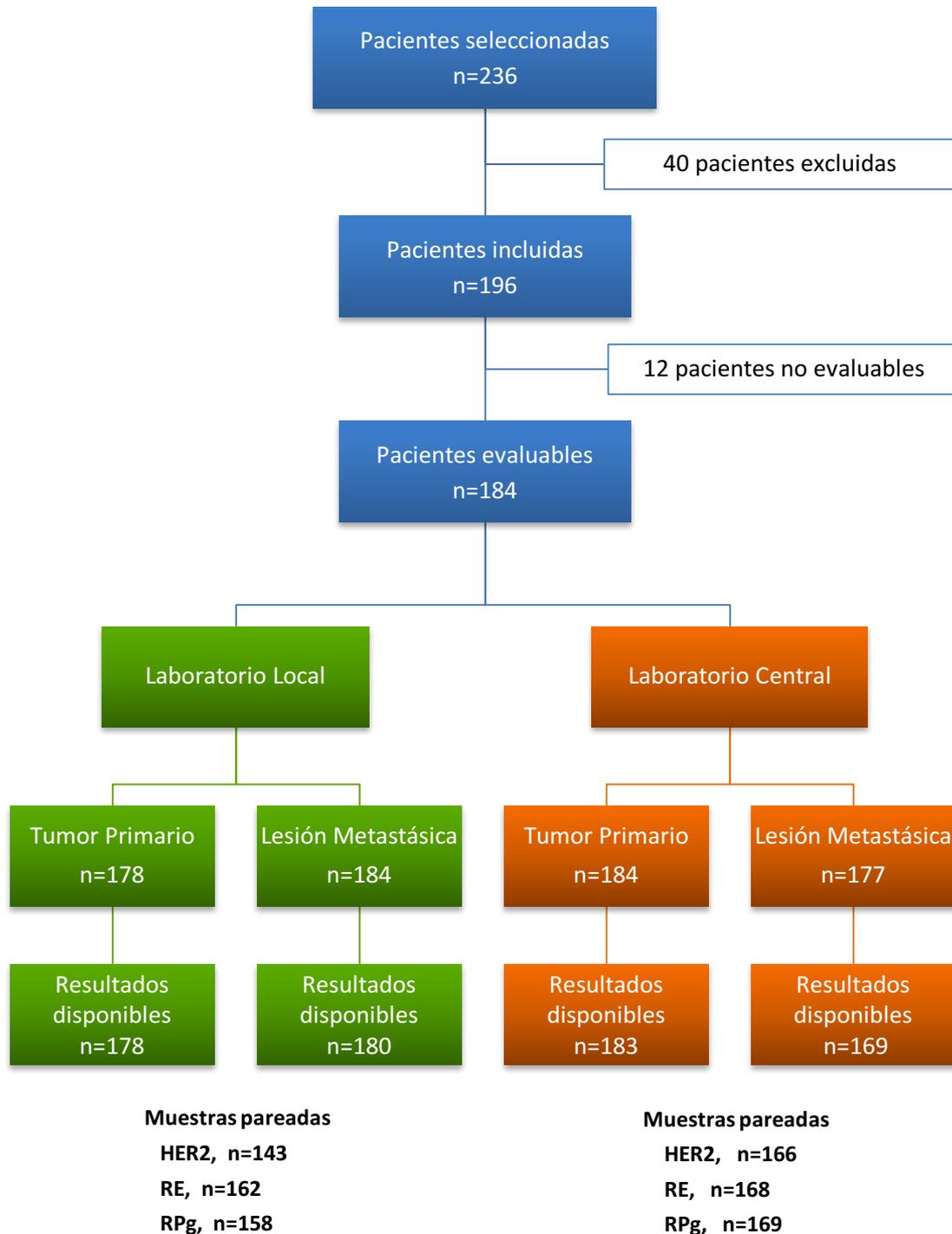
		N	%
Motivos de exclusión	Pacientes sin muestra parafinada del tumor primario (criterio de inclusión nº 4)	28	70
	Recaída local en mama homolateral o a distancia en mama contralateral (criterio de exclusión nº 1)	7	17,5
	Pacientes sin consentimiento informado por escrito (criterio de inclusión nº 1)	3	7,5
	Paciente varón (criterio de inclusión nº 2)	1	2,5
	Paciente sin datos (criterio de inclusión nº 3)	1	2,5

De las 196 pacientes incluidas, en 4 pacientes no llegó a realizarse la biopsia programada y 8 pacientes (4,1%) no tenían una recaída de cáncer de mama en la biopsia, a pesar de la sospecha clínica o diagnóstico inicial de recaída. A continuación se detallan los motivos para descartar a estas 12 pacientes incluidas de la población evaluable:

		N	%
Pacientes no evaluables	Biopsia no realizada o fallida	4	33,3
	Biopsia mostraba tejido normal	3	25
	Biopsia mostraba enfermedad benigna	3	25
	Biopsia mostraba un 2º tumor maligno	2	16,7

Tras descartar a las 40 pacientes que no cumplían los criterios de selección y a las 12 pacientes no evaluables, la población evaluable estaba finalmente constituida por 184 pacientes. En la figura 9 se presenta el diagrama de flujo con las distintas poblaciones de pacientes en cada fase del estudio.

Figura 9. Diagrama de flujo del estudio CONVERTHER.



6.2. Características de las pacientes a la entrada en el estudio

El análisis descriptivo se ha realizado con las 196 pacientes incluidas en el estudio. La mediana de edad de la población seleccionada era de 57 años (rango 29-92) y un 69% de ellas eran postmenopáusicas. Aunque la mayoría de las pacientes (66%) fueron inicialmente diagnosticadas de la enfermedad en un estadio temprano (I-II), 36 pacientes (22%) tenían un estadio localmente avanzado (estadio III) y 21 pacientes (12%) fueron diagnosticadas como estadio IV de inicio (CMM *de novo*). Más de la mitad (58%) de las pacientes fueron incluidas en el estudio en su primera recaída (incluyendo 5 pacientes con estadio IV al diagnóstico inicial); el resto (42%) fueron incluidas tras una segunda o posteriores progresiones de la enfermedad (independientemente de su estadio inicial). La mediana de tiempo desde el diagnóstico inicial hasta la primera recaída fue de 3,7 años (rango 0,0-19,3) y hasta la inclusión del estudio de 4,8 años (rango 0,0-19,3).

En la Tabla 3 se muestra un resumen de las principales características de las pacientes.

Tabla 3. Características de las pacientes a su entrada en el estudio.

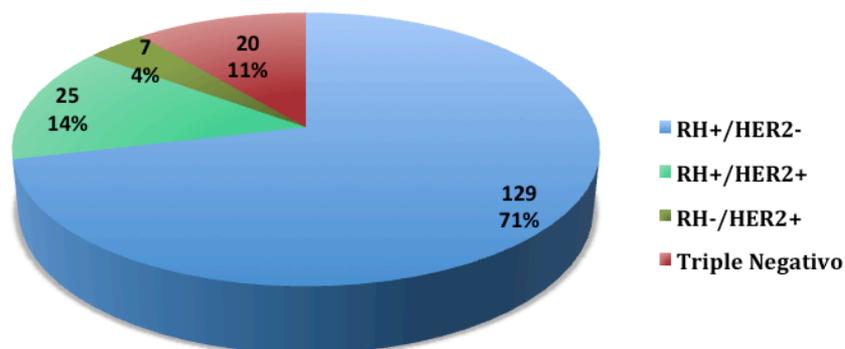
Características	n	%
Edad (años), n=196		
Mediana (rango)	57 (30-92)	
Estado menopáusico, n=196		
Pre-/Perimenopáusica	60	31
Postmenopáusica	136	69
Estadio tumoral al diagnóstico inicial, n=165		
I	26	16
II	82	50
III	36	22
IV	21	12
Tipo histológico, n=196		
Carcinoma ductal	165	84
Carcinoma lobulillar	21	11
Otros	10	5
Grado histológico al diagnóstico, n=163		
Grado 1	25	15
Grado 2	65	40
Grado 3	73	45
Tiempo desde el diagnóstico hasta la primera recaída, n=194		
Mediana (rango), años	3.7 (0.0-19.3)	
Tiempo desde el diagnóstico hasta la inclusión en el estudio, n=195		
Mediana (rango), años	4.8 (0.0-19.3)	
Estado de la paciente en la inclusión en el estudio, n=196		
Primera recaída	114	58
Segunda o subsiguientes progresiones	82	42
Localización de la recaída, n=191		
Recaída Loco-regional	36	19
Pared torácica	14	7
Ganglios linfáticos	22	12
Metástasis a distancia	155	81
Metástasis viscerales	69	36
Hueso	35	18
Cutáneas o subcutáneas	32	17
Partes blandas	10	5
Otras	9	4,7
Tratamiento recibido, n=196		
Cirugía del tumor primario, n=186		
Mastectomía	106	54
Conservadora	80	41
Tratamiento neoadyuvante y/o adyuvante, n=178		
Quimioterapia	158	81
Hormonoterapia	120	61
Radioterapia	112	57
Terapia dirigida	15	8
Tratamiento para la enfermedad avanzada, n=137		
Quimioterapia	93	47
Hormonoterapia	81	41
Terapia dirigida	59	30
Radioterapia	50	26

6.2.1 Distribución por subtipos del tumor primario

A continuación se presenta la distribución de los tumores primarios de acuerdo a la clasificación por subtipos clínicos (IHQ e ISH) según fue determinada inicialmente por los laboratorios locales y posteriormente por el laboratorio central.

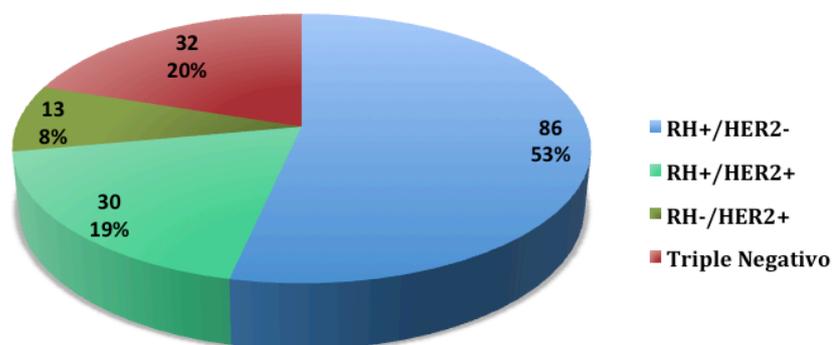
6.2.1.1 Laboratorios Central

Como era esperable la mayoría de los tumores correspondían a un subtipo RH-positivo/HER2-negativo (71,3%), mientras que los subtipos HER2-positivo (17,7%) y triple negativo (11%) eran menos frecuentes (Figura 10).



6.2.1.2 Laboratorio Locales

Aunque la mayoría de los tumores correspondían a un subtipo RH-positivo/HER2-negativo (53,4%), el subtipo RH-positivo/HER2-negativo estaba menos representado que en análisis centralizado. Le seguía en frecuencia el subtipo HER2-positivo (26,7%) y el subtipo triple negativo (19,9%) (Figura 11).



6.2.2 Estado de los receptores en el tumor primario

El análisis de los receptores HER2, RE y RPg se ha realizado en las 184 pacientes evaluables.

6.2.2.1 Laboratorio Central

Se envió muestra del tumor primario de 184 pacientes al laboratorio de referencia, aunque no se disponía de los datos de 1 paciente. Según la determinación realizada por el laboratorio central, en el 18% de las pacientes el tumor primario era HER2-positivo, el 81% expresaban RE-positivos y el 67% RPg-positivos (Tabla 4). Globalmente, un 85% de las pacientes tenían tumores con RH-positivos (RE-positivo y/o RPg-positivo). Un 66% de las pacientes tenían un índice de proliferación nuclear elevado (>13%), con una mediana de 20% (Q1 10,0%; Q3 31,8%).

Tabla 4. Estado de los receptores HER2, RE y RPg determinados en el laboratorio central.

		N	%
HER2 (n=183)	Positivo	33	18,0
	Negativo	149	81,4
	No concluyente	1	0,5
RE (n=183)	Positivo	149	81,4
	Negativo	33	18,0
	No disponible	1	0,5
RPg (n=183)	Positivo	123	67,2
	Negativo	60	32,8
	No disponible	-	-
Ki-67 (n=183)	Bajo ($\leq 13\%$)	58	31,7
	Alto ($> 13\%$)	120	65,6
	No disponible	5	2,7

6.2.2.2 Laboratorios Locales

Según la determinación realizada por los laboratorios locales, en el 24% de las pacientes el tumor primario era HER2-positivo, el 69% expresaban RE-positivos y el 54% RPg-positivos (Tabla 5). Globalmente, un 73% de las pacientes tenían tumores con RH-positivos (RE-positivo y/o RPg-positivo).

Tabla 5. Estado de los receptores HER2, RE y RPg determinados en las instituciones locales.

		N	%
HER2 (n=184)	Positivo	43	24,2
	Negativo	118	66,3
	No disponible	17	9,6
RE (n=184)	Positivo	123	69,1
	Negativo	55	30,9
	No disponible	6	3,3
RPg (n=184)	Positivo	96	53,9
	Negativo	81	45,5
	No disponible	7	3,8

6.2.3 Localización de la biopsia

De las 196 pacientes incluidas en el estudio, en 36 pacientes (19%) se sospechaba una recaída loco-regional y en 155 pacientes (81%) una metástasis a distancia. No se dispone de los datos de las 4 pacientes a las que no se llegó a realizar la biopsia y de una de las pacientes que tras la biopsia se demostró un segundo tumor. Las muestras de las recaídas loco-regionales originaron generalmente múltiples y grandes cilindros de tejido y permitieron una evaluación más correcta y fiable del estado de los receptores que las localizaciones metastásicas a distancia, que a menudo originaban cilindros pequeños o se muestrearon mediante citología por punción-aspiración con aguja fina.

La localización de la lesión localmente recidivante o metastásica sobre la que se realizó la biopsia se muestra en la Tabla 6:

Tabla 6. Localización de la lesión biopsiada.

		N	%
Localización (N=191)	Locorregional	36	18,8
	Recaída local en pared torácica	14	7,3
	Recaída en ganglios regionales	22	11,5
	Metástasis a distancia	155	81,2
	Metástasis visceral	69	36,1
	Hepática	44	23,0
	Pleuro-pulmonar	19	10,0
	Cerebral	3	1,6
	Otras	3	1,6
	Ósea	35	18,3
	Metástasis cutánea o subcutánea (a distancia)	32	16,8
	Recaída ganglionar / Partes blandas (a distancia)	10	5,2
	Ovario	6	3,1
	Peritoneo	3	1,6

De las 192 pacientes a las que se realizó la biopsia, en 184 casos (95,8%) se demostró una infiltración por carcinoma de mama, 3 casos (1,6%) correspondían a una lesión benigna, 2 casos (1%) a una segunda neoplasia maligna y 3 casos (1,6%) a tejido normal.

6.2.4 Tratamiento recibido antes de la inclusión en el estudio

6.2.4.1 Tratamiento del tumor primario

De las 196 pacientes incluidas, la gran mayoría de las pacientes (n=186; 95%) fueron intervenidas del tumor primario: 106 pacientes mediante mastectomía (57%) y 80 pacientes mediante cirugía conservadora (43%). Además, un elevado porcentaje de pacientes (91%) había recibido tratamiento antitumoral en el entorno neoadyuvante (n=58, 30%) y/o adyuvante (n=165; 84%), principalmente quimioterapia (81%). Los distintos tipos de tratamiento neo/adyuvante recibidos se muestran en la Tabla 3.

6.2.4.2 Tratamiento de la recaída

De las 196 pacientes incluidas, 137 pacientes (70%) habían recibido tratamiento anti-neoplásico para la enfermedad avanzada. Antes de la inclusión en el estudio, 82 pacientes (42%) ya habían iniciado o recibido una primera línea de tratamiento, incluyendo a 55 pacientes que se encontraban en su primera recaída o habían sido diagnosticadas de carcinoma metastásico *de novo*. Además, 34 pacientes (17%) habían recibido o iniciado 2 líneas de tratamiento, 6 pacientes (3%) 3 líneas, 7 pacientes (3,6%) 4 líneas y 8 pacientes (4%) 5 o más líneas de tratamiento. Los distintos tipos de tratamiento anti-neoplásico recibidos se muestran en la Tabla 3.

6.2.5 Estado al cierre de la base de datos

En el momento del cierre de la base de datos (30 de julio de 2012) habían fallecido 46 de las 195 pacientes incluidas, es decir, un 23,5% de la población del estudio. La mediana de seguimiento era de 16,3 meses (rango 0-27,8) y la supervivencia global (SG) a dos años era de 64,5% (IC95% 52,7-76,3), no habiéndose alcanzado la mediana de SG.

6.3. Tasa de conversión del estado de los receptores entre el tumor primario y sus metástasis

El objetivo principal de la tesis era determinar de forma prospectiva y centralizada la tasa de conversión del estado de HER2 entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis en la población global y en cada uno de los subtipos clínicos del tumor primario. Se ha definido la conversión de los receptores como la variación de su estado entre el tumor primario y las metástasis, tanto de un estado inicialmente negativo a positivo como de un estado inicialmente positivo a negativo.

A continuación se presentan los resultados de la tasa de conversión de los receptores según las determinaciones de los respectivos laboratorios locales y según el análisis del laboratorio central.

6.3.1 Tasa de conversión según el laboratorio central

La determinación de los receptores HER2, RE y RPg se realizó de forma simultánea y con la misma metodología en el tumor primario y en las metástasis para reducir al máximo las variaciones debidas a condicionantes técnicos.

De las 184 pacientes evaluables no se recibió muestra en el laboratorio central de la biopsia de la lesión metastásica en 7 casos; no se pudo evaluar el estado de los receptores en la muestra enviada del tejido metastásico en 8 pacientes, y la muestra procedente del tumor primario tampoco fue evaluable en 1 paciente.

En la figura 12 (al final de esta sección) se resumen los cambios en el estado de los receptores HER2, RE y RPg según las determinaciones del laboratorio central reflejando la dirección de los cambios (de estado positivo a negativo y viceversa).

6.3.1.1 Conversión de HER2

De las 166 pacientes con muestras pareadas para el estado de HER2 del tumor primario y su respectiva metástasis, el estado de HER2 se mostró muy estable con una **tasa de conversión de 3%** (IC 95%: 1,1 - 7,2).

Tabla 7. Tasa de conversión de HER2 de acuerdo a las determinaciones de laboratorio central.

		N	% Total	% Válido	IC 95%
Conversión HER2 (Lab. Central)	No conversión	161	87,5	97,0	92,8 - 98,9
	Conversión	5	12,5	3,0	1,1 - 7,2
	Cambio de + a -	0	0,0	0,0	-
	Cambio de - a +	5	2,7	3,0	1,1 - 7,2
	Total	166	90,2	100,0	-
Sin dato		18	9,8		
Total		184	100,0		

Las 5 pacientes que según los valores del laboratorio central cambiaron el estado de HER2 fueron de un estado negativo a un estado positivo. La mayoría de las conversiones (4 pacientes) se observaron en el subtipo RH-positivo (tasa de conversión 3%), con una sola conversión en el subtipo triple negativo (tasa de conversión 6%) y ninguna en el subtipo HER2-positivo. No se observaron diferencias en la tasa de conversión del estado de HER2 entre los diferentes subtipos (test exacto de Fisher, $p=0,443$).

Tabla 8. Tasa de conversión de HER2 según el estado del receptor en el tumor primario.

(Laboratorio Central)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
HER +	32	0	De + a -	0%
HER2 -	134	5	De - a +	3,7%
Total	166	5		3%

6.3.1.2 Conversión del RE

Para las 168 pacientes de las que se disponía de datos emparejados del estado del RE, la **tasa de conversión del RE fue del 13%** (IC del 95%: 8,6-19,4): se identificó un cambio de RE-positivo a RE-negativo en 17 pacientes y de RE-negativo a RE-positivo en 5 pacientes.

Tabla 9. Tasa de conversión de RE de acuerdo a las determinaciones del laboratorio central.

		N	% Total	% Válido	IC 95%
Conversión RE (laboratorio central)	No conversión	146	79,3	86,9	80,6 - 91,4
	Cambio de + a -	17	9,2	10,1	6,2 - 15,9
	cambio de - a +	5	2,7	3,0	1,1 - 7,2
	Total	168	91,3	100,0	-
Sin dato		16	8,7		
Total		184	100,0		

De todas las pacientes cuyo tumor primario era RE-positivo la tasa de conversión del RE fue del 12%, mientras que de las pacientes con tumores originalmente RE-negativos la tasa de conversión fue del 16%, resultando una tasa de conversión global del RE del 13%. De los 21 cambios en el RE, 10 se produjeron en el subtipo RH-positivo (tasa de conversión 8%), 9 en el subtipo HER2-positivo (tasa de conversión 29%) y 2 en el subtipo triple negativo (tasa de conversión 11%). Las diferencias en la tasa de conversión del RE entre los tres subtipos eran estadísticamente significativas (test exacto de Fisher, $p < 0,05$).

Tabla 10. Tasa de conversión del RE según el estado del receptor en el tumor primario.

(Laboratorio Central)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
RE +	135	16	De + a -	11,9%
RE -	32	5	De - a +	15,6%
Total	167	21		12,6%

6.3.1.3 Conversión del RPg

Para las 169 pacientes de las que se disponía de datos emparejados del estado del RE, **la tasa de conversión del RPg fue del 28%** (IC del 95%: 21,9-35,9): se identificó un cambio de RPg-positivo a RPg-negativo en 35 pacientes y de RPg-negativo a RPg-positivo en 13 pacientes.

Tabla 11. Tasa de conversión de RPg de acuerdo a las determinaciones del laboratorio central.

		N	% Total	% Válido	IC 95%
Conversión RPg (Lab. Central)	No conversión	121	65,8	71,6	64,1 – 78,1
	Conversión de + a -	35	19,0	20,7	15,0 - 27,8
	Conversión de - a +	13	7,1	7,7	4,3 - 13,1
	Total	169	91,8	100,0	-
Sin dato		15	8,2		
Total		184	100,0		

De todas las pacientes cuyo tumor primario era RPg-positivo la tasa de conversión del RPg fue del 30%, mientras que de las pacientes con tumores originalmente RPg-negativos la tasa de conversión fue del 24%, resultando en conjunto una tasa de conversión global del RPg del 28%. La tasa de conversión del RPg era del 27% en el subtipo RH-positivo, 42% en el subtipo HER2-positivo y del 11% en el subtipo triple negativo (test exacto de Fisher, $p=0,042$).

Tabla 12. Tasa de conversión del RPg según el estado del receptor en el tumor primario.

