

**IMPACTO DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE  
BIOMARCADORES, UTILIZADOS PARA LA CLASIFICACIÓN  
DEL CÁNCER DE MAMA EN SUBTIPOS INTRÍNSECOS,  
ASOCIADO AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL  
PRONÓSTICO DE MUJERES COLOMBIANAS  
DIAGNOSTICADAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE  
CANCEROLOGÍA ENTRE LOS AÑOS 2013-2015**



**Laura Rey Vargas**

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencias Biológicas  
Bogotá, Colombia  
2020**

**IMPACTO DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE  
BIOMARCADORES, UTILIZADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL  
CÁNCER DE MAMA EN SUBTIPOS INTRÍNSECOS, ASOCIADO AL  
TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL PRONÓSTICO DE  
MUJERES COLOMBIANAS DIAGNOSTICADAS EN EL INSTITUTO  
NACIONAL DE CANCEROLOGÍA ENTRE LOS AÑOS 2013-2015**

**Laura Rey Vargas**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de  
Máster en Ciencias Biológicas

**Director**

**Silvia Juliana Serrano, MSc, PhD**

Grupo de Investigación en Biología del Cáncer  
Instituto Nacional de Cancerología, E.S.E

**Codirector**

**Adriana Patricia Rojas, MSc, PhD**

Instituto de Genética Humana  
Pontificia Universidad Javeriana

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

**Maestría en Ciencias Biológicas**

**Bogotá, Colombia**

**2020**

**IMPACTO DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES,  
UTILIZADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN  
SUBTIPOS INTRÍNSECOS, ASOCIADO AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE  
EN EL PRONÓSTICO DE MUJERES COLOMBIANAS DIAGNOSTICADAS EN  
EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA ENTRE LOS AÑOS 2013-2015**

**Laura Rey Vargas**

Aceptación del trabajo de grado  
Directores y jurados

**Silvia Juliana Serrano, MSc, PhD**  
Director

**Adriana Patricia Rojas, MSc, PhD**  
Codirector

**Andrés Felipe Aristizábal**  
Jurado

**Ricardo Elías Brugés**  
Jurado

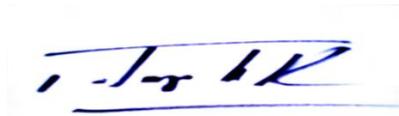
**Rafael Parra Medina**  
Jurado

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencias Biológicas  
Bogotá, Colombia  
2020**

**IMPACTO DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES,  
UTILIZADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN  
SUBTIPOS INTRÍNSECOS, ASOCIADO AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE  
EN EL PRONÓSTICO DE MUJERES COLOMBIANAS DIAGNOSTICADAS EN  
EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA ENTRE LOS AÑOS 2013-2015**

**Laura Rey Vargas**

Aceptación del trabajo de grado  
Decana y Directora del programa



---

Alba Alicia Trespalacios Rangel, Ph.D.  
Directora de Posgrados  
Facultad de Ciencias



---

Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D.  
Decana  
Facultad de Ciencias

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias Maestría  
en Ciencias Biológicas Bogotá,  
Colombia  
2020**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**Artículo 23 de la Resolución No.13 de 1946**

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana por brindarme la oportunidad de formarme en su institución como profesional y persona, y por permitirme conocer y aprender de sus profesores durante este proceso.

Agradezco al Instituto Nacional de Cancerología, y específicamente al grupo de Biología del cáncer, por abrirme sus puertas y permitirme trabajar con ellos. Agradezco especialmente a las doctoras Silvia Serrano y Carolina Sanabria, por depositar su confianza en mí para sacar adelante este y otros proyectos en el camino.

Agradezco a mi codirectora, la doctora Adriana Rojas, por acompañarme durante este proceso desde el pregrado, y seguirme guiando por el camino de la investigación.

Agradezco a mis papas y hermana por toda la paciencia y apoyo incondicional que he recibido de ellos durante estos años.