(Laboratorio Central)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
RPg +	115	34	De + a -	29,6%
RPg -	54	13	De - a +	24,1%
Total	169	47		27,8%

6.3.1.4 Conversión de los RH

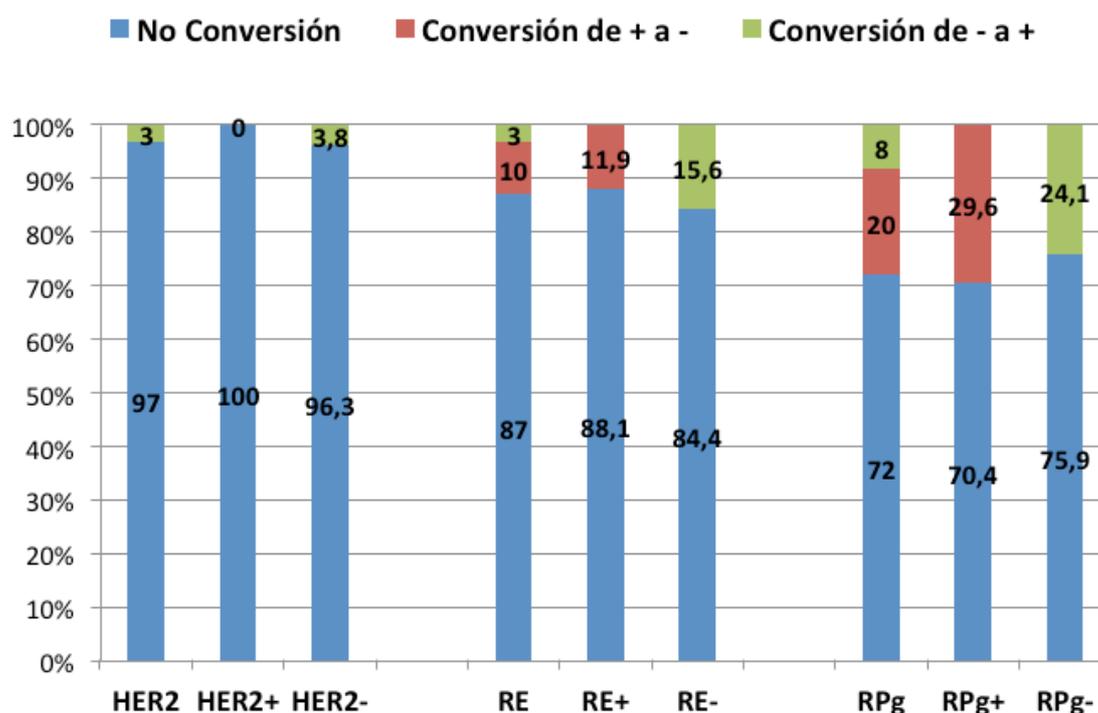
Considerando conjuntamente los receptores hormonales RE y RPg, 20 pacientes cambiaron el estado de sus RH del tumor primario a la metástasis, con una **tasa de conversión de los RH del 12%** (IC del 95%: 7,6–18,0). De esas 20 pacientes, 14 cambiaron de RH-positivos a RH-negativos mientras que 6 pacientes cambiaron de RH-negativos a RH-positivos. La tasa de conversión cuando los RH eran inicialmente positivos fue del 10% mientras que cuando los RH eran positivos fue del 24%, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13. Tasa de conversión de los receptores hormonales (RH) según el estado de los RH en el tumor primario y de acuerdo a las determinaciones del laboratorio central.

(Laboratorio Central)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
			De + a -	De - a +
RH+ (RE + y/o RPg +)	143	14	9,8%	
RH – (RE– y RPg–)	25	6		24%
Total	168	24		11,9%

En la figura 12 se resumen gráficamente los resultados de las tasas de conversión de los tres biomarcadores y el sentido de los cambios, determinados en el laboratorio central.

Figura 12. Porcentaje de pacientes con cambios en el estado de los receptores HER2, RE y RPg entre el tumor primario y sus metástasis según las evaluaciones del laboratorio central.



6.3.1.5 Tasa de conversión de HER2, RE y RPg en los diferentes subtipos definidos por el laboratorio central

Además de analizar la tasa de conversión de HER2 en la población global, el objetivo principal del estudio consistía en determinar la tasa de conversión de HER2 en los diferentes subtipos clínicos de tumor primario (RH-positivo/HER2-negativo, HER2-positivo y triple negativo) definidos por el laboratorio central. En la Tabla 14 se observa

que el receptor HER2 permanece muy estable en todos los subtipos con una tasa de conversión muy baja (0% en el subtipo HER2-positivo, 3% en el subtipo RH-positivo y 6% en el subtipo triple negativo) y sin diferencias significativas entre los diferentes subtipos. En cambio, la tasa de conversión de los receptores hormonales es en general más elevada, siendo mayor en los subtipos RH-positivo y HER2-positivo comparada con el subtipo triple negativo (test exacto de Fisher, $p < 0,05$).

Tabla 14. Tasas de conversión del estado de HER2, RE y RPg en los diferentes subtipos de tumor primario definidos por el laboratorio central.

Lab. Central	Global		RH-positivo		HER2-positivo		Triple negativo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
HER2 (n=165)								
Sin conversión	160	97	113	97	31	100	16	94
Conversión	5	3	4	3	0	0	1	6
De + a -	0/31	0	-	-	0/31	0	-	-
De - a +	5/134	4	4/117	3	-	-	1/17	6
Test de Fisher	$p=0.443$							
RE (n=167)								
Sin conversión	146	87	108	92	22	71	16	89
Conversión	21	13	10	8	9	29	2	11
De + a -	16/135	12	10/116	9	6/19	32	-	-
De - a +	5/32	16	0/2	0	3/12	25	2/18	11
Test de Fisher	$p < 0.05$							
RPg (n=169)								
Sin conversión	120	72	86	73	18	58	16	89
Conversión	47	28	32	27	13	42	2	11
De + a -	34/115	30	24/97	25	10/18	55	-	-
De - a +	13/54	24	8/21	38	3/13	23	2/18	11
Test de Fisher	$p=0.042$							

Los valores en las filas "De + a -" y "De - a +" corresponden al número de conversiones respecto al total de pacientes con receptor positivo o negativo, respectivamente.

6.3.2 Tasa de conversión según laboratorios locales

La mediana de tiempo transcurrido entre las determinaciones de los receptores del tumor primario y los de la metástasis en los laboratorios locales fue de 52 meses, mientras que en el laboratorio central ambas determinaciones se realizaron simultáneamente.

De las 184 pacientes evaluables disponemos de los resultados de la biopsia de las lesiones metastásicas de todas las pacientes, pero no se pudieron conseguir los informes anatomo-patológicos originales correspondientes al tumor primario de 6 pacientes. En otras 4 pacientes no se pudo evaluar el estado de los receptores en la muestra del tejido metastásico.

En la figura 13 (al final de esta sección) se resumen los cambios en el estado de los receptores HER2, RE y RPg según las determinaciones locales reflejando la dirección de los cambios (de estado positivo a negativo y viceversa).

6.3.2.1 Conversión de HER2

Para las 143 pacientes de las que se disponía de datos emparejados del estado de HER2, **la tasa de conversión de HER2 fue del 16%** (IC del 95%: 10,7-23,4), considerando tanto las ganancias (14 pacientes) como las pérdidas (9 pacientes) de la sobreexpresión o amplificación de HER2.

Tabla 15. Tasa de conversión de HER2 de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

		N	% Total	% Válido	IC 95%
Conversión HER2 (laboratorio local)	No conversión	120	65,2	83,9	76,6 - 89,3
	Conversión	23	12,5	16,1	10,7 - 23,4
	Cambio de + a -	9	4,9	6,3	3,1 - 12,0
	Cambio de - a +	14	7,6	9,8	5,7 - 16,2
	Total	143	77,7	100,0	-
Sin dato		41	22,3		
Total		184	100,0		

De todas las pacientes cuyo tumor primario era HER2-positivo, la tasa de conversión del receptor fue del 23%, mientras que de las pacientes con tumores originalmente HER2-negativos la tasa de conversión del estado de HER2 fue del 13%, resultando una tasa de conversión global de HER2 del 16% (Tabla 16).

Tabla 16. Tasa de conversión de HER2 según el estado del receptor en el tumor primario y de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

(Laboratorio local)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
HER +	39	9	De + a -	23,1%
HER2 -	104	14	De - a +	13,5%
Total	143	23		16,1%

6.3.2.2 Conversión del RE

Para las 162 pacientes de las que se disponía de datos emparejados del estado del RE, la tasa de conversión del RE fue del 21% (IC del 95%: 15,7-28,9): se identificó un cambio de RE-positivo a RE-negativo en 15 pacientes y de RE-negativo a RE-positivo en 20 pacientes.

Tabla 17. Tasa de conversión de RE de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

		N	% Total	% Válido	IC 95%
Conversión RE (laboratorio local)	No conversión	127	69,0	78,4	71,1 - 84,3
	Cambio de + a -	15	8,2	9,3	5,5 - 15,1
	Cambio de - a +	20	10,9	12,3	7,9 - 18,6
	Total	162	88,0	100,0	-
Sin dato		22	12,0		
Total		184	100,0		

Sin embargo, de todas las pacientes cuyo tumor primario era RE-positivo la tasa de conversión del RE fue del 13%, mientras que de las pacientes con tumores originalmente RE-negativos la tasa de conversión fue del 41%, resultando una tasa de conversión global del RE del 21,6% (Tabla 18).

Tabla 18. Tasa de conversión del RE según el estado del receptor en el tumor primario y de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

(Laboratorio local)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
RE +	113	15	De + a -	13,3%
RE -	49	20	De - a +	40,8%
Total	162	35		21,6%

6.3.2.3 Conversión del RPg

Para las 158 pacientes de las que se disponía de datos emparejados del estado de RPg, **la tasa de conversión del RPg fue del 35%** (IC del 95%: 27,5-42,8): se identificó un cambio de RPg-positivo a RPg-negativo en 35 pacientes y de RPg-negativo a RPg-positivo en 20 pacientes.

Tabla 19. Tasa de conversión de RPg de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

		N	% Total	% Válido	IC 95%
Conversión RP (laboratorio local)	No conversión	103	56,0	65,2	57,2 - 72,5
	Cambio de + a -	35	19,0	22,2	16,2 - 29,6
	Cambio de - a +	20	10,9	12,7	8,1 - 19,2
	Total	158	85,9	100,0	-
Sin dato		26	14,1		
Total		184	100,0		

Sin embargo, de todas las pacientes cuyo tumor primario era RPg-positivo la tasa de conversión del RPg fue del 40%, mientras que de las pacientes con tumores inicialmente RPg-negativos la tasa de conversión fue del 29%, resultando una tasa de conversión global del RPg del 35%.

Tabla 20. Tasa de conversión de RPg según el estado del receptor en el tumor primario y de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

(Laboratorio local)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
RPg +	88	35	De + a -	39,8%
RPg -	70	20	De - a +	28,6%
Total	158	55		34,8%

6.3.2.4 Conversión de los RH

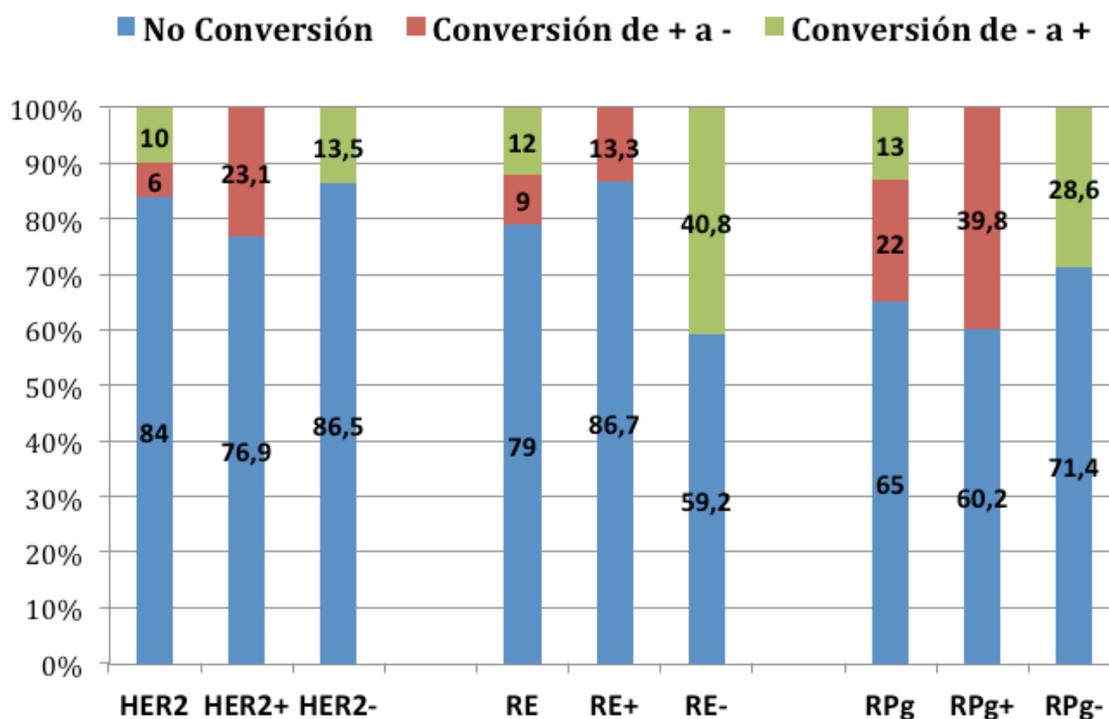
Considerando conjuntamente los receptores hormonales RE y RPg, 24 pacientes cambiaron el estado de sus RH del tumor primario a la metástasis, con una **tasa de conversión del 15%** (IC del 95%: 10,2–22,0). Aunque el número de pacientes que cambiaron el estado de sus RH de positivos a negativos era el mismo que los que cambiaron de negativos a positivos (12 pacientes cada uno), la tasa de conversión cuando los RH son inicialmente negativos es más alta (29%) que cuando los RH son originalmente positivos (10%), como se muestra a continuación:

Tabla 21. Tasa de conversión de los receptores hormonales (RH) según el estado de los RH en el tumor primario y de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales.

(Laboratorio local)	Primario	Cambio en la Metástasis	Tasa de Conversión	
			De + a -	De - a +
RH+ (RE + y/o RPg +)	116	12	De + a -	10,3%
RH - (RE- y RPg-)	42	12	De - a +	28,6%
Total	158	24		15,2%

En la figura 13 se resumen gráficamente los resultados de las tasas de conversión de los tres biomarcadores y el sentido de los cambios, determinados en las respectivas instituciones locales.

Figura 13. Porcentaje de pacientes con cambios en el estado de los receptores HER2, RE y RPg entre el tumor primario y sus metástasis según las evaluaciones de los laboratorios locales.



6.4. Cambios de subtipo tumoral entre el tumor primario y sus metástasis

Para responder a este objetivo se ha utilizado la definición de subtipos de cáncer de mama primario anteriormente descrita en Material y Método ([sección 5.6.1](#)):

1. Subtipo RH-positivo: RE+ y/o RPg+ y HER2-negativo
2. Subtipo HER2-positivo: HER2-positivo, independientemente del estado de los RH
3. Subtipo Triple Negativo: RE-, RPg- y HER2-negativos.

6.4.1 Cambio de subtipo según laboratorio central

Cuando las determinaciones de los receptores se realizaron en el laboratorio central el subtipo tumoral se mantuvo aún más estable entre el tumor primario y sus metástasis, y solo 16 pacientes (tasa de conversión 9,7%) cambiaron el subtipo tumoral respecto al del tumor primario (Tabla 22). Se observaron infrecuentes cambios en un 10% de las pacientes con subtipo RH-positivo al subtipo Triple Negativo (8 pacientes, 7%) y al subtipo HER2-positivo (4 pacientes, 3%). También se observó un 24% de cambios en el subtipo Triple Negativo: a RH-positivo (3 pacientes, 18%) y a HER2-positivo (1 paciente, 6%). No hubo ningún cambio de subtipo en las pacientes con tumor primario HER2-positivo.

Tabla 22. Cambio de subtipo tumoral entre el tumor primario y las metástasis según el laboratorio central.

Laboratorio central (n=165)						
Metástasis						
Tumor Primario	RH-positivo n=108		HER2-positivo n=36		Triple negativo n=21	
	n	%	n	%	n	%
	RH-positivo, n=117	105	90	4	3	8
HER2-positivo, n=31	0	0	31	100	0	0
Triple negativo, n=17	3	18	1	6	13	76

Como se ha comentado en la sección anterior, se ha analizado también el cambio de subtipo tumoral teniendo en cuenta la definición alternativa de subtipos que incluye la subclasificación del subtipo HER2. Con esta clasificación el subtipo cambió en 24

pacientes (tasa de conversión del 14,5%), 8 pacientes más que con la clasificación anterior, ya que aunque todas ellas tenían un subtipo HER2-positivo, en 5 casos se perdió la expresión de los RH y en 3 casos se adquirió dicha expresión (Tabla 23).

Tabla 23. Cambio de subtipo tumoral entre el tumor primario y las metástasis según el laboratorio central y subclasificando el subtipo HER2-positivo.

Laboratorio central (n=165)								
Metástasis								
Tumor Primario	HER2-positivo n=36							
	RH-positivo HER2-negativo n=108		HER2-positivo RH-positivo n=26		HER2-positivo RH-negativo n=10		Triple negativo n=21	
	n	%	n	%	%		n	%
RH-positivo, n=117	105	90	4	3	0	0	8	7
HER2+/RH+, n=24	0	0	19	79	5	21	0	0
HER2+/RH-, n=7	0	0	3	43	4	57	0	0
Triple negativo, n=17	3	18	0	0	1	6	13	76

6.4.2 Cambio de subtipo según laboratorios locales

Se disponía de la información del subtipo inmunohistoquímico del tumor primario de 161 pacientes y del subtipo tumoral de la lesión metastásica de 158 pacientes, disponiéndose de los datos apareados de 139 pacientes.

Aunque en la mayoría de las pacientes el subtipo inmunohistoquímico se mantuvo estable entre el tumor primario y sus metástasis, el subtipo cambió en 36 pacientes (tasa de conversión del 26%), lo que obviamente podía tener claras implicaciones terapéuticas. De todas las pacientes que originalmente tenían un subtipo RH-positivo en el tumor primario, un 16% (12 pacientes) cambiaron a un subtipo HER2-positivo en la metástasis y un 10% (7 pacientes) cambiaron a un subtipo Triple Negativo, como se muestra en la Tabla 24. Por otro lado, un 21% (n=8) de las pacientes con subtipo HER2-positivo y un 22% (n=6) de las pacientes con subtipo Triple Negativo cambiaron a un subtipo RH-positivo en la metástasis. Los cambios entre los subtipos HER2-positivo y Triple Negativo se observaron con muy poca frecuencia.

Tabla 24. Cambio de subtipo tumoral entre el tumor primario y las metástasis según los laboratorios locales.

Laboratorios locales (n=139)						
Metástasis						
Tumor Primario	RH-positivo n=69		HER2-positivo n=43		Triple negativo n=27	
	n	%	n	%	n	%
RH-positivo, n=74	55	74	12	16	7	10
HER2-positivo, n=38	8	21	29	76	1	3
Triple negativo, n=27	6	22	2	7	19	71

Debido al creciente interés y a la importancia que ha cobrado en los últimos años la subclasificación del subtipo HER2-positivo en función de la expresión de receptores hormonales, tanto en el contexto neoadyuvante como en la enfermedad metastásica, se ha procedido también a analizar el cambio de subtipo tumoral teniendo en cuenta esta subclasificación. De esta forma, los subtipos tumorales quedaron definidos como:

1. Subtipo RH-positivo: RE+ y/o RPg+ y HER2-negativo
2. Subtipo HER2-positivo/RH-positivo: HER2-positivo y RH-positivos (RE+ y/o RPg+)
3. Subtipo HER2-positivo/RH-negativo: HER2-positivo y RH-negativos (RE- y RPg-)
4. Subtipo Triple Negativo: RE-, RPg- y HER2-negativos.

Con esta clasificación alternativa el subtipo cambió en 41 pacientes (tasa de conversión del 29,5%), 5 pacientes más que con la clasificación anterior, ya que aunque todas ellas tenían un subtipo HER2-positivo, en 3 casos se perdió la expresión de los RH y en 2 casos se adquirió dicha expresión (Tabla 25). Sin embargo, estos cambios también tienen potenciales implicaciones terapéuticas, especialmente en la primera línea de tratamiento para la enfermedad metastásica HER2-positiva.

Tabla 25. Cambio de subtipo tumoral entre el tumor primario y las metástasis según los laboratorios locales y subclasificando el subtipo HER2-positivo.

Laboratorios locales (n=139)								
Tumor Primario	Metástasis							
	HER2-positivo n=43						Triple negativo n=21	
	RH-positivo HER2-negativo n=69		HER2-positivo RH-positivo n=32		HER2-positivo RH-negativo n=11			
	n	%	n	%	%		n	%
RH-positivo, n=74	55	74	12	16	0	0	7	10
HER2+/RH+, n=27	8	30	16	59	3	11	0	0
HER2+/RH-, n=11	0	0	2	18	8	72	1	9
Triple negativo, n=27	6	22	2	7	0	0	19	76

6.5. Concordancia en la expresión de receptores entre los laboratorios locales y el laboratorio central

Para evaluar la concordancia en los resultados de la expresión de los receptores entre los laboratorios locales y el laboratorio central se ha utilizado el índice kappa de Cohen y se ha interpretado de acuerdo con el método publicado por Landis y Koch.²⁰¹

Hubo un buen grado de concordancia en la determinación de HER2 entre los laboratorios locales y el laboratorio central, tanto en el tumor primario como en la metástasis. También hubo un grado de acuerdo excelente para la expresión del RE en la metástasis (índice kappa [k] = 0,794). Por el contrario, la mayor variabilidad se detectó en la expresión del RPg, tanto en el tumor primario como en la metástasis, con un grado de acuerdo moderado (índice kappa = 0,555).

Tabla 26. Variabilidad en el estado de los receptores entre los laboratorios locales y laboratorio central en el tumor primario y en las lesiones metastásicas.

Laboratorio central				
Laboratorio local	Tumor Primario		Metástasis	
	RE-positivo	RE-negativo	RE-positivo	RE-negativo
RE-positivo	120	2	109	5
RE-negativo	25	29	8	37
Índice Kappa	0.591		0.794	
Valor p	<0.001		<0.001	
	RPg-positivo	RPg-negativo	RPg-positivo	RPg-negativo
	RPg-positivo	88	7	62
RPg-negativo	30	51	25	59
Índice Kappa	0.568		0.555	
Valor p	<0.001		<0.001	
	HER2-positivo	HER2-negativo	HER2-positivo	HER2-negativo
	HER2-positivo	27	16	31
HER2-negativo	4	112	5	100
Índice Kappa	0.651		0.667	
Valor p	<0.001		<0.001	

6.6. Relación entre la conversión de los receptores y la localización de las biopsias

Se ha comparado la tasa de conversión de los receptores -analizados en el laboratorio central- en función de la localización de las metástasis biopsiadas, agrupándolas en metástasis loco-regionales o metástasis a distancia. No se ha encontrado asociación entre la localización de las metástasis y la tasa de conversión de HER2, aunque si se ha encontrado una mayor tasa de conversión para el RE (26% frente a 10%; $p=0,019$) y una tendencia no significativa para el RPg (41% frente a 25%, $p=0,088$) en las recaídas locorregionales (Tabla 27).

Tabla 27. Asociación entre la localización de las lesiones biopsiadas (recaída loco-regional o metástasis a distancia) y la tasa de conversión de los receptores HER2, RE y RPg determinada por el laboratorio central.

Laboratorio central					
		Localización			
		Loco-regional		Metástasis a distancia	
		N	%	N	%
HER2	No conversión	32	97,0	129	97,0
	Conversión	1	3,0	4	3,0
Valor p*		<0,999			
RE	No conversión	25	73,5	121	90,3
	Conversión	9	26,5	13	9,7
Valor p*		0,019			
RPg	No conversión	20	58,8	101	74,8
	Conversión	14	41,2	34	25,2
Valor p*		0,088			

*Estadístico Exacto de Fisher (significación exacta)

Cuando estas mismas comparaciones se han realizado teniendo en cuenta las determinaciones de los receptores realizadas por los laboratorios locales (Tabla 28), se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de conversión de HER2 de las recaídas locorregionales respecto a las metástasis a distancia (4% vs. 19%, $p=0,047$). En cambio, no se han encontrado diferencias en la tasa de conversión del RE ni del RPg en función de la localización de las biopsias.

Tabla 28. Asociación entre la localización de las lesiones biopsiadas (recaída loco-regional o metástasis a distancia) y la tasa de conversión de los receptores HER2, RE y RPg determinada por los laboratorios locales.

Laboratorios locales					
		Localización			
		Loco-regional		Metástasis a distancia	
		N	%	N	%
HER2	No conversión	27	96,4	93	80,9
	Conversión	1	3,6	22	19,1
Valor p*		0,047			
RE	No conversión	22	73,3	105	79,5
	Conversión	8	26,7	27	20,5
Valor p*		0,466			
RPg	No conversión	23	76,6	80	62,5
	Conversión	7	23,3	48	37,5
Valor p*		0,201			

6.7. Relación entre la conversión de los receptores y el tratamiento previo

Se ha analizado la relación entre la tasa de conversión de los receptores determinada por el laboratorio central y el tratamiento recibido previamente utilizando el test exacto de Fisher. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de conversión de HER2, de RE o de RPg y el tratamiento neoadyuvante y/o adyuvante previo con radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia o terapias biológicas (tablas 29, 30 y 31, respectivamente).

También se ha analizado la relación entre la tasa de conversión de los receptores determinada por los laboratorios locales y el tratamiento recibido previamente. Al igual que con las evaluaciones centralizadas, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de conversión de HER2 y el tratamiento neoadyuvante y/o adyuvante previo con radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia o terapias biológicas (Tabla 32).

Como se muestra en la Tabla 33, sí se ha encontrado una mayor probabilidad de conversión del RE tras recibir tratamiento neoadyuvante con trastuzumab (11,4% vs. 1,6%, $p=0,020$), aunque dado el pequeño número de pacientes tratadas, el hecho de que no se haya ajustado el valor p por contrastes múltiples y de que este mismo efecto no se vislumbre en el RPg resta valor a este hallazgo que debe ser interpretado con cautela.

En el caso del RPg, únicamente se ha encontrado una mayor probabilidad de conversión al recibir hormonoterapia adyuvante (75% vs. 51%, $p=0,004$), (Tabla 34). No obstante, este efecto no se observa en el análisis centralizado ni tampoco en el caso del RE.

Tabla 29. Relación entre la tasa de conversión de HER2 (evaluada por laboratorio central) y los tratamientos previamente recibidos.

Laboratorio central					
HER2		No conversión HER2		Conversión HER2	
		N	%	N	%
Radioterapia neoadyuvante	No	160	99,4	5	100,0
	Sí	1	0,6	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Quimioterapia neoadyuvante	No	117	72,7	3	60,0
	Sí	44	27,3	2	40,0
p-valor*		0,618			
Hormonoterapia neoadyuvante	No	156	96,9	5	100,0
	Sí	5	3,1	0	0,0
p-valor*		> 0,999			
Terapia biológica neoadyuvante	No	155	96,3	5	100,0
	Sí	6	3,7	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Radioterapia adyuvante	No	74	46,0	1	20,0
	Sí	87	54,0	4	80,0
p-valor*		0,379			
Quimioterapia adyuvante	No	67	41,6	2	40,0
	Sí	94	58,4	3	60,0
p-valor*		>0,999			
Hormonoterapia adyuvante	No	69	42,9	1	20,0
	Sí	92	57,1	4	80,0
p-valor*		0,398			
Terapia biológica adyuvante	No	150	93,2	5	100,0
	Sí	11	6,8	0	0,0
p-valor*		> 0,999			

Tabla 30. Relación entre la tasa de conversión del RE (evaluada por laboratorio central) y los tratamientos previamente recibidos.

Laboratorio central					
RE		No conversión RE		Conversión RE	
		N	%	N	%
Radioterapia neoadyuvante	No	144	98,6	22	100,0
	Sí	2	1,4	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Quimioterapia neoadyuvante	No	107	73,3	13	59,1
	Sí	39	26,7	9	40,9
p-valor*		0,206			
Hormonoterapia neoadyuvante	No	141	96,6	22	100,0
	Sí	5	3,4	0	0,0
p-valor*		> 0,999			
Terapia biológica neoadyuvante	No	140	95,9	22	100,0
	Sí	6	4,1	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Radioterapia adyuvante	No	66	45,2	10	45,5
	Sí	80	54,8	12	54,5
p-valor*		> 0,999			
Quimioterapia adyuvante	No	62	42,5	7	31,8
	Sí	84	57,5	15	68,2
p-valor*		0,486			
Hormonoterapia adyuvante	No	62	42,5	8	36,4
	Sí	84	57,5	14	63,6
p-valor*		0,649			
Terapia biológica adyuvante	No	138	94,5	19	86,4
	Sí	8	5,5	3	13,6
p-valor*		0,160			

Tabla 31. Relación entre la tasa de conversión del RPg (evaluado por laboratorio central) y los tratamientos previamente recibidos.

Laboratorio central					
RPg		No conversión RPg		Conversión RPg	
		N	%	N	%
Radioterapia neoadyuvante	No	119	98,3	48	100,0
	Sí	2	1,7	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Quimioterapia neoadyuvante	No	86	71,1	35	72,9
	Sí	35	28,9	13	27,1
p-valor*		0,852			
Hormonoterapia neoadyuvante	No	118	97,5	46	95,8
	Sí	3	2,5	2	4,2
p-valor*		0,623			
Terapia biológica neoadyuvante	No	116	95,9	47	97,9
	Sí	5	4,1	1	2,1
p-valor*		0,676			
Radioterapia adyuvante	No	55	45,5	22	45,8
	Sí	66	54,5	26	54,2
p-valor*		> 0,999			
Quimioterapia adyuvante	No	49	40,5	21	43,8
	Sí	72	59,5	27	56,3
p-valor*		0,731			
Hormonoterapia adyuvante	No	54	44,6	17	35,4
	Sí	67	55,4	31	64,6
p-valor*		0,303			
Terapia biológica adyuvante	No	113	93,4	45	93,8
	Sí	8	6,6	3	6,3
p-valor*		> 0,999			

Tabla 32. Relación entre la tasa de conversión de HER2 (evaluada por los laboratorios locales) y los tratamientos previamente recibidos.

Laboratorios locales					
HER2		No conversión HER2		Conversión HER2	
		N	%	N	%
Radioterapia neoadyuvante	No	119	99,2	23	100,0
	Sí	1	0,8	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Quimioterapia neoadyuvante	No	85	70,8	15	65,2
	Sí	35	29,2	8	34,8
p-valor*		0,624			
Hormonoterapia neoadyuvante	No	116	96,7	22	95,7
	Sí	4	3,3	1	4,3
p-valor*		0,590			
Terapia biológica neoadyuvante	No	115	95,8	23	100,0
	Sí	5	4,2	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Radioterapia adyuvante	No	50	41,7	12	52,2
	Sí	70	58,3	11	47,8
p-valor*		0,368			
Quimioterapia adyuvante	No	49	40,8	8	34,8
	Sí	71	59,2	15	65,2
p-valor*		0,648			
Hormonoterapia adyuvante	No	53	44,2	9	39,1
	Sí	67	55,8	14	60,9
p-valor*		0,819			
Terapia biológica adyuvante	No	111	92,5	23	100,0
	Sí	9	7,5	0	0,0
p-valor*		0,355			

Tabla 33. Relación entre la tasa de conversión del RE (evaluada por los laboratorios locales) y los tratamientos previamente recibidos.

Laboratorios locales					
RE		No conversión RE		Conversión RE	
		N	%	N	%
Radioterapia neoadyuvante	No	126	99,2	34	97,1
	Sí	1	0,8	1	2,9
p-valor*		0,386			
Quimioterapia neoadyuvante	No	93	73,2	22	62,9
	Sí	34	26,8	13	37,1
p-valor*		0,293			
Hormonoterapia neoadyuvante	No	123	96,9	34	97,1
	Sí	4	3,1	1	2,9
p-valor*		> 0,999			
Terapia biológica neoadyuvante	No	125	98,4%	31	88,6%
	Sí	2	1,6%	4	11,4%
p-valor*		0,020			
Radioterapia adyuvante	No	52	40,9	17	48,6
	Sí	75	59,1	18	51,4
p-valor*		0,445			
Quimioterapia adyuvante	No	51	40,2	11	31,4
	Sí	76	59,8	24	68,6
p-valor*		0,433			
Hormonoterapia adyuvante	No	49	38,6	18	51,4
	Sí	78	61,4	17	48,6
p-valor*		0,181			
Terapia biológica adyuvante	No	120	94,5	33	94,3
	Sí	7	5,5	2	5,7
p-valor*		> 0,999			

Tabla 34. Relación entre la tasa de conversión del RPg (evaluada por los laboratorios locales) y los tratamientos previamente recibidos.

Laboratorios locales					
RPg		No conversión RPg		Conversión RPg	
		N	%	N	%
Radioterapia neoadyuvante	No	102	99,0	55	100,0
	Sí	1	1,0	0	0,0
p-valor*		>0,999			
Quimioterapia neoadyuvante	No	73	70,9	40	72,7
	Sí	30	29,1	15	27,3
p-valor*		0,855			
Hormonoterapia neoadyuvante	No	99	96,1	54	98,2
	Sí	4	3,9	1	1,8
p-valor*		0,659			
Terapia biológica neoadyuvante	No	99	96,1	54	98,2
	Sí	4	3,9	1	1,8
p-valor*		0,659			
Radioterapia adyuvante	No	48	46,6	20	36,4
	Sí	55	53,4	35	63,6
p-valor*		0,241			
Quimioterapia adyuvante	No	40	38,8	19	34,5
	Sí	63	61,2	36	65,5
p-valor*		0,610			
Hormonoterapia adyuvante	No	51	49,5	14	25,5
	Sí	52	50,5	41	74,5
p-valor*		0,004			
Terapia biológica adyuvante	No	95	92,2	54	98,2
	Sí	8	7,8	1	1,8
p-valor*		0,163			

6.8. Influencia del resultado de la biopsia en el plan terapéutico posterior

Tras la realización de la biopsia, en 8 pacientes (un 4% de la población de pacientes incluidas) no se confirmó la existencia de una lesión metastásica: en 3 pacientes la biopsia mostraba tejido normal, en 3 pacientes la biopsia mostraba enfermedad benigna y en 2 pacientes mostraba un 2º tumor maligno. Estos resultados obviamente tuvieron una clara influencia en el pronóstico y en la estrategia terapéutica posterior.

Centrándonos en la población evaluable, se ha analizado si tras la realización de la biopsia, el cambio de receptores y de subtipo tumoral influyó en la estrategia terapéutica. Para ello se ha tenido en cuenta la determinación de receptores y clasificación de subtipos realizada por los laboratorios locales, ya que los oncólogos responsables tomaron sus decisiones terapéuticas basándose en dichos resultados.

En la visita de registro el investigador declaraba el plan de tratamiento previsto para la paciente y en las visitas de seguimiento posteriores se recogía el tratamiento finalmente decidido y prescrito por el investigador. Aunque los investigadores declararon que “la variación en el estado de los receptores en la metástasis implicaba un plan de tratamiento diferente” en 21 casos, la intención de tratamiento se modificó realmente en 15 de las 184 pacientes evaluables, lo que representa un 8% de los casos.

La adaptación terapéutica consistió en una anulación de la hormonoterapia prevista sustituyéndose por quimioterapia en 6 casos, en la adición de una hormonoterapia no prevista inicialmente en 7 casos (en 3 casos la hormonoterapia sustituyó a la quimioterapia prevista), en la adición de una terapia biológica no prevista en 6 casos o en la anulación de una terapia biológica en 2 casos.

6.8.1 Conversión de receptores y cambio de tratamiento

A continuación se muestra el análisis de la relación entre la tasa de conversión de cada uno de los receptores con el cambio de tratamiento.

De las 23 pacientes en las que hubo conversión de HER2 (y de las cuales 14 cambiaron a un estado HER2-positivo), solo en un 13% se modificó el plan de tratamiento inicialmente previsto, un porcentaje inferior al esperable y similar al de las pacientes en las que no hubo conversión.

Por el contrario, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de los receptores hormonales, modificándose el plan de tratamiento en un 37% de

las pacientes que convirtieron el RE (frente a un 5% de las que no convirtieron, $p < 0,001$) y en un 24% de las pacientes que convirtieron el RPg (frente a un 7% de las que no convirtieron, $p < 0,001$). Si consideramos los receptores de forma conjunta, la conversión del estado de los RH se asoció a un cambio de tratamiento en el 50% de los casos (frente al 6% de las que no convirtieron, $p < 0,001$).

Tabla 35. Relación entre la tasa de conversión de HER2, RE, RPg y RH (evaluada por los laboratorios locales) y el cambio de tratamiento tras la realización de la biopsia.

Laboratorios locales					
HER2		No conversión HER2		Conversión HER2	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	12	10,0	3	13,0
	No	108	90,0	20	87,0
Valor p*		0,710			
RE		No conversión RE		Conversión RE	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	7	5,5	13	37,1
	No	120	94,5	22	62,9
Valor p*		<0,001			
RPg		No conversión RPg		Conversión RPg	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	7	6,8	13	23,6
	No	96	93,2	42	76,4
Valor p*		0,005			
Receptores Hormonales		No conversión RRHH		Conversión RRHH	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	8	6,0	12	50,0
	No	126	94,0	12	50,0
Total		134	100,0	24	100,0
Valor p*		<0,001			

*Estadístico Exacto de Fisher (significación exacta)

Aunque no se remitía sistemáticamente el resultado de la expresión de los receptores una vez analizados en el laboratorio central, sí podían consultarse estos resultados en el e-CRD. Teniendo en cuenta este hecho pretendimos analizar si la conversión de los receptores por cualquiera de las dos valoraciones (local y central) respecto al valor de origen pudiera asociarse a la alteración del manejo clínico. Los resultados de este análisis fueron similares al anteriormente expuesto, demostrándose

que la conversión de los receptores hormonales influía en el plan terapéutico posterior, pero no así la conversión de HER2 (Tabla 36).

Tabla 36. Relación entre la tasa de conversión de HER2, RE y RPg (evaluada tanto en los laboratorios locales como en el laboratorio central) y el cambio de tratamiento tras la realización de la biopsia.

Laboratorios locales + Laboratorio central					
HER2		No conversión HER2		Conversión HER2	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	10	9,0	4	15,4
	No	101	91,0	22	84,6
Valor p*		0,304			
RE		No conversión RE		Conversión RE	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	7	6,3	13	27,7
	No	105	93,8	34	72,3
Valor p*		<0,001			
RPg		No conversión RPg		Conversión RPg	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	4	5,3	15	18,5
	No	72	94,7	66	81,5
Valor p*		0,014			

6.8.2 Influencia del cambio de subtipo tumoral en el plan terapéutico

Para responder a este objetivo se ha tenido en cuenta la determinación de receptores y clasificación de subtipos realizada por los laboratorios locales, ya que los oncólogos responsables tomaron sus decisiones terapéuticas basándose en dichos resultados.

El plan de tratamiento previsto fue modificado en 15 (8%) de las 184 pacientes evaluables después de la biopsia. De las 36 pacientes cuyo subtipo tumoral cambió en la lesión metastásica, en 11 de ellas (31%) se decidió un cambio de tratamiento, mientras que de las 103 pacientes que mantuvieron el mismo subtipo tumoral solo se

modificó el tratamiento previsto en 4 pacientes (4%). Estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Tabla 37. Relación entre el cambio de subtipo clínico (de acuerdo a las determinaciones de los laboratorios locales) y el cambio de tratamiento tras la realización de la biopsia.

Laboratorios locales					
Subtipo molecular		Conversión Subtipo		No conversión Subtipo	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	11	30,6	4	3,9
	No	25	69,4	99	96,1
Total		36	100,0	103	100,0
Valor p		<0,001			

Cuando se ha empleado una clasificación alternativa de los subtipos tumorales subdividiendo el subtipo HER2-positivo en otros dos subtipos (HER2-positivo/RH-positivo y HER2-positivo/RH-negativo), se han obtenido resultados prácticamente idénticos respecto a la influencia del cambio de subtipo en los cambios de tratamiento.

Como se ha comentado anteriormente, para este objetivo estaba planificado tener en cuenta la clasificación de subtipos realizada por los laboratorios locales, ya que los oncólogos basaban sus decisiones terapéuticas en dicha clasificación. Sin embargo, decidimos también realizar el mismo análisis considerando la clasificación de subtipos realizada por el laboratorio central. A diferencia del resultado obtenido con los laboratorios locales, no se encontró ninguna asociación entre el cambio de subtipo clínico evaluado por el laboratorio central y la modificación del plan terapéutico.

Tabla 38. Relación entre el cambio de subtipo clínico (de acuerdo a las determinaciones del laboratorio central) y el cambio de tratamiento tras la realización de la biopsia.

Laboratorio central					
Subtipo molecular		Conversión Subtipo		No conversión Subtipo	
		N	%	N	%
Implica cambio de tratamiento	Sí	2	12,5	16	10,7
	No	14	87,5	133	89,3
Total		16	100,0	149	100,0
Valor p		0,688			

6.9. Influencia de la conversión de los receptores en la respuesta al tratamiento y el pronóstico

Entre los objetivos secundarios del estudio se pretendía analizar si la conversión de los receptores modificaba la respuesta a los subsiguientes tratamientos o impactaba en el pronóstico de la enfermedad metastásica.

Tras la realización de la biopsia y hasta el cierre de la base de datos (mediana de seguimiento de 16 meses), 179 pacientes de la población evaluable recibieron al menos 1 línea de tratamiento sistémico antitumoral, mientras que 5 pacientes (2,7%) no llegaron a recibir ningún tipo de tratamiento. De esas 179 pacientes, a 70 (39%) se les administró una única línea de tratamiento, 65 (36%) recibieron 2 líneas de tratamiento, 36 pacientes (20%) 3 líneas, 6 pacientes (3,5%) 4 líneas y 2 pacientes (1%) 5 líneas de tratamiento.

6.9.1 Influencia de la conversión de los receptores en la tasa de respuesta a los subsiguientes tratamientos

Se ha recogido la mejor respuesta obtenida y la tasa de respuestas objetivas para la primera línea de tratamiento administrada tras la biopsia. De las 179 pacientes que recibieron al menos 1 línea de tratamiento sistémico, en 12 pacientes no se registró la respuesta o bien la enfermedad se consideró no medible ni evaluable. La tasa de respuesta objetiva fue del 25%, como se detalla en la Tabla 39:

Tabla 39. Tasa de respuestas objetivas a la primera línea de tratamiento tras la realización de la biopsia.

Primer tratamiento pautado tras biopsia		N	% Total	% Válido
Mejor respuesta	Respuesta objetiva	41	22,9	24,6
	• Respuesta completa	18	10,1	10,8
	• Respuesta parcial	23	12,8	13,8
	Enfermedad estable	59	33,0	35,3
	Progresión de enfermedad	67	37,4	40,1
	Total	167	93,3	100,0
No medible/evaluable o no recogido		12	6,7	
Total		179	100,0	

Se ha comparado la tasa de respuesta objetiva de las pacientes que cambiaron el estado de los receptores HER2, RE y RPg respecto a las que no lo cambiaron, tanto evaluados por el laboratorio central como por los laboratorios locales. Aunque cuando los cambios fueron evaluados por el laboratorio central no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de respuestas objetivas (Tabla 40), las pacientes con conversión del RE evaluadas de acuerdo a los laboratorios locales tenían una tasa de respuesta objetiva significativamente superior a la de las pacientes que no cambiaron el estado del RE (47% vs. 19%, $p=0,002$) (Tabla 41). En cambio, cuando el cambio del RE se evaluó de forma centralizada la tasa de respuestas fue numéricamente inferior (diferencias no significativas) y tampoco se observaron diferencias en el resto de los receptores.

Tabla 40. Relación entre la tasa de conversión de HER2, RE y RPg (evaluada en el laboratorio central) y la tasa de respuesta a la primera línea de tratamiento sistémico tras la inclusión en el estudio.

Laboratorio central					
HER2		No conversión HER2		Conversión HER2	
		N	%	N	%
Respuesta a 1ª línea	Respuesta objetiva	33	22,6	2	40,0
	No respuesta	113	77,4	3	60,0
Valor p*		0,328			
RE		No conversión RE		Conversión RE	
		N	%	N	%
Respuesta a 1ª línea	Respuesta objetiva	34	25,6	3	15,0
	No respuesta	99	74,4	17	85,0
Valor p*		0,407			
RPg		No conversión RPg		Conversión RPg	
		N	%	N	%
Respuesta a 1ª línea	Respuesta objetiva	22	20,2	15	33,3
	No respuesta	87	79,8	30	66,7
Valor p*		0,098			

* Test exacto de Fisher

Tabla 41. Relación entre la tasa de conversión de HER2, RE y RPg (evaluada en los laboratorios locales) y la tasa de respuesta a la primera línea de tratamiento sistémico tras la inclusión en el estudio.