Agradezco a mis amigos, con los que afortunadamente he podido contar durante este tiempo, porque a pesar de todas las dificultades que se han presentado, me han permitido disfrutar del proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
3.1 Objetivo general .....	5
3.2 Objetivos específicos .....	5
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>5</b>
<b>5. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
5.1 Biomarcadores de clasificación del cáncer de mama.....	6
5.1.1 Receptor de estrógeno.....	6
5.1.2 Receptor de progesterona .....	7
5.1.3 Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2).....	8
5.2 Clasificación del cáncer de mama en subtipos moleculares.....	8
5.2.1 Subtipos luminales A y B .....	8
5.2.2 Subtipo HER2-enriquecidos (HER2-E).....	9
5.2.3 Subtipo triple negativo (TN) .....	10
5.3 Clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos, para la práctica clínica .....	10
5.4 Características clínico-patológicas del cáncer de mama.....	12
5.4.1 Diagnóstico del cáncer de mama .....	12
5.4.1.1 Clasificación histológica.....	12
5.4.1.2 Grado tumoral .....	13
5.4.1.3 Tamaño tumoral y sistema de estadificación TNM .....	13
5.4.1.4 Invasión histológica.....	13
5.4.1.5 Márgenes quirúrgicos.....	14

5.5	Opciones terapéuticas para el manejo del cáncer de mama.....	15
5.5.1	Manejo quirúrgico.....	15
5.5.2	Radioterapia .....	17
5.5.3	Manejo farmacológico.....	17
5.5.3.1	Terapia hormonal.....	18
5.5.3.2	Quimioterapia citotóxica.....	19
5.5.3.3	Terapia biológica .....	20
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>23</b>
6.1	Diseño del estudio.....	23
6.2	Definición de los sujetos de estudio.....	23
6.3	Cálculo de tamaño de muestra.....	23
6.4	Métodos de recolección de la información .....	24
6.4.1	Revisión de la información clínica.....	24
6.4.2	Inmunohistoquímica .....	25
6.4.3	Flujograma de los procedimientos .....	26
6.4.4	Variables de estudio.....	27
6.5	Plan de análisis estadístico por objetivo específico.....	29
6.6	Consideraciones éticas .....	32
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
7.1	Características clínico-patológicas .....	33
7.2	Expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto de cirugía de mama .....	35
7.3	Objetivo específico 1. Evaluar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con la administración de tratamiento neoadyuvante .....	36
7.3.1	Grupo sin NAT .....	36
7.3.2	Diferencias en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en casos sin NAT, evaluados por el mismo patólogo. ....	41
7.3.3	Grupo con NAT.....	42
7.4	Objetivo específico 2. Determinar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con el esquema neoadyuvante recibido.....	45
7.4.1	Esquema hormonal .....	45
7.4.2	Esquema citotóxico.....	45

7.4.3	Esquema citotóxico + trastuzumab .....	46
7.4.4	Esquema combinado .....	46
7.5	Objetivo específico 3. Analizar si los cambios en la expresión de los biomarcadores están asociados con diferencias en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama .....	48
7.5.1	Supervivencia global y libre de recurrencia.....	48
7.5.1.1	Grupo con NAT .....	48
7.5.1.2	Grupo sin NAT .....	51
7.5.2	Riesgo de mortalidad y recurrencia .....	52
7.5.2.1	Selección de variables clínico-patológicas .....	52
7.5.2.2	Análisis de riesgo según el cambio en la expresión de los biomarcadores.....	53
7.5.2.3	Variación en el grado de diferenciación tumoral de acuerdo con cambio de Ki67 .....	55
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>65</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>66</b>
<b>6.2</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>91</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterios de clasificación de los tumores de mama en subtipos intrínsecos, según el panel de St. Gallen del 2013 (82).....	11
<b>Tabla 2.</b> Variables clínico-patológicas incluidas en el estudio .....	27
<b>Tabla 3.</b> Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Estatus de los biomarcadores de mama de acuerdo con el tejido evaluado	36
<b>Tabla 5.</b> Cambio en el estatus de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico, en los grupos sin NAT y con NAT .....	37
<b>Tabla 6.</b> Cambios en la clasificación de los tumores en subtipos intrínsecos de acuerdo con los criterios establecidos en el panel de St. Gallen del 2013 (82), en muestras de biopsia y producto quirúrgico, en los grupos sin NAT y con NAT. ....	38
<b>Tabla 7.</b> Cambios en el estatus del biomarcador Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, en los grupos sin NAT y con NAT. ....	42
<b>Tabla 8.</b> Cambios en el estatus de HER2 en muestras de biopsia y producto de cirugía, en los grupos sin NAT y con NAT .....	43
<b>Tabla 9.</b> Cambios en estatus de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico, de acuerdo con el esquema de NAT recibido .....	47
<b>Tabla 10.</b> Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico, de acuerdo con el esquema de NAT recibido .....	47
<b>Tabla 11.</b> Modelo de riesgo proporcional de Cox univariado para la SG y SLR en las variables clínico-patológicas de pronóstico. ....	52
<b>Tabla 12.</b> Modelo de riesgo proporcional de Cox univariado para la SG y SLR en los grupos con ganancia y pérdida de los biomarcadores, según la administración de NAT. ....	54
<b>Tabla 13.</b> Modelo de riesgo proporcional de Cox univariado y multivariado para la SLR, de	