Laboratorios locales					
HER2		No conversión HER2		Conversión HER2	
		N	%	N	%
Respuesta a 1ª línea	Respuesta objetiva	26	24,1	3	13,6
	No respuesta	82	75,9	19	86,4
Valor p*		0,402			
RE		No conversión RE		Conversión RE	
		N	%	N	%
Respuesta a 1ª línea	Respuesta objetiva	22	19,1	15	46,9
	No respuesta	93	80,9	17	53,1
Valor p*		0,002			
RPg		No conversión RPg		Conversión RPg	
		N	%	N	%
Respuesta a 1ª línea	Respuesta objetiva	28	29,8	9	18,0
	No respuesta	66	70,2	41	82,0
Valor p*		0,161			

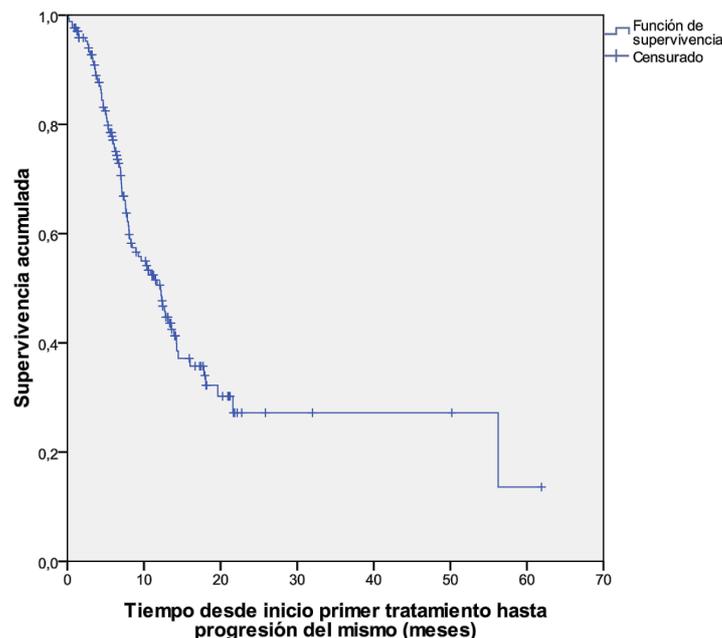
6.9.2 Influencia de la conversión de los receptores en el tiempo hasta la progresión a los subsiguientes tratamientos

Se ha definido el tiempo hasta la progresión a la primera línea de tratamiento como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad, considerando la primera línea como el primer tratamiento recibido tras la inclusión en el estudio. Esta primera línea de tratamiento podía haberse iniciado incluso antes de la inclusión en el estudio. En el caso de que una paciente no hubiese progresado pero por cualquier otra circunstancia se hubiera iniciado un nuevo tratamiento, se censuraba a la paciente en el momento de iniciar el nuevo tratamiento.

Tras la realización de la biopsia, 179 pacientes de la población evaluable recibieron una primera línea de tratamiento sistémico antineoplásico, mientras que 5 pacientes (2,7%) no llegaron a recibir ningún tipo de tratamiento. De las 179 pacientes que recibieron una primera línea de tratamiento, no se dispone de información sobre el

tiempo hasta la progresión de 6 pacientes evaluables, se registraron 88 eventos de progresión de enfermedad y se censuraron 85 pacientes. La mediana del tiempo hasta la progresión a la primera línea de tratamiento era de 12,2 meses (IC al 95% 9,465 – 14,878) (figura 14), a la segunda línea de tratamiento de 7,8 meses (IC al 95% 6,746 – 8,846) y a la tercera línea de 4,4 meses (IC al 95% 2,829 – 6,053).

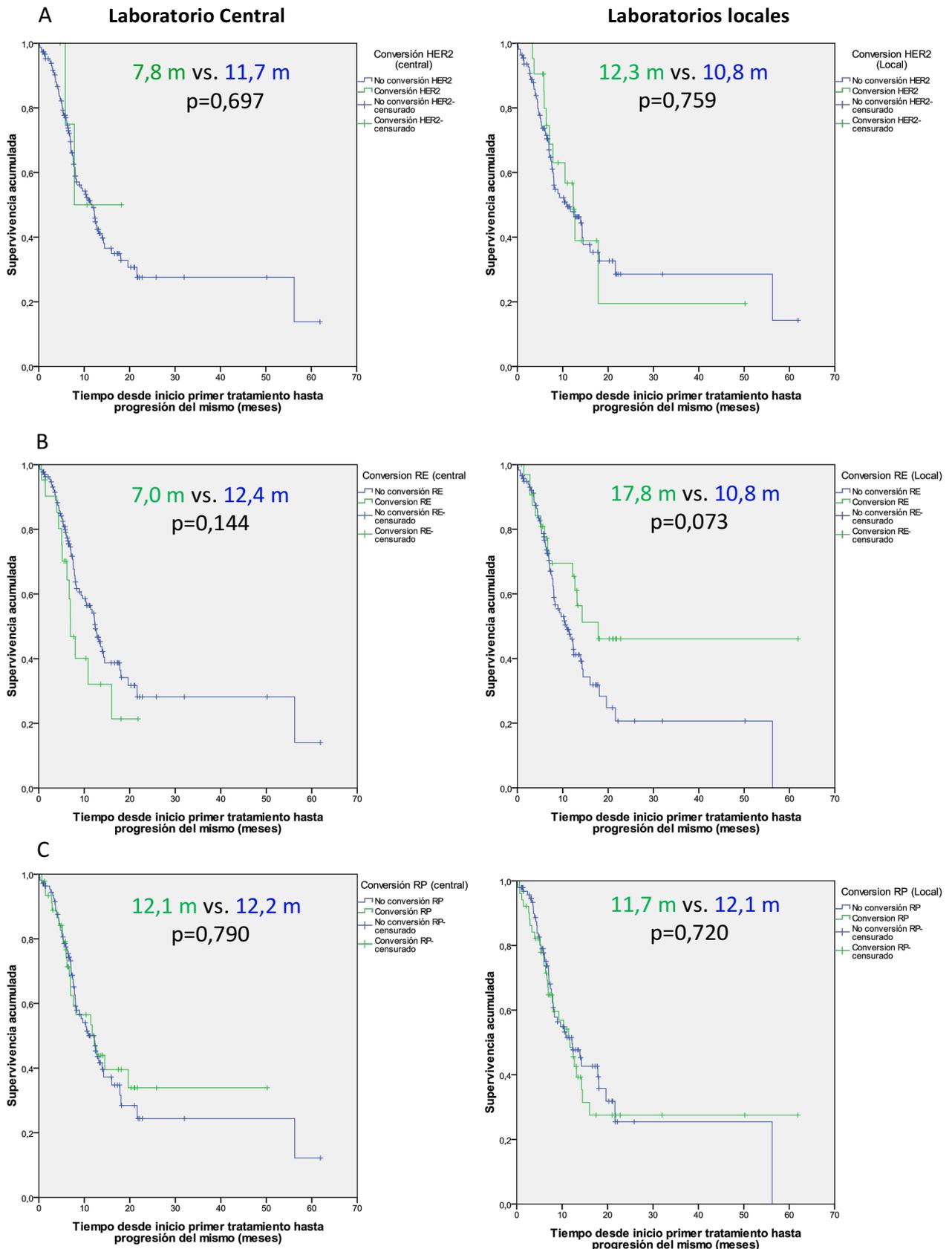
Figura 14. Curva de Kaplan-Meier de tiempo hasta la progresión (TTP) a la primera línea de tratamiento.



Analizamos el tiempo hasta la progresión a la primera línea de tratamiento (TTP-1) en función de la conversión o no de los distintos receptores (HER2, RE y RPg), evaluada tanto por el laboratorio central como por los laboratorios locales, como se muestra en la figura 15. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el TTP-1 entre las pacientes que convirtieron alguno de los receptores respecto a las que no convirtieron, ni en las evaluaciones realizadas por el laboratorio central ni en las realizadas por los laboratorios locales. Aunque en las pacientes que cambiaron el estado del RE en la metástasis según las determinaciones del laboratorio central se observaba una tendencia a un menor TTP-1 comparado con las que no convirtieron (7,0 vs. 12,4 meses; $p=0,144$), cuando se analizaba de acuerdo a las evaluaciones locales la tendencia era justo la contraria (17,8 vs. 10,8 meses; $p=0,073$). En ningún caso estas tendencias alcanzaban significación estadística.

Tampoco se han encontrado diferencias en el tiempo hasta la progresión a la segunda (TTP-2) o a la tercera línea de tratamiento (TTP-3) entre las pacientes que convirtieron alguno de los receptores respecto a las que no convirtieron, ni en las evaluaciones realizadas por el laboratorio central ni en las realizadas por los laboratorios locales.

Figura 15. Curvas de TTP al primer tratamiento de las pacientes con (en verde) y sin conversión (en azul) de los receptores (A) HER2, (B) RE y (C) RPg, según las determinaciones del laboratorio central (columna de la izquierda) y de los laboratorios locales (columna de la derecha).

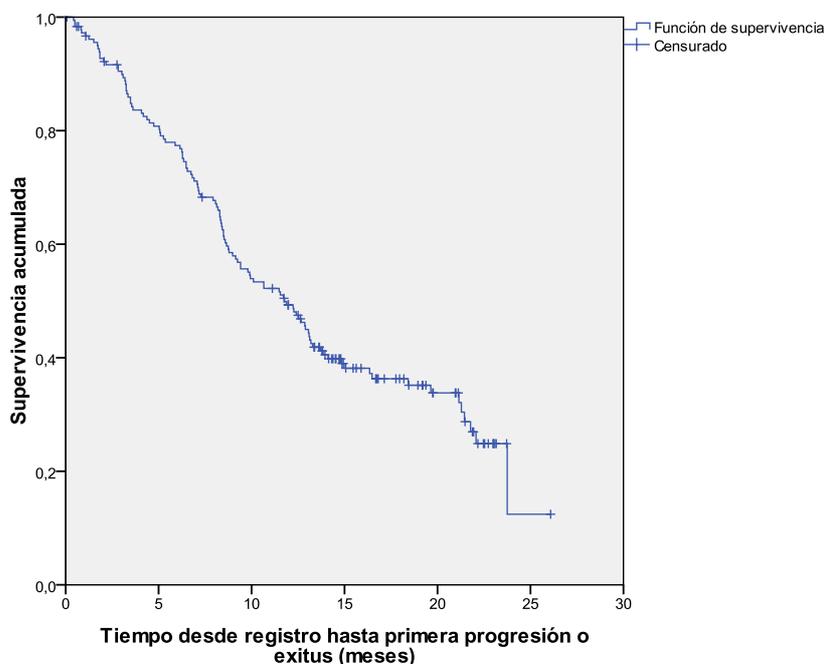


6.9.3 Comparación de la SLP al primer tratamiento de las pacientes con/sin conversión de receptores

Se ha definido la supervivencia libre de progresión (SLP) como el tiempo transcurrido desde la fecha de la visita de registro hasta la primera documentación de progresión de la enfermedad o muerte por cualquiera causa o hasta la última fecha disponible en el caso de que la paciente no haya progresado ni fallecido.

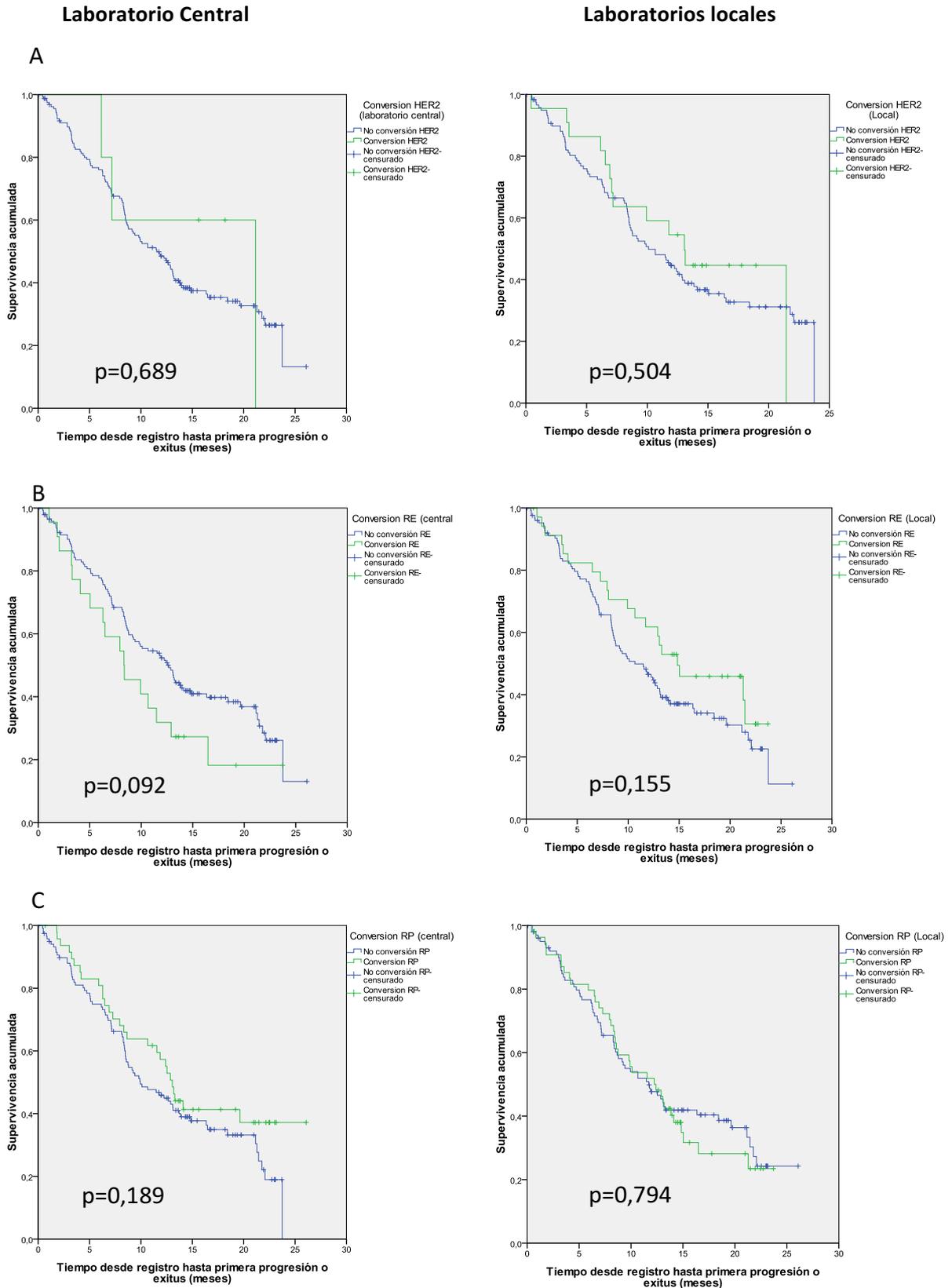
Tras una mediana de seguimiento de 16 meses, se han producido 116 eventos de SLP (63,0%) en las 184 pacientes evaluables. La mediana de SLP es de 11,8 meses (IC al 95%: 9,51 - 14,04). En la figura 16 se muestra la curva de Kaplan-Meier de SLP.

Figura 16. Curva de supervivencia libre de progresión (SLP) de la población evaluable.



Se ha analizado y comparado la SLP en el grupo de pacientes con cambio en el estado de alguno de los receptores HER2, RE y RPg respecto a las pacientes que los mantuvieron estables, tanto según las determinaciones de los laboratorios locales como las del laboratorio central, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones (figura 17).

Figura 17. Curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) de las pacientes con conversión (en verde) y sin conversión (en azul) de los receptores (A) HER2, (B) RE y (C) RPg, según las determinaciones del laboratorio central (columna de la izquierda) y de los laboratorios locales (columna de la derecha). El valor p corresponde a las comparaciones por test de log-rank.



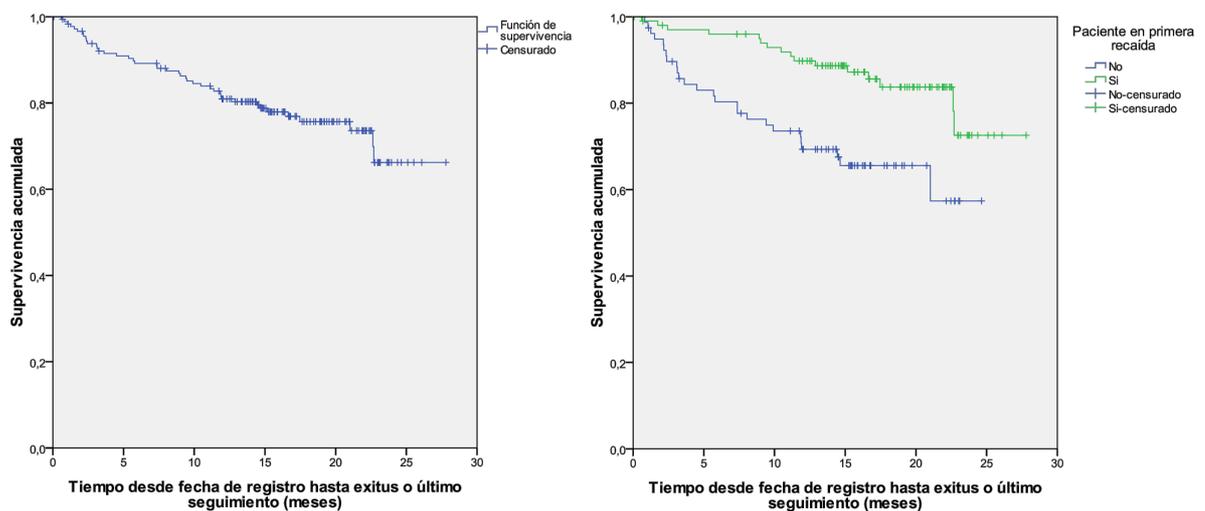
6.9.4 Supervivencia global

Se ha definido la supervivencia global (SG) como el tiempo transcurrido desde la inclusión en el estudio hasta la muerte por cualquier causa o hasta la última fecha disponible en caso de que la paciente no hubiera fallecido.

Tras una mediana de seguimiento de 16 meses se habían producido 42 eventos de SG (23,2%) en 181 de las 184 pacientes evaluables (no se disponía de la fecha de fallecimiento de 3 pacientes). En el momento del cierre de la base de datos (30 de julio de 2012) no se había alcanzado la mediana de SG y la estimación de supervivencia a dos años era de 66,2% (IC al 95% 54,2 – 78,2). En la figura 18 se muestra la curva de Kaplan-Meier de SG y la curva de SG respecto del momento de inclusión en el estudio. Como era esperable, la SG de las pacientes incluidas en su primera recaída era superior a la de las incluidas tras una segunda o sucesivas progresiones de enfermedad (supervivencia a 1 año de 90,5% vs. 69,5%, $p=0,001$).

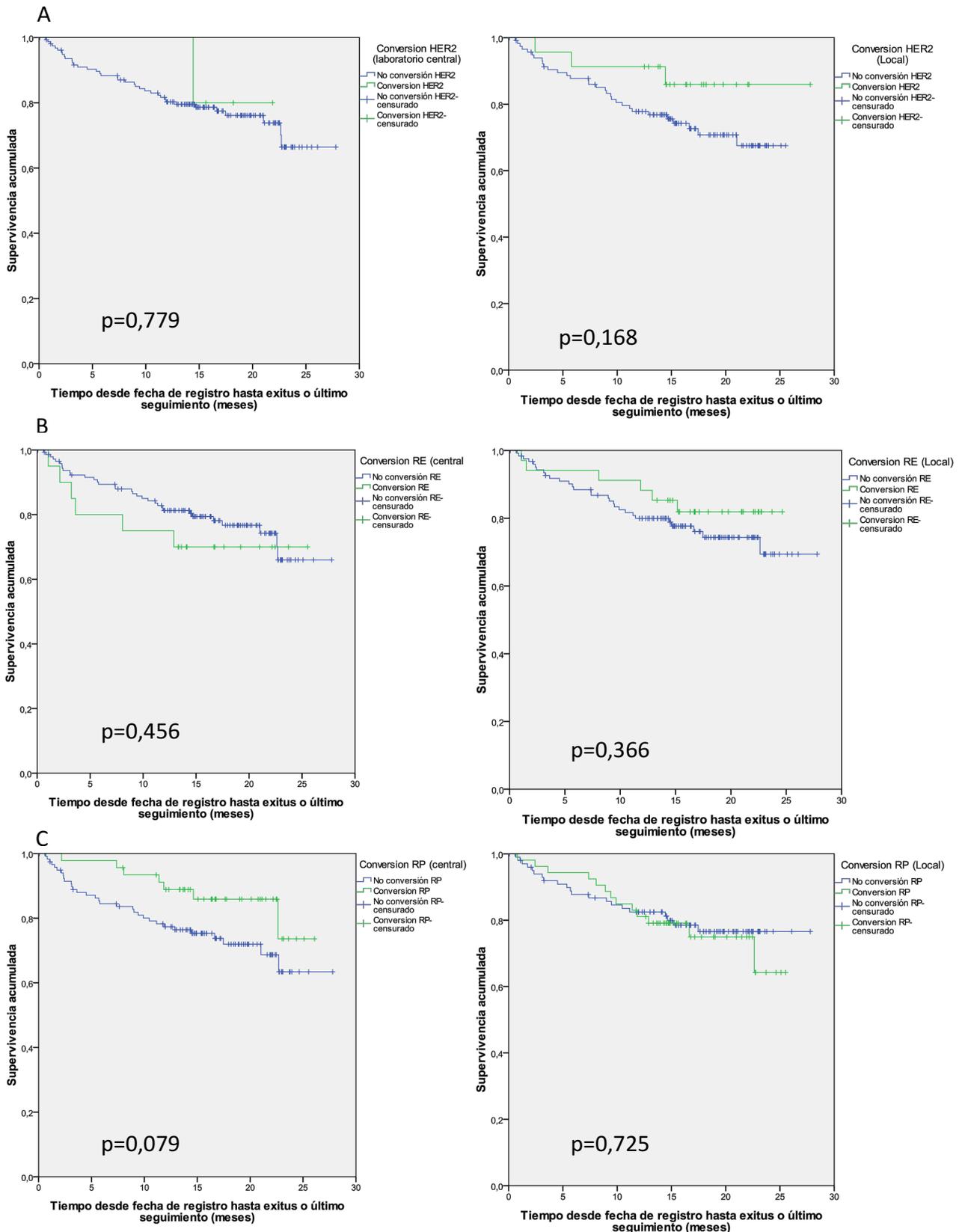
Se ha calculado también la supervivencia global desde la fecha de diagnóstico de la primera recaída hasta la muerte por cualquier causa o pérdida de seguimiento. La mediana de SG desde la primera recaída fue de 31,6 meses (rango 0,0 – 227 meses).

Figura 18. A la izquierda, curva de Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) desde la inclusión en el estudio de la población evaluable. A la derecha, curva de supervivencia global respecto del momento de inclusión en el estudio: primera recaída vs. segunda o sucesivas progresiones de enfermedad.



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la SG de las pacientes que convirtieron el estado de HER2, RE o RPg y las que no convirtieron, ni según las determinaciones de los laboratorios locales ni según las del laboratorio central (figura 19).

Figura 19. Curvas de supervivencia global (SG) de las pacientes con conversión (en verde) y sin conversión (en azul) de los receptores (A) HER2, (B) RE y (C) RPg, según las determinaciones del laboratorio central (columna de la izquierda) y de los laboratorios locales (columna de la derecha). El valor p corresponde a las comparaciones por test de log-rank.



DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio era determinar prospectivamente y de forma centralizada la tasa de conversión (cambio) del estado de HER2, RE y RPg entre el cáncer de mama primario y sus respectivas metástasis. Aunque las discordancias en el estado de los receptores hormonales entre el cáncer de mama primario y sus correspondientes metástasis ya se advirtieron hace unos 30 años,^{203,204} estos datos se consideraron poco fiables y hasta hace solo una década se aceptaba que la expresión de receptores era estable en la evolución de un mismo tumor.²⁰⁵ Por ello las guías clínicas no consideraban necesario repetirlos en el tejido metastásico, a menudo difícil de obtener. Asimismo se había considerado que la maquinaria molecular básica de un tumor individual no se modificaba en el curso de la enfermedad y los estudios con perfiles de expresión genómica demostraban que las muestras emparejadas de tumores primarios de mama y sus correspondientes metástasis de la misma paciente seguían siendo más similares entre ellas que con cualquier tumor de otra paciente.^{133,134} Por ello, las decisiones sobre el tratamiento sistémico del cáncer de mama avanzado se han basado tradicionalmente en los biomarcadores del tumor primario, asumiendo su estabilidad y a pesar de que las recaídas se hubieran producido a veces muchos años después del mismo.

Sin embargo, en el momento en que surgió la idea de realizar este estudio se disponía de evidencia fundamentalmente de estudios retrospectivos que sugerían la existencia de discordancias de HER2, RE y RPg entre el tumor primario y las metástasis y que éstas podían ser clínicamente importantes, de hasta un 33% en la determinación de HER2¹³⁵ con un promedio de alrededor del 10%,^{67,135-138} y de hasta un 40% en la determinación de los receptores hormonales^{138,206} con un promedio de aproximadamente un 20%.¹³⁷ La mayoría de estos estudios eran retrospectivos y tenían importantes limitaciones, como sesgos de selección o el empleo de diferentes técnicas y puntos de corte para evaluar los receptores en el tumor primario y en el tejido metastásico. Estos estudios no podían evaluar las tasas de éxito o viabilidad de las biopsias de lesiones metastásicas ni tampoco podían proporcionar información precisa del impacto de las discordancias de los receptores en el pronóstico o en el manejo clínico de la enfermedad metastásica.

Tres estudios prospectivos publicados han comunicado considerables discordancias de HER2 (3-10%), RE (10-16%) y RPg (24-40%) entre tumor primario y recaída.^{168,207,208} Un análisis combinado de dos de estos estudios prospectivos que incluía 289 pacientes mostraba unas tasas de discordancia para HER2, RE y RPg entre el tumor primario y las metástasis de un 6%, 13% y 31%, respectivamente.¹³⁹ Parecía por tanto que la existencia de las discordancias podía ser un fenómeno real, aunque se

desconocía la magnitud exacta, el sentido predominante (pérdida o ganancia de los receptores) y la causa de las mismas.

Nuestro estudio pretendía comprobar este fenómeno, cuantificarlo y profundizar en sus causas y sus implicaciones clínicas. Para ello diseñamos un estudio observacional y prospectivo, en el que era obligatorio incluir a la paciente en el estudio antes de la realización de la biopsia, evitando así posibles sesgos en la selección de las pacientes. Y puesto que el fenómeno de las conversiones podía afectar de manera diferente a unos subtipos de cáncer de mama que a otros, nuestro propósito era comparar la tasa de conversiones de los distintos subtipos de cáncer de mama.

Por otro lado, para minimizar la variabilidad intrínseca de las técnicas inmunohistoquímicas que podían ser la causa de la mayor parte de estas discordancias, propusimos que, además de recoger los informes anatomopatológicos de los tumores primarios y de que cada laboratorio determinara los receptores sobre la muestra de tejido metastásico como parte de la práctica clínica habitual, también se enviara una muestra del tumor primario y de la lesión metastásica a un laboratorio de referencia de alto volumen que de forma protocolizada analizara de nuevo, de forma simultánea y con la misma metodología ambas muestras de cada paciente controlando al máximo las condiciones analíticas (como la variabilidad de reactivos o la recuperación antigénica) y postanalíticas (interpretación de resultados de forma independiente por dos patólogos expertos en cáncer de mama). Con ello hemos obtenido la tasa de conversión de los receptores en un escenario real de práctica clínica habitual y al mismo tiempo lo hemos confirmado en un laboratorio central en condiciones de análisis supuestamente óptimas, comparando además ambos resultados, que era otro de los objetivos secundarios del estudio.

Calculamos que sería necesario incluir 129 pacientes para determinar la tasa de conversión de HER2 (el receptor con la tasa de conversión estimada más baja) en cada subtipo de cáncer de mama. Después de la inclusión de las primeras 84 pacientes, tras realizar el análisis intermedio planificado, la tasa de conversión de HER2 observada en la población global fue 3,57%, algo más baja del 10% estimado inicialmente, por lo que calculamos de nuevo el tamaño de la muestra considerando que sería necesario incluir 172 pacientes válidas. Añadimos un 25% de pérdidas contando con la dificultad de disponer de una muestra analizable del tumor primario archivado, inviabilidad de algunas biopsias y que algunas de ellas resultarían en enfermedad benigna, tejido normal o un tumor maligno de otro origen. Así, se preseleccionaron un total de 236 pacientes de las que finalmente se incluyeron a 184 pacientes evaluables. Para poder incluir este número de pacientes con cáncer de mama avanzado y susceptibles de realizar una biopsia hemos precisado la participación de 31 hospitales asociados al grupo GEICAM, que asumió la coordinación y gestión del proyecto.

7.1. Análisis de los resultados

Nuestros resultados demuestran que los receptores sobre los que basamos nuestras decisiones clínicas y, especialmente, los receptores hormonales RE y RPg son considerablemente inestables durante la progresión del cáncer de mama. Las tasas de conversión de HER2, RE y RPg eran del 3%, 13% y 28%, según las determinaciones realizadas por el laboratorio central y del 16%, 21% y 35% según las evaluaciones de los laboratorios locales. La expresión de HER2 era la más estable, mientras que la del RPg era la más variable. Sin embargo, si consideramos el estado de los receptores hormonales en conjunto (RH-positivo si RE-positivo y/o RPg-positivo), la tasa de conversión de los RH era del 15% (laboratorios locales) y del 12% (laboratorio central). La frecuencia de estos cambios representa un significativo número de pacientes y es por tanto clínicamente relevante.

Estos resultados están en la misma línea que los publicados anteriormente en dos estudios prospectivos.^{168,208} En el estudio DESTINY se realizó una biopsia de la metástasis a 121 pacientes del *Princess Margaret Hospital* de Toronto (Canadá), mostrando una tasa de conversión para HER2, RE y RPg del 10%, 16% y 40%, respectivamente. El estudio *Breast Recurrence in Tissues Study* (BRITS) analizó muestras emparejadas de 137 pacientes con cáncer de mama avanzado de 20 hospitales británicos observando una tasa de conversión del 3% para HER2, 10% para el RE y 25% para el RPg.²⁰⁸ Un metanálisis con datos individuales de las pacientes de estos dos estudios mostró unas tasas de conversión de 6, 13 y 31% para HER2, RE y RPg, respectivamente.¹³⁹ Curiosamente, las tasas de conversión obtenidas por el laboratorio central de nuestro estudio fueron casi idénticas a las obtenidas en el estudio BRITS, probablemente porque en el estudio británico tanto las muestras del tumor primario como de la recaída fueron también enviadas a dos patólogos expertos para una revisión centralizada. Por el contrario, los resultados obtenidos localmente en nuestro estudio son más similares a los obtenidos en el estudio DESTINY. A pesar de tratarse de una institución única, el hecho de que las muestras del tumor primario no se reanalizaran sistemáticamente en el momento de la recaída puede explicar los mayores índices de conversión observados en el estudio canadiense. En la Tabla 42 se muestran las principales características de estos dos estudios junto con las del nuestro (CONVERTHER). El largo intervalo de tiempo desde el diagnóstico del tumor primario hasta la inclusión en el estudio BRITS puede haber favorecido la aparición de más recaídas tardías del cáncer de mama RH-positivo/HER2-negativo, reflejado en la proporción relativamente grande de cánceres con RH-positivos y relativamente pequeña con subtipo HER2-positivo.

La menor tasa de conversión observada en HER2 coincide con un metanálisis de 26 estudios (24 retrospectivos) y 2.520 pacientes publicado por Houssami *et al* (2011), que

mostraba una tasa de discordancia combinada de HER2 del 5,5% (IC 95% 3,6-8,5%), comparable a la obtenida en nuestro estudio.²⁰⁹

Tabla 42. Características y resultados principales de los estudios prospectivos que han evaluado la tasa de conversión de los receptores HER2, RE y RPg entre el tumor primario y sus metástasis.

	DESTINY	BRITS	CONVERTHER		
Pacientes biopsiadas (n)	121	168	236		
Pacientes evaluables (n)	94	137	184		
Edad (mediana, años)	59	63	57		
Tiempo desde el diagnóstico del tumor primario hasta la inclusión en el estudio (meses)					
Mediana	71	95	58		
Rango	0-308	5-332	0-235		
Localización de la biopsia de la recaída n (%)					
• Loco-regional	23 (24,5%)	88 (64,2%)	35 (19,1%)		
• Distancia:	71 (75,5%)	49 (35,8%)	149 (80,9%)		
– Hueso	23 (24,5%)	0 (0%)	35 (19%)		
– Hígado	15 (16%)	4 (2,9%)	44 (23,9%)		
– Pleuro/pulmonar	7 (7,4%)	0 (0%)	19 (10,3%)		
– Piel/partes blandas	14 (15%)	16 (11,7%)	32 (17,4%)		
– Otras/desconocida	12 (12,7%)	29 (21,1%)	19 (10,3%)		
Subtipo inmunohistoquímico del tumor primario					
• RH+/HER2-	62 (66%)	102 (74,5%)	129 (71%)		
• HER2+ (RH+ o RH-)	13 (13,8%)	14 (10,2%)	32 (18%)		
• Triple negativo	19 (20,2%)	21 (15,3%)	20 (11%)		
			Local	Central	
Conversión	HER2 (%)	10	3	16	3
	RE (%)	16	10	21	13
	RPg (%)	40	25	35	28

Respecto a si la tasa de cambio de los receptores difería en los distintos subtipos tumorales, nosotros observamos que el subtipo triple negativo era el más estable, el que presentaba una menor tasa de conversiones de los receptores hormonales, no habiendo diferencias entre los subtipos respecto al cambio de HER2. Esta mayor estabilidad del subtipo triple negativo también se apreció en el metanálisis de los estudios DESTINY y BRITS, en el que la tasa de discordancias en los tumores triple negativo era más baja que en los tumores luminales o en los HER2-positivos,¹³⁹ y asimismo es consistente con otras grandes series retrospectivas.^{140,210,211} En una revisión de 789 pacientes del *MD Anderson Cancer Center* (sin estudio patológico centralizado) en el que observó una tasa de discordancia para HER2, RE y RPg de 13,6%, 18,4% y 40,3%, respectivamente, y que estaba centrada en la población triple negativa, los cambios en el subtipo triple negativo eran también menos frecuentes (9,5%) que en los otros subtipos.¹³⁸

Con mayor frecuencia el sentido de los cambios en el estado del RE y RPg en números absolutos y de acuerdo con los resultados obtenidos a nivel central era la pérdida de expresión (50/68, 74%) en comparación con la ganancia de expresión (18/68, 26%). Sin embargo, en términos relativos, de todas las pacientes con un tumor primario originariamente RH-positivo cambiaron a un estado RH-negativo en la metástasis el 10% de ellas, mientras que de las pacientes con tumor primario RH-negativo cambiaron a un estado RH-positivo un 24%. Cuando analizamos los resultados obtenidos a nivel local el sentido de estos cambios estaba repartido de forma equilibrada entre la pérdida de expresión (50/90, 56%) y la ganancia de expresión (40/90, 44%), aunque de todas las pacientes con un tumor primario originariamente RH-positivo cambiaron a un estado RH-negativo el 10% de ellas, mientras que de las pacientes con tumor primario RH-negativo cambiaron a un estado RH-positivo un 28%.

En contraste, en el análisis centralizado todos los cambios en el estado de HER2 fueron para adquirir la expresión del receptor (5/5, 100%), lo que supone una tasa de ganancia del receptor del 3,7% para las pacientes con tumores primarios HER2-negativo. El escaso número de discrepancias en el estado de HER2 no permite extraer conclusiones claras respecto al sentido predominante de los cambios, salvo la propia estabilidad del marcador. En el análisis local, aunque hubo numéricamente más conversiones de estado HER2-negativo a positivo (14/23, 61%) que en el sentido opuesto (9/23, 39%), el porcentaje de pacientes primitivamente HER2-positivas que cambiaron a HER2-negativo era de un 23% y el de las primitivamente HER2-negativas que cambiaron a HER2-positivo era de un 13%.

En resumen, nuestros resultados reflejan una tasa similar de conversiones de positivo-negativo que de negativo-positivo para los tres biomarcadores, sin advertirse una clara tendencia en ningún sentido para ninguno de ellos. En el metanálisis de los estudios DESTINY y BRITS también parecía haber una tasa parecida de ganancia de expresión que de pérdida de expresión para HER2 (5% vs. 12%) y RE (13% vs. 12%), mientras que para RPg la pérdida del receptor era más frecuente que la ganancia (43% vs. 16%, $p < 0,001$).¹³⁹ En el metanálisis de Houssami *et al* tampoco había una evidencia clara de una dirección sistemática en el sentido de las discordancias de HER2,²⁰⁹ y solamente tras la exclusión del estudio con resultados más atípicos¹³⁵ se encontró evidencia débil ($p = 0,074$) de que el cambio del tumor primario HER2-negativo a la metástasis HER2-positiva era más probable que el inverso.²⁰⁹ El conjunto de todos estos datos no permite concluir que las discordancias en el estado de los biomarcadores se produzcan principalmente en una dirección determinada.

Aunque la tasa de discordancias de los receptores era relativamente frecuente, solo condujo a un cambio de subtipo tumoral entre el tumor primario y la recidiva en un 10% de las pacientes, según la evaluación del laboratorio de referencia, y en un porcentaje algo mayor (24% de los casos) según los laboratorios locales. Esto es debido a que los

cambios de algún receptor hormonal no siempre se traducen en un cambio de subtipo. Sin embargo, estos cambios son clínicamente más relevantes, porque tienen evidentes implicaciones terapéuticas.

Entre los objetivos secundarios de la tesis pretendíamos analizar la posible relación entre la tasa de conversión de los receptores y la localización de las metástasis biopsiadas o la posible influencia de los tratamientos previamente recibidos. La localización de las metástasis (recaída loco-regional vs. metástasis a distancia) podía ser un factor clínico y biológico importante porque el subtipo del tumor primario se asocia a un diferente patrón de localización de recaídas. Además, las diferentes localizaciones metastásicas presentan diferente comportamiento clínico. Por otro lado, la decalcificación del material de las metástasis óseas biopsiadas puede alterar de forma sustancial el resultado del análisis de los tres receptores.²¹² Y por último, la cantidad y la calidad del tejido biopsiado, los riesgos de la biopsia y el tiempo invertido para realizarla son también diferentes en función de las distintas localizaciones. Cuando comparamos los cambios en el estado de los receptores entre las recidivas loco-regionales y las metástasis a distancia, no encontramos diferencias significativas para HER2, aunque sí se halló una mayor tasa de conversión para el RE (26 vs 10%; $p = 0,019$) y una tendencia no significativa para el RPg (41 frente a 25%, $p = 0,088$) en las recaídas loco-regionales. Los resultados de estas mismas comparaciones con los datos de los laboratorios locales no confirmaron estos hallazgos. Los estudios DESTINY y BRITS tampoco identificaron ninguna diferencia significativa en el cambio de los receptores entre las recaídas loco-regionales y las metástasis a distancia.^{168,208} Por el contrario, en un estudio sueco se encontró que la pérdida del RE o del RPg entre el tumor primario y la recaída era mayor en las metástasis a distancia que en las recaídas locales (16,2% vs. 6,8%, $p=0,028$ y 42,2% vs. 19,6%, $p=0,069$), respectivamente.²¹³ No encontramos una explicación razonable para nuestro hallazgo. En este mismo sentido, los datos de autopsias que comparaban el tumor primario con múltiples localizaciones metastásicas sugerían que las metástasis eran consistentes entre sí en el estado de HER2, RE y RPg, incluso si estos receptores eran diferentes del tumor primario sincrónico.²¹⁴ Dada la consistencia demostrada en estos estudios entre las metástasis de diferentes localizaciones, el lugar seleccionado para realizar la biopsia no parece un factor crítico en la re-evaluación de los receptores, y debe basarse principalmente en otros factores, como el balance entre la necesidad de obtener un material adecuado, los riesgos asociados, la implicación de recursos quirúrgicos o de radiología intervencionista y la comodidad de la paciente.

Por otro lado, y al igual que otros trabajos (incluidos los estudios BRITS y DESTINY)^{168,208,215} tampoco identificamos diferencias significativas en la tasa de conversión de HER2, RE y RPg (valoración centralizada) con respecto a los tratamientos previamente recibidos. Estos resultados contrastan con otros trabajos que sí han identificado una posible influencia del tratamiento adyuvante en el cambio de fenotipo

inmunohistoquímico de la recaída.^{140,141,213,216} Aunque en un contexto diferente, un metanálisis de 14 estudios prospectivos que evaluaba el efecto de la quimioterapia neoadyuvante en el estado de los biomarcadores y demostraba un cambio significativo en RE y RPg entre la biopsia previa a la quimioterapia y la pieza quirúrgica post-quimioterapia. Además, compararon las tasas de conversión de los receptores hormonales de las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante respecto a las pacientes de un grupo control que no lo recibieron. Consistentemente, el grupo de tratamiento neoadyuvante demostró una diferencia significativa en la tasa de conversión de ambos receptores hormonales en comparación con el grupo control, sugiriendo que la quimioterapia neoadyuvante puede modificar el estado de los receptores hormonales.²¹⁷ Un estudio más reciente basado en un registro de cáncer de mama en 21.755 pacientes niponas demuestra que la pérdida del estado HER2-positivo ocurría en un 21.4% de las pacientes después del tratamiento neoadyuvante mientras que un 3.4% de pacientes con tumor primario HER2-negativo convertían a un estado HER2-positivo después del tratamiento. Además un 4,6% de pacientes cambiaban de un estado RE-positivo a RE-negativo y un 9,3% cambiaban de un estado RE-negativo a RE-positivo.²¹⁸ Nuestro trabajo no encontró que el tratamiento previamente recibido influyera en la tasa de conversión de los receptores, si bien la inmensa mayoría de las pacientes habían recibido al menos algún tipo de terapia previa y el estudio no tenía potencia estadística suficiente para detectar diferencias entre las pacientes que habían o que no habían recibido tratamiento previo ni entre los diferentes subgrupos de tratamiento.

Otro de los objetivos secundarios del estudio era analizar la variabilidad en la medición de los biomarcadores entre los laboratorios locales y el laboratorio central. Nuestros resultados mostraron un buen grado de concordancia en la determinación de HER2 entre los laboratorios locales y el central, así como en la expresión del RE en la metástasis. La determinación del RE en el tumor primario y la determinación del RPg tanto en el tumor primario como en la metástasis mostraron un acuerdo menor. Prueba de ello es que a nivel del tumor primario la frecuencia del subtipo RH-positivo/HER2-negativo era menor según las instituciones locales que según el laboratorio central (53% vs. 71%, $p < 0,05$). La mediana de tiempo transcurrido entre las determinaciones de los receptores del tumor primario y los de la metástasis era de 58 meses (rango 0-235 meses). Posiblemente, el hecho de que los receptores del tumor primario fueran analizados en momentos muy distantes en el tiempo en los laboratorios locales y en el laboratorio central puede haber influido en estos resultados (empleo de diferentes metodologías, cambios en los puntos de corte, etc.).

Como se ha comentado anteriormente en la introducción, numerosas publicaciones han puesto de manifiesto una amplia variabilidad en los análisis de los receptores RE y RPg producidos por una diversidad de factores. Los resultados pueden fluctuar sustancialmente entre los laboratorios debido a las diferencias en el manejo de

muestras, la fijación de tejidos, la recuperación de antígenos y el tipo de anticuerpo. Dependiendo del epítipo reconocido, diferentes anticuerpos pueden detectar solo ciertas formas del receptor y pueden fallar en la detección de una variante específica. Además, la interpretación de los resultados del análisis es variable debido a los diferentes puntos de corte utilizados para separar los receptores positivos y negativos. Estas variaciones han dado lugar a graves problemas de fiabilidad de los receptores hormonales antes del desarrollo de guías de consenso.⁴⁰

Grandes grupos cooperativos internacionales han abordado la concordancia en los análisis de los receptores entre los laboratorios locales donde se incluían las pacientes y de manera centralizada en laboratorios académicos de alto volumen. Por ejemplo, en el ensayo del *Eastern Cooperative Oncology Group* ECOG 2197, el 11% de los test RE-negativos locales fueron positivos en las revisiones centrales, con una tasa de concordancia del 90%.¹⁹³ Y en el estudio ALTTO (*Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization*) en la revisión central se describieron un 4,3% de casos falsos positivos y 20% de casos falsos negativos para el RE.¹⁹⁶ Y en el estudio del *Breast International Group* BIG 1-98 que comparaba el tratamiento adyuvante con letrozol versus tamoxifeno versus hormonoterapia combinada, la revisión central confirmó el 97% de los tumores como receptor hormonal positivo. Sin embargo, el 69% del pequeño número de tumores (n = 105) evaluados como RE-negativos fueron realmente RE-positivos.¹⁹⁵ En general, la tasa de falsos negativos del RE (evaluación central versus local) estaba en el rango del 10%, mientras que la tasa de falsos positivos era del 5%. Y en el caso de HER2 los grandes estudios de adyuvancia con trastuzumab indicaban que la reproducibilidad de la expresión de HER2 cuando se realizaba en diferentes laboratorios era de tan solo el 85% de los casos. La concordancia era mayor cuando la determinación se realizaba mediante FISH en comparación con la expresión por inmunohistoquímica (88,1% y 81,6%, respectivamente).²¹⁹

En nuestro estudio la determinación de HER2 así como la del RE en la metástasis mostraba un buen grado de concordancia entre los laboratorios locales y el central comparable a la descrita en los mencionados estudios de los grandes grupos cooperativos. La concordancia para el RE en el tumor primario era solamente aceptable, aunque como se ha señalado anteriormente, el hecho de que los receptores del tumor primario fueran analizados con varios años de diferencia entre los laboratorios locales y el laboratorio central, puede explicar dichas diferencias.