acuerdo con el cambio en la expresión del biomarcador Ki67, en el grupo con NAT.	55
<b>Tabla 14.</b> Cambio en el grado de diferenciación tumoral según la escala Scarff–Bloom–Richardson, de acuerdo con la pérdida y ganancia del Ki67 en el grupo con NAT.	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flujograma de los procedimientos realizados a lo largo del proyecto .....	26
<b>Figura 2.</b> Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en las biopsias y el producto quirúrgico en el grupo de casos sin NAT. RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.....	40
<b>Figura 3.</b> Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en las biopsias y el producto quirúrgico en el grupo de casos sin NAT, evaluados por un mismo patólogo. RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona. ....	41
<b>Figura 4.</b> Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico en el grupo con NAT. RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.....	44
<b>Figura 5.</b> Supervivencia global en los casos con pérdida y ganancia de expresión de los biomarcadores a) RP, b) HER2 y c) Ki67, en el grupo con NAT. RP: receptor de progesterona; NAT: neoadyuvancia. ....	49
<b>Figura 6.</b> Supervivencia libre de recurrencia en los casos con pérdida y ganancia de expresión de los biomarcadores a) RP, b) HER2 y c) Ki67, en el grupo con NAT. RP: receptor de progesterona; NAT: neoadyuvancia.....	50
<b>Figura 7.</b> Supervivencia global (a, b) y libre de recurrencia (c, d) en los casos con pérdida y ganancia de los biomarcadores HER2 (a, c) y Ki67 (b, d), en el grupo de casos sin NAT. NAT: neoadyuvancia.....	51
<b>Figura 8.</b> Ilustración de la selección clonal inducida por la NAT, asociado al cambio en la expresión de los biomarcadores de mama (182,183). RH: receptor hormonal. NAT: neoadyuvancia.....	59
<b>Figura 9.</b> Ilustración del mecanismo de endocitosis del receptor HER2 mediado por el anticuerpo monoclonal trastuzumab, y su degradación lisosomal, generando la pérdida en la expresión del receptor (189,190).....	60
<b>Figura 10.</b> Ilustración del efecto del muestreo durante la biopsia del tumor inicial en la evaluación del perfil de los biomarcadores de mama, y su clasificación en subtipos intrínsecos (193). RH: receptor hormonal.....	63

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Effect of neoadjuvant therapy on breast cancer biomarker profile.....	91
--	----

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el impacto del cambio en la expresión de los biomarcadores, utilizados para la clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos, asociado al tratamiento neoadyuvante en el pronóstico de pacientes con la enfermedad. **Metodología:** Se llevó a cabo un estudio retrospectivo en 337 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama. La población se agrupó en casos sin neoadyuvancia (NAT) (n=158) y con NAT (n=179), y de acuerdo con el esquema de tratamiento en NAT hormonal (n=10), citotóxica (n=122), citotóxica + trastuzumab (n=32) y combinada (hormonal + citotóxico, n= 15). Se evaluaron las diferencias en el estatus y el porcentaje de expresión por inmunohistoquímica (IHQ) del receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 y Ki67 entre muestras pareadas de biopsia y producto de la cirugía de mama. Adicionalmente, se analizaron las diferencias en la supervivencia global (SG) y libre de recurrencia (SLR) de acuerdo con la ganancia y pérdida de los biomarcadores, y finalmente se calculó el cociente de riesgo (HR) de acuerdo con las variaciones en el estatus de los biomarcadores, en los grupos con NAT y sin NAT. **Resultados:** Se reportaron disminuciones en el porcentaje de expresión del RP ( $p=0.0024$ ) y del Ki67 ( $p<0.001$ ) después de la NAT, específicamente asociados al esquema hormonal (RP:  $p= 0.01732$ , Ki67:  $p= 0.02154$ ) y citotóxico (RP:  $p= 0.02604$ , Ki67:  $p= 0.00736$ ). El esquema de NAT citotóxico + trastuzumab se asoció a la disminución en la positividad del HER2. La pérdida de expresión del Ki67 después de la NAT se encontró asociado con una mejor SG ( $p= 0.038$ ) y SLR ( $p= 0.0025$ ), así como con una reducción en el riesgo de recurrencia (HR: 0.12, 95% CI, 0.01–0.98,  $p=0.0483$ ), después de ajustar por variables clínico-patológicas. El análisis en el grupo sin NAT mostró cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de expresión del RE ( $p= 0.022$ ), asociados a la variabilidad inter- observador. **Conclusiones:** los resultados de este estudio sugieren que la NAT se encuentra asociada al cambio en la expresión de los biomarcadores de mama, especialmente del Ki67, y que este evento confiere menor riesgo de recurrencia. Otros factores como la variabilidad inter- observador también pueden estar asociados a la presentación de cambios en los biomarcadores de mama.