La mayor tasa de discordancias en los receptores y en el subtipo tumoral observada en los laboratorios locales invita a reflexionar sobre la conveniencia de implantar medidas destinadas a mejorar la calidad de las determinaciones de aquellos biomarcadores que tienen una repercusión directa en las decisiones terapéuticas. La acreditación de los laboratorios, la implementación de estrictos controles de calidad o la centralización de los análisis de biomarcadores en laboratorios de referencia puede

mejorar la caracterización molecular de los tumores y tener un impacto directo en los resultados clínicos. De esta forma se podría obtener un mayor rendimiento de los tratamientos oncológicos y una optimización de la relación coste-efectividad.

El último de nuestros objetivos secundarios era analizar cómo los resultados de la biopsia y los cambios de los receptores hormonales y HER2 y del subtipo tumoral modificaban el plan de tratamiento inicialmente previsto antes de la realización de la biopsia. Tras la realización de la biopsia en un 4% de las pacientes no se confirmó la existencia de una lesión metastásica, un porcentaje ligeramente inferior al del metanálisis de los dos estudios prospectivos (8%).¹³⁹ El porcentaje de modificaciones en el tratamiento posterior observado en nuestro estudio (8%) también parece ligeramente inferior al observado en los estudios BRITS (17%) y DESTINY (14%).^{168,208} Sin embargo en estos estudios los cambios de tratamiento se recogieron según un cuestionario que cumplimentaban los clínicos que incluían a las pacientes. En nuestro estudio, aunque los clínicos también declararon en el eCRD un plan terapéutico diferente al planificado antes de la biopsia en 21 pacientes (11,5%), cuando se comprobó en el CRD el tratamiento realmente recibido tras la biopsia solo se había modificado en 15 pacientes (8%). De todas las pacientes en las que el subtipo tumoral había cambiado en la metástasis, el tratamiento solo se modificó en el 31% de los casos. A simple vista parece sorprendente que después de realizar una biopsia confirmatoria con sus inherentes riesgos, los clínicos solo adaptemos el tratamiento de forma consecuente en un porcentaje de pacientes aparentemente bajo. Sin embargo, esto probablemente refleja, por un lado, el hecho de que cuando los médicos observan un cambio en el estado del receptor, existe cierto grado de incertidumbre respecto a si se debe a un cambio biológico en el tumor o por el contrario es debido a una inconsistencia metodológica y por lo tanto puede ser difícil juzgar cuál de los dos resultados es más probable que refleje el verdadero estado del receptor. En consecuencia, los clínicos se sienten más seguros añadiendo el tratamiento antitumoral correspondiente cuando se detecta una ganancia de expresión del receptor, en lugar de eliminar un tratamiento potencialmente eficaz y no excesivamente tóxico como la hormonoterapia o la terapia anti-HER2 cuando se pierde la expresión del receptor. Por otro lado, casi la mitad de los cambios observados en nuestro estudio estaban relacionados con el RPg, que tiene menos influencia en el plan terapéutico. Además, hay otros factores que pueden influir en el juicio del clínico y la decisión terapéutica distintos al subtipo tumoral, como la respuesta a tratamientos previos, la agresividad de la enfermedad, presencia de síntomas, toxicidad, comorbilidad, preferencias de la paciente, etc.

Aunque no identificamos en el estudio ninguna señal de que la conversión de receptores o de subtipo tumoral comprometiera la respuesta a los subsiguientes tratamientos o que implicara un peor pronóstico, otros estudios retrospectivos sí observaron desde hace muchos años que la pérdida del RE en las lesiones recidivantes constituía un predictor de resistencia a la hormonoterapia.^{204,220} En un estudio de 789

pacientes tratadas en el *M.D. Anderson Cancer Center*, las pacientes con discordancias en el estado de los receptores tenían una supervivencia igual de desfavorable que la de las pacientes con cáncer de mama triple negativo.¹³⁸ Otros estudios también han observado una peor supervivencia en las pacientes con conversiones del RE^{140,213,221,222} o de HER2.^{141,211,221} Por el contrario, y al igual que en nuestro estudio, el metanálisis de los estudios prospectivos DESTINY y BRITS no encontró diferencias significativas ni en la respuesta a los subsiguientes tratamientos ni en la supervivencia de las pacientes con o sin discordancia en el estado de los receptores.¹³⁹ Sin embargo, es importante destacar que ningún estudio ha comparado los resultados de las pacientes con receptores discordantes cuyo tratamiento sistémico para la enfermedad metastásica se basó en los resultados de las metástasis frente a los resultados del tumor primario. Por lo tanto, no existe evidencia para establecer cuál es la mejor estrategia para seleccionar un plan terapéutico cuando se encuentran tales discordancias.¹³ Intuitivamente, parece plausible especular que la aproximación terapéutica basada en las características biológicas más recientes obtendrá mejores resultados. Por ejemplo, la frecuencia de mutaciones en el dominio de unión a la hormona del gen *ESR1* (gen que codifica el RE) es anecdótica en el tumor primario mientras que se observa en aproximadamente el 25-30% de las metástasis o ADN tumoral circulante (ctDNA) de las pacientes con cáncer de mama tratadas previamente con inhibidores de aromatasa. La aparición de esta mutación se asocia a un peor pronóstico y a resistencia a los inhibidores de aromatasa,²²³ lo que debería ser tenido en cuenta a la hora de planificar la secuencia óptima de tratamiento.

7.2. Causas de las conversiones

Los cambios en la expresión de los receptores pueden deberse a diferentes causas: 1) inconsistencias metodológicas; 2) heterogeneidad intratumoral; o 3) pueden deberse a un verdadero cambio biológico derivado de cambios genéticos o selección clonal durante la progresión del tumor o como consecuencia de una selección terapéutica por exposición a agentes sistémicos tales como la quimioterapia, la hormonoterapia, o las terapias dirigidas.

Nuestras tasas de discordancia están exactamente dentro del rango esperable de la modesta reproducibilidad técnica de los métodos de análisis de los receptores hormonales y HER2. De hecho, incluso si el mismo bloque tumoral se analizara dos veces en dos laboratorios diferentes aun con el mismo método, los resultados de la expresión de RE, RPg y HER2 mostrarían similares tasas de discordancia.^{193,195,196,219} Los clínicos tendemos a considerar los informes patológicos como precisos y reproducibles, pero las diferencias en el manejo de las muestras, el procesamiento de los tejidos y la interpretación de la inmunohistoquímica o FISH puede dar lugar a una evidente variabilidad en el estado de los receptores. Por lo tanto, no se puede descartar que los

errores en la medición de los receptores constituyan la principal fuente de discordancia, es decir, que las observaciones de los cambios en el estado de los receptores pueden simplemente ser debidas a una reproducibilidad imperfecta de los métodos de determinación del receptor.

Por otra parte, tampoco es inconcebible que un tumor pueda estar compuesto simultáneamente de subclones RE-positivos y RE-negativos (o HER2-positivos y HER2-negativos) siendo un solo componente el que dé lugar a las metástasis, o que se produzca algún tipo de evolución molecular en el cáncer. Los recientes avances tecnológicos en la patología moderna han permitido analizar el ADN, el ARN y las proteínas de diferentes porciones de un mismo tumor demostrando la existencia de heterogeneidad intratumoral.^{224,225} Y los estudios de secuenciación masiva han demostrado que la heterogeneidad espacial y temporal son fenómenos comunes en el cáncer de mama.¹⁹² La heterogeneidad intratumoral denota la coexistencia de subpoblaciones de células cancerosas que difieren en sus características genéticas, fenotípicas o de comportamiento dentro de un mismo tumor primario y entre un tumor primario dado y sus metástasis. Esta diversidad puede atribuirse a factores genéticos y epigenéticos y a respuestas adaptativas en las vías de señalización intracelular.²²⁶ Las células cancerosas dentro de un tumor dado pueden diferir no sólo fenotípicamente o en relación con alteraciones genéticas menores que no modifiquen el fenotipo, sino también en términos de sus *drivers* o aberraciones genéticas conductoras. Por ejemplo, se han descrito cánceres de mama primarios que contienen áreas neoplásicas con y sin amplificación de HER2.²²⁷⁻²²⁹ Por lo tanto, las biopsias de una pequeña región tumoral pueden no proporcionar una caracterización representativa de las alteraciones genéticas, epigenéticas y/o fenotípicas encontradas en el conjunto del tumor, lo que representa un gran reto para la caracterización de biomarcadores y la selección del tratamiento.

Por último, no puede excluirse un verdadero cambio en la biología tumoral, al menos en algunos casos. El genoma del cáncer de mama cambia de forma dinámica durante el curso de la enfermedad adquiriendo gradualmente miles de nuevas mutaciones (sustituciones, inserciones y deleciones de pares de bases) y un número más limitado de nuevas alteraciones en el número de copias y reordenamientos estructurales que confieren ventajas proliferativas y de supervivencia.^{192,230-232} De esta manera el cáncer evoluciona activamente a medida que las expansiones clonales de células cancerosas se superan unas a otras impulsadas por presiones selectivas cambiantes, procesos mutacionales y alteraciones de oncogenes y genes supresores de tumores. Tras el tratamiento sistémico anti-neoplásico y la radioterapia, los subclones con mutaciones relacionadas con la resistencia se convierten en dominantes en el tumor, y éste evoluciona hacia un fenotipo más resistente y agresivo. Debido a esta constante remodelación del genoma a lo largo del tiempo, si analizamos el genoma de dos muestras del mismo cáncer de mama en distintos momentos evolutivos podríamos

observar amplias diferencias. Por ejemplo, Cohen *et al.* analizaron mediante secuenciación masiva 130 muestras de metástasis de cáncer de mama RE-positivo hormono-resistente, identificando frecuentes mutaciones adquiridas en múltiples genes (v.g., 23% de mutaciones en *ESR1*, 7% en *ERBB2*, 5% en *RB1*, *PTEN* o *AKT1*) que en la mayoría de los casos no estaban presentes en sus respectivos tumores primarios RE-positivos. Estas alteraciones son clínicamente relevantes, tienen un indudable papel en la resistencia hormonal y claras implicaciones en la selección de nuevos tratamientos y en la elegibilidad en los ensayos clínicos.²³³ Algunas de estas alteraciones genéticas en la maquinaria molecular del tumor podrían ser, por lo tanto, responsables de al menos parte de las discrepancias en el estado de los receptores HER2, RE y RPg.

Por otro lado, aunque la realización de biopsias seriadas de lesiones metastásicas puede ser clave para identificar nuevas dianas moleculares con opciones terapéuticas más adaptadas con el fin de mejorar el manejo clínico de la paciente, la repetición del análisis genómico en una única localización tumoral no parece suficiente para percibir la evolución genómica del conjunto del tumor, ya que una pequeña muestra de biopsia difícilmente representa toda la masa tumoral. Además, los tumores metastásicos suelen ser difíciles de acceder y las biopsias seriadas de las metástasis accesibles a menudo son clínicamente complicadas. Por ello, en la actualidad se está investigando otras formas de estudiar la evolución genómica del tumor. Debido a que el ADN tumoral circulante (ctDNA) es una mezcla de ADN procedente de todas las lesiones tumorales de la paciente, puede representar el catálogo de mutaciones que tiene la enfermedad en todo el organismo. Este método no invasivo es conocido como *biopsia líquida*, y presenta evidentes ventajas para monitorizar la evolución genómica del tumor.

Un examen más profundo de las diferencias moleculares entre el tumor primario y sus correspondientes metástasis, no sólo a nivel del receptor sino también a nivel de las vías funcionales entre el tumor primario y sus metástasis podría contribuir a dilucidar si estas discordancias en los receptores son realmente el resultado de una evolución genómica gradual del tumor. En este sentido, A. Prat *et al.* han analizado la expresión de 105 genes relacionados con el cáncer (incluyendo los del clasificador PAM50) en 123 muestras pareadas de tumor primario de mama y metástasis (parte de ellas procedentes del propio estudio ConvertHER).¹⁹⁸ Aunque el subtipo molecular intrínseco generalmente se conservaba durante la progresión metastásica, los tumores *Luminal A* adquirían un perfil *Luminal B* o *HER2-enriched* durante la progresión metastásica, probablemente reflejando la evolución del tumor y/o la adquisición de un estado de independencia estrogénica. La tasa de conversión del subtipo intrínseco era de 0% cuando el tumor primario era *Basal-like*, 23,1% en los *HER2-enriched* (HER2-E), 30,0% en los *Luminal B* y 55,3% en los *Luminal A*. Un 40% de los tumores *Luminal A* convirtieron a *Luminal B*, y los tumores *Luminales A* y *B* convirtieron a *HER2-enriched* en un 14% de los casos (Tabla 43).¹⁹⁸ Se identificaron 47 genes diferencialmente expresados en la enfermedad metastásica respecto al tumor primario. En las metástasis aumentaba la

expresión de genes relacionados con la proliferación (v.g., *MKI67*) y la migración (como *FGFR4*) mientras que disminuía la expresión de genes relacionados con el subtipo *Luminal* (por ejemplo, *PGR*). Aunque los tres genes que codifican los biomarcadores clásicos (*ESR1*, *PGR* y *ERBB2*) se conservaban en gran medida en la enfermedad metastásica, *PGR* era el gen que más reducía su expresión respecto a los tumores primarios.¹⁹⁸

Tabla 43. Concordancia de subtipo molecular intrínseco entre tumor primario y metástasis.¹⁹⁸

Tumor Primario	Enfermedad Metastásica				Genes diferencialmente expresados (FDR<5%)
	<i>Basal-like</i>	<i>HER2-E</i>	<i>Luminal A</i>	<i>Luminal B</i>	
<i>Basal-like</i>	12 (100%)	0	0	0	0
<i>HER2-E</i>	2 (15,4%)	10 (76,9%)	1 (7,7%)	0	7
<i>Luminal A</i>	0	7 (14,9%)	21 (44,7%)	19 (40,4%)	24
<i>Luminal B</i>	0	4 (13,3%)	5 (16,7%)	21 (70%)	8

*FDR, false discovery rate.

Estos resultados sugieren que, aunque existe una cierta estabilidad en el subtipo intrínseco, un 37% de los tumores puede cambiar de subtipo molecular y, por otro lado, que la expresión de los genes *ESR1*, *PGR* y *ERBB2* también puede cambiar en las metástasis. Por lo tanto, un verdadero cambio en la biología tumoral parece producirse al menos en algunos casos, subrayando la necesidad de biopsiar la enfermedad metastásica con el fin de comprender mejor la evolución clínica y biológica del tumor.

7.3. Contribuciones, fortalezas y limitaciones del estudio

Hasta donde sabemos, el estudio ConvertHER es el mayor estudio prospectivo que ha evaluado la tasa de conversión de los receptores (HER2, RE y RPg) entre el tumor primario y una lesión recidivante en una población de pacientes con cáncer de mama avanzado. Por otra parte, es el único estudio que ha comparado el resultado de los receptores determinado en 31 laboratorios locales con los obtenidos en un solo laboratorio central. Su diseño prospectivo ha permitido confirmar y estimar la tasa de discordancias reduciendo el riesgo de posibles sesgos de selección.

Los resultados de nuestro estudio han contribuido a establecer la recomendación actual de realizar biopsias confirmatorias cuando se sospecha una recaída en una paciente con cáncer de mama. Las razones para apoyar esta recomendación incluyen no

sólo evitar un diagnóstico erróneo de la recaída de cáncer de mama (en un 4% de las pacientes no se confirmó la existencia de la supuesta lesión metastásica), sino también la hipótesis cada vez más convincente de que la adaptación más precisa del tratamiento antitumoral a las características biológicas más recientes mejorará los resultados clínicos. De hecho, cada vez un mayor número de nuevos ensayos clínicos requiere una evaluación reciente de biomarcadores para la selección de las pacientes.

El estudio ConvertHER ha contribuido también a implantar y popularizar una práctica clínica de biopsiar las lesiones metastásicas que hasta entonces no constituía una práctica generalizada en nuestro país ni una recomendación formal en las guías clínicas internacionales.

Por otra parte, reconocemos que el diseño y la ejecución del estudio ConvertHER puede tener también ciertas limitaciones metodológicas. Al tratarse de un estudio multicéntrico la metodología empleada probablemente haya variado ampliamente en los 31 centros participantes, porque no estaba estandarizada y además ha evolucionado a lo largo del tiempo. Nosotros tratamos de reducir esta variabilidad metodológica reproduciendo las determinaciones de los receptores en un único laboratorio de referencia con amplia experiencia en el que se siguieron los mismos procedimientos para el análisis de las muestras e interpretación de los resultados. No obstante, los tejidos primarios archivados podían corresponder a un tiempo muy anterior al del análisis centralizado y por otro lado el laboratorio central no tenía control ni capacidad de modificar las variables preanalíticas (como el tiempo de isquemia, proceso de fijación, tallado e inclusión en parafina, selección del bloque, etc.). Hasta 67 variables preanalíticas pueden alterar el examen inmunohistoquímico de los receptores.²³⁴ Indudablemente la diligencia en la ejecución de todos esos procesos en los laboratorios locales ha podido influir en la calidad del resultado de la técnica inmunohistoquímica o de hibridación in situ aplicada posteriormente por el laboratorio central.

Por otro lado, la población de pacientes seleccionada para el estudio incluye tanto a pacientes metastásicas *de novo* como a pacientes en primera recaída o en sucesivas progresiones, la mayoría de las cuales habían recibido uno o varios tratamientos previos para su enfermedad. Todos estos factores podrían haber influido en la tasa de conversiones y diluirlas en una población algo heterogénea.

Aunque hemos podido confirmar y cuantificar las discordancias en los receptores, nuestro estudio no tenía capacidad para explicar la naturaleza de estas conversiones, y en particular distinguir la propia variabilidad inherente a las técnicas analíticas de fenómenos biológicos reales como la heterogeneidad intratumoral o la adaptación genómica del tumor hacia un fenotipo más resistente y agresivo.

En última instancia, la cuestión más importante que subyace al estudio es si la conversión del estado del receptor o del subtipo y los cambios consiguientes en el

manejo clínico conducen al final a mejoras en la calidad de vida y/o en la supervivencia de las pacientes. De forma exploratoria analizamos si las conversiones de receptores o de subtipo tumoral se asociaban a una diferente sensibilidad a los subsiguientes tratamientos y en consecuencia a un pronóstico diferente. Sin embargo, nuestro estudio no tenía potencia estadística suficiente ni el diseño adecuado para abordar este análisis ni tampoco observamos ninguna señal para poder generar ninguna hipótesis al respecto. Aunque intuitivamente la información real sobre el estado de los receptores de las metástasis y el tratamiento sistémico consecuente debe mejorar los resultados, esta hipótesis tiene que demostrarse en estudios prospectivos diseñados expresamente con esta finalidad.

7.4. Recomendaciones actuales de las guías clínicas

En línea con los resultados y conclusiones de nuestro estudio, las guías clínicas internacionales recomiendan la realización de una biopsia especialmente al inicio de la enfermedad metastásica y la re-evaluación de los receptores para guiar las decisiones terapéuticas:

- Las guías de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomiendan, en el momento de la primera recaída del cáncer de mama, biopsiar una lesión accesible para confirmar la naturaleza metastásica de la enfermedad. Y puesto que reconocen que los resultados de los biomarcadores RE, RPg y HER2 pueden haber cambiado desde el tumor primario y estos resultados pueden influir en las decisiones terapéuticas, el panel de expertos recomienda volver a examinar el estado de RE, RPg y HER2 en al menos una lesión metastásica con especial atención a la realización de la técnica. Se ha de ser especialmente cuidadoso en las metástasis óseas, ya que el procesamiento (descalcificación) puede alterar los resultados de RE y/o HER2, o las biopsias pueden contener escasas células tumorales y los resultados no serían fiables.^{13,235} Sin embargo, para las pacientes con discordancias en estos biomarcadores, en la actualidad no existe evidencia para determinar si el pronóstico mejora cuando el tratamiento sistémico es guiado por los resultados de los biomarcadores obtenidos en las metástasis. El consenso del panel cuando hay discordancia de RE, RPg o HER2 entre el tumor primario y sus metástasis es utilizar los biomarcadores de la metástasis para guiar el tratamiento sistémico, siempre que sea compatible con el contexto clínico y con los objetivos de la paciente. Aun así, puede haber algunas pacientes en las que la información disponible en el tumor primario sea suficiente.^{13,235}

- Las guías de la NCCN v.2.2016 igualmente recomiendan que la enfermedad metastásica sea biopsiada al presentarse la primera recaída. Esto asegura la confirmación de la enfermedad metastásica y determina de forma precisa la histología tumoral, y permite la determinación de biomarcadores y la selección de un adecuado tratamiento. El panel recomienda el re-análisis de RE, RPg y HER2, especialmente cuando estos eran desconocidos previamente, o cuando inicialmente eran negativos.¹²
- En la misma línea se pronuncian las guías de la *European Society of Medical Oncology*, para las que debe llevarse a cabo una biopsia de una lesión metastásica si es de fácil acceso para confirmar el diagnóstico (preferiblemente proporcionando tejido histológico), en particular cuando la metástasis se diagnostica por primera vez. Cuando sea clínicamente factible, los biomarcadores (en particular RE, RPg y HER2) deben ser re-evaluados al menos una vez en la enfermedad metastásica (*Nivel de evidencia: 1B*). Las dificultades técnicas que afectan al examen del tejido debido a la localización de la metástasis (por ejemplo, el hueso) se deben discutir con el patólogo de antemano.¹¹
- Un panel de expertos alemán planteaba la realización de biopsias seriadas de tejido tumoral para analizar con mayor profundidad la evolución de los biomarcadores en caso de resultados discordantes. Según el grupo alemán también sería razonable repetir una biopsia de la metástasis en caso de una evolución atípica o inesperada.²³⁶

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Respecto al **objetivo principal**:
 - a. Las conversiones en el estado de HER2 entre el tumor primario y sus respectivas metástasis son infrecuentes (3% de todas las pacientes) cuando se determinan en un laboratorio de gran experiencia prestando especial atención a las condiciones metodológicas.
 - b. El receptor HER2 permanece similarmente estable en todos los subtipos, sin diferencias entre ellos (0% de conversiones en el subtipo HER2-positivo, 3% en el subtipo RH-positivo y 6% en el subtipo triple negativo).

2. Respecto a los **objetivos secundarios**:
 - a. Las discordancias en el estado de los receptores hormonales RE y RPg entre el tumor primario y sus correspondientes metástasis son relativamente frecuentes (13% y 28% de las pacientes, respectivamente), a pesar de ser determinados en un laboratorio de referencia.
 - b. Las discordancias de los receptores HER2, RE y RPg son sustancialmente mayores cuando fueron analizados en sus propios laboratorios locales (16%, 21% y 35%, respectivamente).
 - c. Nuestra tasa de discordancias está en el rango esperable de la modesta reproducibilidad técnica de los métodos de análisis de los receptores y además no parece haber una clara tendencia en el sentido de las conversiones (de positivo a negativo o de negativo a positivo) para ninguno de los tres biomarcadores, por lo que es posible que los errores en la medición de los receptores constituyan la principal fuente de discordancia. No obstante, no se puede descartar que la heterogeneidad intratumoral del tumor primario o verdaderos cambios biológicos a lo largo de la evolución del tumor sean responsables de al menos una parte de dichas discordancias.
 - d. El subtipo tumoral se mantuvo relativamente estable entre el tumor primario y sus metástasis a pesar de las frecuentes discordancias, modificándose en tan solo un 10% de las pacientes según las determinaciones del laboratorio central (y en un 26% de las pacientes según

las determinaciones de los laboratorios locales). Estos cambios de subtipo son los que en realidad pueden influir en las decisiones terapéuticas.

- e. La realización de la biopsia de las lesiones sospechosas de metástasis revela un diagnóstico inesperado como un segundo tumor maligno, o descarta un diagnóstico de malignidad en un pequeño (4%) pero clínicamente relevante porcentaje de pacientes, y modifica el plan de tratamiento inicialmente previsto en un 8% de todas las pacientes.
- f. El plan terapéutico se modificó en solo un tercio de las pacientes que cambiaron de subtipo tumoral, probablemente debido a la influencia de otros factores en las decisiones terapéuticas y a la tendencia de los clínicos a añadir terapias dirigidas cuando se gana la expresión de un receptor más que a suspenderlas cuando se pierde su expresión.
- g. Hubo una considerable concordancia en la determinación de HER2 y también en la determinación del RE en la metástasis entre los laboratorios locales y el central, comparable a la encontrada en otros grandes estudios con análisis centralizado de los receptores. En cambio, la concordancia del RE en el tumor primario y del RPg fueron subóptimas.
- h. No hemos identificado una señal clara de que las conversiones de los receptores se asocien a un peor pronóstico. Es posible que el diseño prospectivo de nuestro estudio haya influido en la adaptación del tratamiento de forma consecuyente y por tanto en la respuesta al tratamiento y en el pronóstico de las pacientes.
- i. Nuestro estudio apoya la actual recomendación de biopsiar las lesiones sospechosas de recidiva y especialmente al presentarse la primera recaída, no solo para evitar un diagnóstico erróneo de recaída, sino porque además puede identificar cambios en los biomarcadores con opciones terapéuticas más adaptadas al perfil biológico actualizado de la enfermedad.
- j. Finalmente, la mayor tasa de discordancias en los receptores y en el subtipo tumoral observada en los laboratorios locales sugiere la necesidad de implantar medidas destinadas a mejorar la calidad de las determinaciones de biomarcadores con repercusión directa en las decisiones terapéuticas (v.g., acreditaciones de los laboratorios, controles de calidad, centralización de los análisis de biomarcadores, etc.).

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(2):CD005002.
2. Independent UKPoBCS. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Lancet*. 2012;380(9855):1778-1786.
3. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Peto R, Davies C, 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;379(9814):432-444.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Davies C, Godwin J, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9793):771-784.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Dowsett M, Forbes JF, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet*. 2015;386(10001):1341-1352.
6. Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS One*. 2011;6(6):e21030.
7. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-1716.
8. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(9):2206-2223.
9. Gavila J, Lopez-Tarruella S, Saura C, et al. SEOM clinical guidelines in metastatic breast cancer 2015. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2015;17(12):946-955.
10. Cardoso F, Harbeck N, Fallowfield L, Kyriakides S, Senkus E, Group EGW. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 7:vii11-19.
11. Cardoso F, Costa A, Norton L, et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)dagger. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(10):1871-1888.
12. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, et al. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(3):324-354.
13. Van Poznak C, Somerfield MR, Bast RC, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(24):2695-2704.

14. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2017.
15. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. 2014.
16. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2016;27(5):926-933.
17. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *The lancet oncology*. 2014;15(1):23-34.
18. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(3):792-800.
19. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet*. 2005;365(9472):1727-1741.
20. Milne RL, Osorio A, Cajal TR, et al. The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(9):2861-2869.
21. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G, Endogenous H, Breast Cancer Collaborative G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(8):606-616.
22. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2004;13(10):1558-1568.
23. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A,, editors. AJCC cancer staging manual (7th ed). *New York, NY: Springer*. 2010.
24. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
25. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(21):1446-1452.
26. Paoletti C, Hayes DF. Molecular testing in breast cancer. *Annual review of medicine*. 2014;65:95-110.
27. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(10):1134-1150.
28. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1968;59(2):632-638.
29. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966;55(6):1574-1581.

30. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(8):1616-1622.
31. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(6):1980-1989.
32. Kumar R, Gururaj AE, Vadlamudi RK, Rayala SK. The clinical relevance of steroid hormone receptor corepressors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(8):2822-2831.
33. Robinson DR, Wu YM, Vats P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45(12):1446-1451.
34. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(5):1474-1481.
35. Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K, et al. Immunocytochemical estrogen and progesterin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival. *Cancer*. 1990;66(8):1663-1670.
36. Colzani E, Liljegren A, Johansson AL, et al. Prognosis of patients with breast cancer: causes of death and effects of time since diagnosis, age, and tumor characteristics. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(30):4014-4021.
37. Colleoni M, Sun Z, Price KN, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(9):927-935.
38. Elledge RM, Green S, Pugh R, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;89(2):111-117.
39. Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, Martinez-Agullo A, Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast cancer research and treatment*. 1999;56(1):67-78.
40. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(16):2784-2795.
41. Deyarmin B, Kane JL, Valente AL, et al. Effect of ASCO/CAP guidelines for determining ER status on molecular subtype. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(1):87-93.
42. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 2014;110(3):565-572.
43. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):54-65.
44. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *Journal*

- of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 1992;10(7):1049-1056.
45. Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(35):5697-5704.
 46. Zhou Q, Yin W, Du Y, Lu J. For or against adjuvant trastuzumab for pT1a-bN0M0 breast cancer patients with HER2-positive tumors: a meta-analysis of published literatures. *PLoS One.* 2014;9(1):e83646.
 47. Joensuu H, Bono P, Kataja V, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(34):5685-5692.
 48. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2005;353(16):1659-1672.
 49. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2005;353(16):1673-1684.
 50. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2011;365(14):1273-1283.
 51. Cameron D, Casey M, Oliva C, Newstat B, Imwalle B, Geyer CE. Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *Oncologist.* 2010;15(9):924-934.
 52. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2006;355(26):2733-2743.
 53. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(21):2585-2592.
 54. Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2015;372(8):724-734.
 55. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2012;367(19):1783-1791.
 56. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, et al. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010;28(8):1301-1307.
 57. Chan A, Delaloge S, Holmes FA, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The lancet oncology.* 2016;17(3):367-377.
 58. Martin M, Bonnetterre J, Geyer CE, Jr., et al. A phase two randomised trial of neratinib monotherapy versus lapatinib plus capecitabine combination therapy in patients with HER2+ advanced breast cancer. *European journal of cancer.* 2013;49(18):3763-3772.
 59. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1999;79(7-8):1220-1226.

60. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(33):5529-5537.
61. Johnston S, Pippin J, Jr., Pivot X, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(33):5538-5546.
62. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(13):4741-4748.
63. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(1):14-20.
64. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, et al. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. *The lancet oncology*. 2011;12(12):1134-1142.
65. Press MF, Sauter G, Buyse M, et al. Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(7):859-867.
66. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3997-4013.
67. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2002;13(7):1036-1043.
68. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. Reporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(8):416-422.
69. Dowsett M, Smith I, Robertson J, et al. Endocrine therapy, new biologicals, and new study designs for presurgical studies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2011;2011(43):120-123.
70. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-1513.
71. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008;17(4):323-334.
72. Luporsi E, Andre F, Spyrtatos F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer research and treatment*. 2012;132(3):895-915.
73. Polley MY, Leung SC, McShane LM, et al. An international Ki67 reproducibility study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(24):1897-1906.
74. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(22):1656-1664.

75. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(10):736-750.
76. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26(8):1533-1546.
77. Guiu S, Michiels S, Andre F, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(12):2997-3006.
78. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(2):167-170.
79. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, et al. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(19):1380-1388.
80. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.
81. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-8423.
82. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(27):2817-2826.
83. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-536.
84. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160-1167.
85. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(23):3726-3734.
86. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(21):2005-2014.
87. Gluz O, Nitz UA, Christgen M, et al. West German Study Group Phase III PlanB Trial: First Prospective Outcome Data for the 21-Gene Recurrence Score Assay and Concordance of Prognostic Markers by Central and Local Pathology Assessment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(20):2341-2349.
88. Gluz O, Nitz U, Christgen M, et al. Prospective WSG Phase III PlanB trial: Clinical outcome at 5-year follow-up and impact of 21 Gene Recurrence Score® result, central/local-pathological review of grade, ER, PR and Ki-67 in HR+/HER2- high risk node-negative and -positive breast cancer patients. *10th European Breast Cancer Conference*. 2016;Abstract LBA 8.
89. Piccart M, Rutgers E, Veer Lvt, Slaets L. Primary analysis of the EORTC 10041/ BIG 3-04 MINDACT study: a prospective, randomized study evaluating the clinical utility of the 70-gene signature (MammaPrint) combined with common clinical-pathological criteria for selection of patients for adjuvant chemotherapy in breast cancer with 0 to 3 positive nodes. *AACR 2016*. 2016;CT039. Disponible en <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00433589?term=NCT00433589&rank=1>.

90. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5678-5685.
91. Cheang MC, Voduc KD, Tu D, et al. Responsiveness of intrinsic subtypes to adjuvant anthracycline substitution in the NCIC.CTG MA.5 randomized trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(8):2402-2412.
92. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(16):4465-4472.
93. Martin M, Prat A, Rodriguez-Lescure A, et al. PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2013;138(2):457-466.
94. Gnant M, Filipits M, Greil R, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(2):339-345.
95. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, et al. The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(5):1298-1305.
96. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, et al. Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(8):916-922.
97. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(22):2783-2790.
98. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*. 2014;14:177.
99. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(18):6012-6020.
100. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2013;109(12):2959-2964.
101. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, et al. EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(3):640-647.
102. Martin M, Brase JC, Calvo L, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):R38.
103. Martin M, Brase JC, Ruiz A, et al. Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen

- receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Breast cancer research and treatment*. 2016;156(1):81-89.
104. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, et al. Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Arch*. 2012;460(3):251-259.
105. Muller BM, Brase JC, Haufe F, et al. Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. *J Clin Pathol*. 2012;65(7):660-662.
106. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(16):1227-1232.
107. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1996;276(22):1818-1822.
108. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(6):2345-2350.
109. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *The New England journal of medicine*. 1998;339(14):941-946.
110. Kell MR, Burke JP, Barry M, Morrow M. Outcome of axillary staging in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2010;120(2):441-447.
111. Clarke M, Collins R, Darby S, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366(9503):2087-2106.
112. Fisher B, Carbone P, Economou SG, et al. 1-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A report of early findings. *The New England journal of medicine*. 1975;292(3):117-122.
113. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, et al. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *The New England journal of medicine*. 1976;294(8):405-410.
114. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-1717.
115. Gines J, Sabater E, Martorell C, Grau M, Monroy M, Casado MA. Efficacy of taxanes as adjuvant treatment of breast cancer: a review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2011;13(7):485-498.
116. von Minckwitz G, Blohmer JU, Costa SD, et al. Response-guided neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(29):3623-3630.
117. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014.
118. Gradishar WJ AB, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, Elias AD, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goldstein LJ, Hayes DF, Hudis CA, Isakoff SJ, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Breast Cancer; Version 1.2014. 2014.
119. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-816.
120. Cuzick J, Sestak I, Baum M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *The lancet oncology*. 2010;11(12):1135-1141.

121. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A, et al. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up. *The lancet oncology*. 2011;12(12):1101-1108.
122. Bliss JM, Kilburn LS, Coleman RE, et al. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(7):709-717.
123. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(3):509-518.
124. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9897):1021-1028.
125. Pivot X, Romieu G, Debled M, et al. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2013;14(8):741-748.
126. Del Barco S, Ciruelos E, Tusquets I, Ruiz M, Barnadas A. SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer 2013. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2013;15(12):1011-1017.
127. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology*. 2012;13(1):25-32.
128. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *The lancet oncology*. 2016;17(6):791-800.
129. Chia SK, Speers CH, D'Yachkova Y, et al. The impact of new chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort of women with metastatic breast cancer. *Cancer*. 2007;110(5):973-979.
130. Gennari A, Conte P, Rosso R, Orlandini C, Bruzzi P. Survival of metastatic breast carcinoma patients over a 20-year period: a retrospective analysis based on individual patient data from six consecutive studies. *Cancer*. 2005;104(8):1742-1750.
131. Zamora P, Servitja S, Santaballa A, et al. CASCADE study: Longer overall survival in de novo versus recurrent patients with locally advanced/metastatic breast cancer *San Antonio Breast Cancer Symposium 2015*. 2015;Poster P5-08-43.
132. Zamora P, Servitja S, Santaballa A, et al. CASCADE study: Treatment and clinical outcomes of metastatic breast cancer by tumor immunophenotypes. *San Antonio Breast Cancer Symposium 2015*. 2015;Poster P3-07-39.
133. Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(26):15901-15905.
134. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(3):497-522.
135. Lower EE, Glass E, Blau R, Harman S. HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2009;113(2):301-306.
136. Edgerton SM, Moore D, 2nd, Merkel D, Thor AD. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11(3):214-221.

137. Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, et al. Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. *Oncologist*. 2008;13(8):838-844.
138. Liedtke C, Broglio K, Moulder S, et al. Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2009;20(12):1953-1958.
139. Amir E, Clemons M, Purdie CA, et al. Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(6):708-714.
140. Lindstrom LS, Karlsson E, Wilking UM, et al. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(21):2601-2608.
141. Niikura N, Liu J, Hayashi N, et al. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(6):593-599.
142. Yang YF, Liao YY, Yang M, Peng NF, Xie SR, Xie YF. Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2014;31(10):214.
143. Chang HJ, Han SW, Oh DY, et al. Discordant human epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor status in primary and metastatic breast cancer and response to trastuzumab. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41(5):593-599.
144. Kocjan G, Chandra A, Cross P, et al. BSCC Code of Practice--fine needle aspiration cytology. *Cytopathology*. 2009;20(5):283-296.
145. Foukakis T, Astrom G, Lindstrom L, Hatschek T, Bergh J. When to order a biopsy to characterise a metastatic relapse in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 10:x349-353.
146. Gupta S, Madoff DC. Image-guided percutaneous needle biopsy in cancer diagnosis and staging. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2007;10(2):88-101.
147. Gupta S. New techniques in image-guided percutaneous biopsy. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2004;27(2):91-104.
148. Gupta S, Wallace MJ, Cardella JF, et al. Quality improvement guidelines for percutaneous needle biopsy. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;21(7):969-975.
149. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*. 2011;22(4):215-229.
150. Lofgren L, Skoog L, von Schoultz E, et al. Hormone receptor status in breast cancer--a comparison between surgical specimens and fine needle aspiration biopsies. *Cytopathology*. 2003;14(3):136-142.
151. Marrazzo A, Taormina P, Leonardi P, Lupo F, Filosto S. Immunocytochemical determination of estrogen and progesterone receptors on 219 fine-needle aspirates of breast cancer. A prospective study. *Anticancer Res*. 1995;15(2):521-526.
152. Masood S. Use of monoclonal antibody for assessment of estrogen and progesterone receptors in malignant effusions. *Diagn Cytopathol*. 1992;8(2):161-166.
153. Tafjord S, Bohler PJ, Risberg B, Torlakovic E. Estrogen and progesterone hormone receptor status in breast carcinoma: comparison of immunocytochemistry and immunohistochemistry. *Diagn Cytopathol*. 2002;26(3):137-141.
154. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-563.

155. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med*. 2009;15(1):68-74.
156. Vargas AC, McCart Reed AE, Waddell N, et al. Gene expression profiling of tumour epithelial and stromal compartments during breast cancer progression. *Breast cancer research and treatment*. 2012;135(1):153-165.
157. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, et al. The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression. *Cancer Res*. 2012;72(1):325-334.
158. Leifland K, Lagerstedt U, Svane G. Comparison of stereotactic fine needle aspiration cytology and core needle biopsy in 522 non-palpable breast lesions. *Acta Radiol*. 2003;44(4):387-391.
159. Leifland K, Lundquist H, Lagerstedt U, Svane G. Comparison of preoperative simultaneous stereotactic fine needle aspiration biopsy and stereotactic core needle biopsy in ductal carcinoma in situ of the breast. *Acta Radiol*. 2003;44(2):213-217.
160. Homesh NA, Issa MA, El-Sofiani HA. The diagnostic accuracy of fine needle aspiration cytology versus core needle biopsy for palpable breast lump(s). *Saudi Med J*. 2005;26(1):42-46.
161. Lieske B, Ravichandran D, Wright D. Role of fine-needle aspiration cytology and core biopsy in the preoperative diagnosis of screen-detected breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2006;95(1):62-66.
162. Domanski AM, Monsef N, Domanski HA, Grabau D, Ferno M. Comparison of the oestrogen and progesterone receptor status in primary breast carcinomas as evaluated by immunohistochemistry and immunocytochemistry: a consecutive series of 267 patients. *Cytopathology*. 2013;24(1):21-25.
163. Shabaik A, Lin G, Peterson M, et al. Reliability of Her2/neu, estrogen receptor, and progesterone receptor testing by immunohistochemistry on cell block of FNA and serous effusions from patients with primary and metastatic breast carcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2011;39(5):328-332.
164. Arnedos M, Nerurkar A, Osin P, A'Hern R, Smith IE, Dowsett M. Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2009;20(12):1948-1952.
165. Aurilio G, Monfardini L, Rizzo S, et al. Discordant hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in bone metastases compared to primary breast cancer. *Acta Oncol*. 2013;52(8):1649-1656.
166. Amir E, Ooi WS, Simmons C, et al. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008;20(10):763-768.
167. Mullink H, Henzen-Logmans SC, Tadema TM, Mol JJ, Meijer CJ. Influence of fixation and decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. *J Histochem Cytochem*. 1985;33(11):1103-1109.
168. Amir E, Miller N, Geddie W, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(6):587-592.
169. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-847.
170. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000;80(12):1943-1949.

171. Gillett CE, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol*. 2000;192(4):549-553.
172. Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(34):5630-5637.
173. Zidan A, Christie Brown JS, Peston D, Shousha S. Oestrogen and progesterone receptor assessment in core biopsy specimens of breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1997;50(1):27-29.
174. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2249-2256.
175. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(12):962-972.
176. Mauri D, Kamposioras K, Tsali L, et al. Overall survival benefit for weekly vs. three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(1):69-74.
177. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(12):2812-2823.
178. Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JP. Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(18):1285-1291.
179. Burzykowski T, Buyse M, Piccart-Gebhart MJ, et al. Evaluation of tumor response, disease control, progression-free survival, and time to progression as potential surrogate end points in metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):1987-1992.
180. Rosen LS, Gordon DH, Dugan W, Jr., et al. Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer*. 2004;100(1):36-43.
181. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(35):5132-5139.
182. Ellis MJ, Bondarenko I, Trishkina E, et al. FALCON: A phase III randomised trial of fulvestrant 500 mg vs. anastrozole for hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Annals of Oncology*. 2016;27(suppl 6).
183. Gibson L, Lawrence D, Dawson C, Bliss J. Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(4):CD003370.
184. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, et al. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(2):343-353.
185. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2016. 2016;375:1925-1936.
186. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;375(18):1738-1748.

187. Yardley DA, Noguchi S, Pritchard KI, et al. Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis. *Adv Ther.* 2013;30(10):870-884.
188. Alba E, Antón A, Barnadas A, et al. Guía GEICAM de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama metastásico. 2015.
189. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine.* 2001;344(11):783-792.
190. Wang Y, Waters J, Leung ML, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature.* 2014;512(7513):155-160.
191. Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, et al. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res.* 2010;20(1):68-80.
192. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature.* 2011;472(7341):90-94.
193. Badve SS, Baehner FL, Gray RP, et al. Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(15):2473-2481.
194. McCullough AE, Dell'orto P, Reinholz MM, et al. Central pathology laboratory review of HER2 and ER in early breast cancer: an ALTTO trial [BIG 2-06/NCCTG N063D (Alliance)] ring study. *Breast cancer research and treatment.* 2014;143(3):485-492.
195. Viale G, Regan MM, Maiorano E, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2007;25(25):3846-3852.
196. Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, et al. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *Journal of the National Cancer Institute.* 2006;98(21):1571-1581.
197. Gonzalez-Angulo AM, Hernández AL, Zheng X, et al. ConvertHER: Evolution of Genomic Alterations from Primary to Metastatic Breast Cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium 2014.* 2104.
198. Cejalvo JM, Dueñas EMD, Galván P, et al. Intrinsic subtype and gene expression changes between primary and metastatic breast cancer. *in press.* 2017.
199. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11(2):155-168.
200. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2007;25(1):118-145.
201. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-174.
202. Badiella Busquets L, P. Marino A, eds. *Cálculo del tamaño muestral (TM) con el programa Ene 2.0; manual del programa, documentación y ejemplos.* Ene-CTM ed. Madrid 2005.
203. Kamby C, Rasmussen BB, Kristensen B. Oestrogen receptor status of primary breast carcinomas and their metastases. Relation to pattern of spread and survival after recurrence. *Br J Cancer.* 1989;60(2):252-257.
204. Brennan MJ, Donegan WL, Appleby DE. The variability of estrogen receptors in metastatic breast cancer. *Am J Surg.* 1979;137(2):260-262.

205. Puztai L, Viale G, Kelly CM, Hudis CA. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist*. 2010;15(11):1164-1168.
206. Li BD, Byskosh A, Molteni A, Duda RB. Estrogen and progesterone receptor concordance between primary and recurrent breast cancer. *J Surg Oncol*. 1994;57(2):71-77.
207. Simmons C, Miller N, Geddie W, et al. Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2009;20(9):1499-1504.
208. Thompson AM, Jordan LB, Quinlan P, et al. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast Cancer Res*. 2010;12(6):R92.
209. Houssami N, Macaskill P, Balleine RL, Bilous M, Pegram MD. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact? Insights through meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2011;129(3):659-674.
210. Curigliano G, Bagnardi V, Viale G, et al. Should liver metastases of breast cancer be biopsied to improve treatment choice? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(10):2227-2233.
211. Wilking U, Karlsson E, Skoog L, et al. HER2 status in a population-derived breast cancer cohort: discordances during tumor progression. *Breast cancer research and treatment*. 2011;125(2):553-561.
212. Darvishian F, Singh B, Krauter S, Chiriboga L, Gangi MD, Melamed J. Impact of decalcification on receptor status in breast cancer. *Breast J*. 2011;17(6):689-691.
213. Karlsson E, Appelgren J, Solterbeck A, Bergenheim M, Alvariza V, Bergh J. Breast cancer during follow-up and progression - A population based cohort on new cancers and changed biology. *European journal of cancer*. 2014;50(17):2916-2924.
214. Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, et al. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(7):1938-1946.
215. Sari E, Guler G, Hayran M, Gullu I, Altundag K, Ozisik Y. Comparative study of the immunohistochemical detection of hormone receptor status and HER-2 expression in primary and paired recurrent/metastatic lesions of patients with breast cancer. *Med Oncol*. 2011;28(1):57-63.
216. Duchnowska R, Dziadziuszko R, Trojanowski T, et al. Conversion of epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor expression in breast cancer metastases to the brain. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):R119.
217. Zhang N, Moran MS, Huo Q, Haffty BG, Yang Q. The hormonal receptor status in breast cancer can be altered by neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *Cancer Invest*. 2011;29(9):594-598.
218. Niiikura N, Tomotaki A, Miyata H, et al. Changes in tumor expression of HER2 and hormone receptors status after neoadjuvant chemotherapy in 21,755 patients from the Japanese breast cancer registry. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2016;27(3):480-487.
219. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(19):3032-3038.
220. Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(9):2584-2589.

221. Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, et al. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(1):101-108.
222. Hoefnagel LD, Moelans CB, Meijer SL, et al. Prognostic value of estrogen receptor alpha and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Cancer*. 2012;118(20):4929-4935.
223. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(25):2961-2968.
224. Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;126(3):589-598.
225. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine*. 2012;366(10):883-892.
226. Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):395-399.
227. Seol H, Lee HJ, Choi Y, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol*. 2012;25(7):938-948.
228. Ng CK, Martelotto LG, Gauthier A, et al. Intra-tumor genetic heterogeneity and alternative driver genetic alterations in breast cancers with heterogeneous HER2 gene amplification. *Genome Biol*. 2015;16:107.
229. Janiszewska M, Liu L, Almendro V, et al. In situ single-cell analysis identifies heterogeneity for PIK3CA mutation and HER2 amplification in HER2-positive breast cancer. *Nat Genet*. 2015;47(10):1212-1219.
230. Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*. 2010;464(7291):999-1005.
231. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):994-1007.
232. Moelans CB, van der Groep P, Hoefnagel LD, et al. Genomic evolution from primary breast carcinoma to distant metastasis: Few copy number changes of breast cancer related genes. *Cancer Lett*. 2014;344(1):138-146.
233. Cohen O, Kim D, Buendia J, et al. Whole exome and transcriptome sequencing of resistant ER+ metastatic breast cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium 2016*. 2016.
234. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(5):537-543.
235. Rugo HS, Rumble RB, Macrae E, et al. Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(25):3069-3103.
236. Untch M, Augustin D, Ettl J, et al. ABC3 Consensus Commented from the Perspective of the German Guidelines: Third International Consensus Conference for Advanced Breast Cancer (ABC3), Lisbon, 07. 11. 2015. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2016;76(2):156-163.
237. de Duenas EM, Hernandez AL, Zotano AG, et al. Prospective evaluation of the conversion rate in the receptor status between primary breast cancer and metastasis: results from the GEICAM 2009-03 ConvertHER study. *Breast cancer research and treatment*. 2014;143(3):507-515.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1. Aprobación por el CEIC de referencia

28/10/2009 03:18 964354329

HOSPITAL PROVINCIAL

PAG. 01/01

espacio sin humo
 espai sense fum



Consorcio Hospitalario
 Provincial de Castellón

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D^a EVA FELIP VICIANO, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón.

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado en fecha **30 de septiembre de 2009** la propuesta del promotor Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM), para que se realice el Estudio multicéntrico, prospectivo, observacional y epidemiológico, código **CONVERTHER/GEICAM 2009-03**, titulado:

"Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis" (Protocolo versión final de 7 de agosto de 2009). Investigador Principal y Coordinador: **Dr. Eduardo Martínez de Dueñas**.

El Comité considera que el estudio se plantea siguiendo los requisitos del **Real Decreto 1344/2007, de 11 de octubre** que regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y las normas que lo desarrollan y su realización es pertinente.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del estudio en relación con los objetivos del mismo y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.

La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto este Comité emite Informe Favorable y acepta que dicho estudio, sea realizado en el Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón por el **Dr. Eduardo Martínez de Dueñas, del Servicio de Oncología**.

Lo que firmo en Castellón a 30 de septiembre de 2009

Fdo. Eva Felip Viciano



espacio sin humo
 espai sense fum



Consorcio Hospitalario
 Provincial de Castellón

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Da **EVA FELIP VICIANO**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón.

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado en fecha **4 de mayo de 2011**, la enmienda nº 1 versión 1.0 de 30 de marzo de 2011, al protocolo código: **CONVERTHER/GEICAM 2009-03**

Titulado:

"Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis"

Propuesta del promotor GEICAM. Investigador Principal: **Dr. Eduardo Martínez de Dueñas**.

El Comité considera que la enmienda del mencionado estudio cumple los requisitos necesarios de idoneidad del mismo en relación con sus objetivos y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados.

La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto este Comité acepta la enmienda a dicho estudio que será realizado en el Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón el **Dr. Eduardo Martínez de Dueñas** del Servicio de Oncología.

Lo que firmo en Castellón a 4 de mayo de 2011

Fdo. Eva Felip Viciano



NIF: P-6200007-J

www.hospital2000.net

Fbx: 964 354 301

Tel: 964 359 700

Avda. Dr. Clará 19, 12002 Castellón

G-ADMO-01

10.2. Listado de centros e investigadores participantes en el estudio CONVERTHER

HOSPITAL	INVESTIGADOR
H. Virgen de la Salud	Dr. José Ignacio Chacón
H. Son Llatzer	Dr. Gustavo Catalán
H. Clínico de Valencia	Dra. Ana Lluch Hernández
H. Ramón y Cajal	Dra. Noelia Martínez Jáñez
H. Clínic i Provincial de Barcelona	Dra. Monserrat Muñoz
H. Miguel Servet	Dr. Antonio Antón Torres
H. A Coruña	Dra. Silvia Antolin Bovo
Clínica Quirón Madrid	Dr. Ramón María Pérez Carrión
H. Sagunto	Dr. Antonio Galán Brotons
H. Arnau de Vilanova	Dr. Vicente Carañana
H. Insular de Gran Canarias	Dr. Adolfo Murias Rosales
H. de Jerez	Dr. Rubén del Toro Salas
H. General Universitario Guadalajara	Dr. Alberto Arcediano
Instituto Valenciano Oncología (IVO)	Dra. Amparo Ruiz
H. Virgen de los Lirios	Dra. Amparo Oltra
H. General Elda	Dra. Cristina Llorca
H. Clínico San Cecilio de Granada	Dra. Isabel Blancas López-Barajas
H. Clínico San Carlos	Dr. José Ángel García Sáenz
H. San Pedro de Alcántara	Dra. M ^a Helena López de Ceballos Reyna
H. Universitario La Fe	Dra. Marian Lavin
H. Virgen Macarena	Dr. Manuel Codes
H. Punta de Europa	Dr. Miquel Ruiz López de Tejada
H. Universitario Virgen de las Nieves	Dr. Salomón Menjón
H. Alcorcón	Dra. Clara Olier
H. Morales Messeguer	Dra. Elisa García
H. del Mar	Dr. Ignasi Tusquets
H. Severo Ochoa	Dr. M ^a José Echarri
Altahia	Dra. Ana Miguel
H. La Candelaria	Dra. Lioba Ferrera
H. Dr. Peset	Dra. Rosa Llorente
ICO Girona	Dr. Joan Dorca

10.3. Hoja de información al paciente

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título: “Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis”.

Código: CONVERTHER/GEICAM 2009-03.

Versión: Final, 7 de agosto de 2009.

Promotor: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM).

En el Servicio de Oncología del centro..... se está realizando un estudio en el que se le invita a participar después de que haya leído la información que se le facilita en estas páginas, y haya consultado y aclarado todas las dudas.

Pregunte a su médico cualquier duda, y solicítele cualquier aclaración que considere necesaria, para que pueda decidir de forma libre y con la información necesaria, si quiere o no participar en este estudio.

El cáncer de mama constituye una de las patologías de mayor relevancia en la actualidad. Sin embargo, ciertos aspectos de esta enfermedad tales como el desencadenamiento y regulación del crecimiento del tumor no se encuentran totalmente esclarecidos aún. En este sentido, se han identificado determinados componentes del tumor tales como el llamado receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y los receptores hormonales de estrógenos (RE) y progestágenos (RPg) que se encuentran involucrados en el mismo. Además, se ha detectado que podrían producirse cambios en la expresión de HER2 y de los receptores de estrógenos y progestágenos, pudiendo ocurrir que no exista expresión aumentada en el tumor primario y sí en las metástasis, o viceversa. Esta conversión, podría estar relacionada con la evolución de la enfermedad, puesto que podría asociarse al aumento de la agresividad del tumor e implicar una modificación del tratamiento. Sin embargo, la información disponible en la actualidad acerca de los pacientes con una modificación de estos componentes en el tumor primario y en las metástasis es todavía limitada.

Para poder profundizar en este ámbito del cáncer de mama, se ha diseñado el presente estudio en el que le proponemos participar.

Su médico le ha solicitado la realización de una biopsia de una lesión que le ha sido descubierta pero cuya naturaleza debe ser aún aclarada, para descartar su posible relación con el tumor de mama que se le diagnosticó con anterioridad.

Su participación en el estudio consistiría en autorizar la obtención de determinados datos clínicos de su historia clínica y en autorizar el análisis de una muestra sobrante de la lesión que le van a biopsiar junto a un fragmento de su tumor de mama inicial en un laboratorio central para comprobar posibles cambios en los receptores HER2, RE y RPg en la lesión biopsiada respecto al tumor de mama inicial. Los resultados de esta investigación podrían ayudarnos a esclarecer el proceso de cambio de esta activación del receptor HER2 en el tumor primario y en las metástasis.

Pacientes participantes en el estudio

Se prevé una participación de 175 pacientes en el estudio.

Procedimientos del estudio

La primera visita del estudio se denomina “Visita de registro” y coincidirá con el seguimiento habitual que realiza su médico. Esta visita será la visita en la que acceda a participar en el estudio y en la que se considerará como incluida en el mismo. Posteriormente, se realizarán las visitas de seguimiento. La primera de las visitas de seguimiento se denominará “Visita de seguimiento 1” y será realizada varias semanas después de su inclusión en el estudio, tras la realización de la biopsia. Las visitas de seguimiento posteriores se llevarán a cabo aproximadamente cada 6 meses, coincidiendo con el seguimiento habitual que realiza su médico y será el mismo que si no participara en el estudio.

La información necesaria para el estudio será recogida de su historia clínica y de las entrevistas que mantenga con su médico del estudio. Además, del remanente de la muestra del tumor primario y de la biopsia que se le ha tomado en su centro como parte de su seguimiento habitual, se enviará una fracción a un laboratorio central (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, cuyos responsables serán los patólogos OB y JF) para el análisis de los receptores HER2 y de los receptores hormonales (de estrógenos y progestágenos). Las muestras serán identificadas únicamente por un número (un número que será asignado a usted como identificador), no apareciendo datos personales suyos. Una vez analizadas, dichas muestras serán devueltas a su centro. Tendrá derecho a conocer los datos obtenidos de este análisis centralizado de la

muestra, si así lo desea. En el caso de que existan posteriores recaídas locales y se proceda a la realización de una biopsia de la lesión según la práctica clínica habitual de su centro, si el investigador lo considerara oportuno, existirá la posibilidad proceder del modo descrito anteriormente en el análisis del estado de los receptores en la metástasis biopsiada.

Beneficios y riesgos de la participación en el estudio

Usted será tratado según la práctica clínica habitual de su médico. No existen beneficios específicos relacionados con su participación, ni tampoco tendrá un riesgo adicional diferente al que de por sí tiene con su enfermedad. El beneficio del estudio proviene de la obtención de datos que completarán el conocimiento de la enfermedad. Hecho que podrá ser usado, por la comunidad científica y médica, para establecer nuevas investigaciones y medidas terapéuticas, que redundará, finalmente, en una mejora asistencial de los pacientes con cáncer de mama.

Carácter voluntario de la participación

Si decide participar en este estudio se le pedirá que firme un formulario de consentimiento escrito.

Si después de pensarlo, decide no participar en el estudio, o una vez que está participando posteriormente cambia de idea, por favor, informe a su médico. Es usted quien tiene que tomar libremente la decisión de participar o no, y su médico no tomará partido respecto a la decisión que tome, ni juzgará su decisión. Si elige no participar o abandonar el estudio después de decidir su participación (incluida la posibilidad de la destrucción o de anonimización de las muestras, y de que efectos no se extiendan a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo), no tendrá que explicar los motivos que le han llevado a tomar esa decisión, y se le ofrecerá el tratamiento que su médico piense que se adecua mejor y la misma calidad asistencial.

Su participación, por tanto, es de carácter voluntario y si decide retirarse del estudio no se alterará su relación con los médicos, ni se producirá ningún perjuicio en su seguimiento clínico ni en su tratamiento.

También el promotor podrá terminar el estudio, durante el desarrollo del mismo.

Confidencialidad de los datos personales

Toda la información relativa al paciente será tratada de forma estrictamente confidencial. El paciente sólo será identificado por un número. El tratamiento de los datos de carácter personal requeridos en este ensayo se rige por la Ley Orgánica 15/1999. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer el derecho de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. La información obtenida de este estudio no podrá ser revelada a ninguna persona sin su consentimiento por escrito, excepto a su médico o sus colaboradores, al promotor del estudio o sus representantes, a los Comités Éticos de Investigación Clínica de los hospitales donde se esté realizando el estudio y, en el caso de que se requiera, a las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas.

Los expertos autorizados del promotor podrán supervisar la realización del estudio a través de la denominada monitorización o auditoria, para que puedan confirmar que la información recogida durante el estudio es exacta. Estos expertos, así como los miembros de las autoridades, tienen el derecho de inspeccionar los datos médicos originales (historia médica, datos de laboratorio, etc.) del paciente. Pero siempre se mantendrá la confidencialidad de los datos según la legislación vigente.

En la práctica, la transmisión de la información se hará de forma que no permita identificar al paciente. El médico y sus colaboradores en el estudio transmitirán la información a la compañía Dynamic Solutions S.L., propietaria del fichero de datos registrado en la Agencia de Protección de Datos, y al promotor del mismo. Los datos serán finalmente registrados en la base de datos central serán propiedad del promotor. Es posible que esta información se transmita a países que carezcan de leyes similares a las nuestras para proteger la información, sin embargo, el promotor pondrá todos los medios para preservar la confidencialidad de los datos.

Los resultados obtenidos en este estudio se usarán para presentaciones o publicaciones científicas. En el caso de que los resultados de este estudio se publicasen, el nombre del paciente no será nunca mencionado. En dichas publicaciones o presentaciones se mantendrá la confidencialidad de los datos, de acuerdo con la Ley Orgánica de protección de datos de carácter personal 15/1999, de 13 de diciembre.

Debe saber que este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético y que se realizará cumpliendo la legislación europea y española vigente para este tipo de estudios.

Persona de contacto.

Durante todo el estudio podrá formular cualquier pregunta que tenga. Si tiene algún problema o más preguntas sobre el estudio, póngase en contacto con la persona indicada a continuación:

Nombre:

Dirección:

Teléfono:

10.4. Consentimiento informado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título: "Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis".

Código: CONVERTHER/GEICAM 2009-03.

Versión: Final, 7 de agosto de 2009.

Promotor: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM).

Yo,

(nombre y apellidos del paciente)

ha recibido la información contenida en la hoja de información al paciente sobre el estudio titulado "Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis".

- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con el doctor.....

Comprendo que mi decisión sobre la participación en el estudio es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Entiendo que, al acceder a participar en este estudio, consiento en la recogida, tratamiento, cesión y transferencia (si procede) de mis datos personales, con respeto del anonimato para fines de atención sanitaria y/o investigación médica.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y que mis datos puedan ser utilizados con fines de investigación.

Recibiré una copia firmada de la hoja de información y del consentimiento informado.

.....
Nombre y apellidos del paciente (en mayúsculas)

Firma del paciente:

____/____/____
Fecha

.....
Nombre y apellidos del investigador (en mayúsculas)

Firma del investigador

____/____/____
Fecha

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Título: "Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis".

Código: CONVERTHER/GEICAM 2009-03.

Versión: Final, 7 de agosto de 2009.

Promotor: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM).

Yo,

(nombre y apellidos del testigo imparcial)

confirmando que el paciente

(nombre y apellidos del paciente)

ha recibido la información contenida en la hoja de información al paciente sobre el estudio titulado "Evaluación del grado de conversión del receptor HER2 entre el cáncer de mama primario y sus metástasis".

- Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.
- Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
- Ha hablado con el doctor.....

Comprende que su decisión sobre la participación en el estudio es voluntaria. Comprende que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Entiende que, al acceder a participar en este estudio, consiente en la recogida, tratamiento, cesión y transferencia (si procede) de sus datos personales, con respeto del anonimato para fines de atención sanitaria y/o investigación médica.

Presta libremente su conformidad para participar en el estudio y que sus datos puedan ser utilizados con fines de investigación.

Recibirá una copia firmada de la hoja de información y del consentimiento informado.

.....
Nombre y apellidos del testigo imparcial (en mayúsculas)

Firma del testigo imparcial

____/____/____
Fecha

.....
Nombre y apellidos del investigador (en mayúsculas)

Firma del investigador

____/____/____
Fecha

10.5. Publicación

El estudio CONVERTHER en que se ha basado la presente tesis fue publicado en *Breast Cancer Research and Treatment* en 2014.²³⁷

Breast Cancer Res Treat (2014) 143:507–515
DOI 10.1007/s10549-013-2825-2

CLINICAL TRIAL

Prospective evaluation of the conversion rate in the receptor status between primary breast cancer and metastasis: results from the GEICAM 2009-03 ConvertHER study

Eduardo Martínez de Dueñas · Ana Lluç Hernández · Ángel Guerrero Zotano · Ramón María Pérez Carrión · José Ignacio Chacón López-Muñiz · Silvia Antolín Novoa · Ángela López Rodríguez · José Alejandro Pérez Fidalgo · Jaime Ferrer Lozano · Octavio Burgués Gasión · Eva Carrasco Carrascal · Andrés Hernando Capilla · Isabel Blancas López-Barajas · Montserrat Muñoz Mateu · María Helena López de Ceballos Reyna · Amparo Oltra Ferrando · Noelia Martínez Jañez · Vicente Carañana Ballerini · Antonio Antón Torres · Gustavo Catalán · José Ángel García Sáenz · Salomón Menjón · Ana María González-Angulo

Received: 3 December 2013 / Accepted: 23 December 2013 / Published online: 11 January 2014
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The objective of this study was to determine the conversion rate of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) between primary tumors and metastatic lesions in advanced breast cancer. Patients with suspected diagnosis of locally recurrent or metastatic breast cancer, either at first relapse or after successive disease progressions, who had an

appropriately preserved sample from a primary tumor and were scheduled for a biopsy of the recurrent lesion, were included. Blinded determinations of receptor status on paired samples were performed by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization at a central laboratory and compared with those performed locally. Overall, 196 patients were included and 184 patients were considered evaluable. Reasons for non-evaluability included the inability to perform biopsy ($n = 4$) or biopsy results showing normal tissue ($n = 3$), benign disease ($n = 3$) or a

Presented in part as a Poster at the 34th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) on December 6–11, 2011.

E. M. de Dueñas · Á. L. Rodríguez
Hospital Provincial de Castellón, Avda. Doctor Clara, 19,
12002 Castellón de la Plana, Spain

A. L. Hernández (✉) · J. A. P. Fidalgo ·
J. F. Lozano · O. B. Gasión
Hematology and Medical Oncology Department, INCLIVA
Biomedical Research Institute, Hospital Clínico de Valencia,
Avda. Blasco Ibáñez, 17, 46011 Valencia, Spain
e-mail: lluch_ana@gva.es

Á. G. Zotano
Instituto Valenciano de Oncología, c/Estrella, 3, 46007 Valencia,
Spain

R. M. P. Carrión
Clínica Quirón, c/Juan Bravo, 39, 28006 Madrid, Spain

J. I. C. López-Muñiz
Hospital Virgen de la Salud, Avda. de Barber, 30, 45071 Toledo,
Spain

S. A. Novoa
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, c/As Xubias, 84,
15006 A Coruña, Spain

E. C. Carrascal · A. H. Capilla
GEICAM (Grupo Español de Investigación en Cáncer de
Mama), Avda. de los Pirineos, 7. Oficina 1–14,
28700 San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain

I. B. López-Barajas
Hospital Clínico San Cecilio, Avda. Doctor Oloriz, 16,
18012 Granada, Spain

M. M. Mateu
Hospital Clínic i Provincial, c/Carrer Villarroel, 170,
08036 Barcelona, Spain

M. H. L. de Ceballos Reyna
Hospital San Pedro de Alcántara, Avda. Pablo Naranjo, s/n,
10003 Cáceres, Spain

A. O. Ferrando
Hospital Virgen de los Lirios, c/Caramanxel, s/n, 03804 Alcoy,
Alicante, Spain

N. M. Jañez
Hospital Universitario Ramón y Cajal, c/San Modesto, 50,
28034 Madrid, Spain

 Springer