## ABSTRACT

**Aim of the study:** Assess the impact of the change of expression in breast cancer biomarkers, applied for intrinsic subtype classification, associated with neoadjuvant treatment (NAT) on the prognosis of Colombian patients with the disease. **Methods:** A retrospective study was conducted on 337 women diagnosed with breast cancer. The cohort was categorized according to therapy administration, in NAT group (n = 158) and no-NAT group (n = 179), and according to treatment scheme in hormonal (n = 10), cytotoxic (n = 122), cytotoxic + trastuzumab (n = 32) and combined NAT (hormonal + cytotoxic, n = 15). Changes in the status and percentage of expression by immunohistochemistry (IHC) were assessed for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, and Ki67 between paired core-needle biopsies and surgical samples. Additionally, differences in overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) were analyzed according to gain and loss of biomarkers, and finally, the hazard ratio (HR) for OS and RFS was calculated according to variations in the status of biomarkers, for each group. **Results:** A decrease were reported in the percentage of expression of PR (p = 0.0024) and Ki67 (p <0.001) after NAT, specifically associated with hormonal (PR: p = 0.01732, Ki67: p = 0.02154) and cytotoxic schemes (PR: p = 0.02604, Ki67: p = 0.00736). Cytotoxic + trastuzumab NAT scheme was associated with a decrease in HER2 positivity. Loss of Ki67 expression after NAT was associated with a better OS (p = 0.038) and RFS (p = 0.0025), as well as with a reduction in the risk of relapse, after adjusting for clinical-pathological variables. The analysis in the no-NAT group showed significant changes in the percentage of ER expression (p = 0.022), which was later associated with interobserver variability. **Conclusions:** Our results suggest that NAT is associated with changes in biomarkers expression, especially in Ki67, and that this event confers a lower risk of relapse. Other factors such as interobserver variability may also be associated with changes in breast cancer biomarker profile.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en mujeres, en Colombia y a nivel mundial (1,2). Esta enfermedad se caracteriza por ser altamente heterogénea en cuanto a su presentación clínica, patológica y molecular (3,4). Estudios de expresión génica en tumores de mama han permitido la identificación de 5 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2)-enriquecido, triple negativo (TN) y de tipo normal (Normal-like), cada uno con un comportamiento clínico y pronóstico diferente (5,6). Actualmente su identificación en la práctica clínica se lleva a cabo mediante la evaluación de algunos de los biomarcadores más representativos por inmunohistoquímica (IHQ), como lo son el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 y el marcador de proliferación celular Ki67 (7–9). La implementación de la evaluación de estos marcadores ha permitido identificar pacientes candidatos para recibir tratamiento con inhibidores de los receptores hormonales (ej. tamoxifeno) e inhibidores del receptor tirosina-quinasa (TK) HER2 (ej. trastuzumab, pertuzumab) (10).

La neoadyuvancia (NAT) es una valiosa estrategia en el tratamiento del cáncer de mama avanzado, dado que por su efecto en la reducción del tamaño tumoral, ofrece la posibilidad a las pacientes de ser sometidas a cirugías conservadoras de mama (11,12). Adicionalmente, puede disminuir el estadio clínico, eliminar posibles micrometástasis, y le brinda la oportunidad al oncólogo de monitorear la respuesta del tumor a diferentes esquemas de tratamiento (11–13). Múltiples estudios han reportado que la NAT podría modificar el perfil de los biomarcadores utilizados para la clasificación del cáncer de mama en subtipos (RE, RP, HER2 y Ki67), luego de comparar su expresión en muestras pareadas pre- y post-tratamiento (14–17). Por otro lado, otros estudios aseguran que la discordancia reportada en el perfil de los biomarcadores en muestras pareadas también podría ser explicada por factores como falsos positivos y negativos, variabilidad inter-evaluador y heterogeneidad intratumoral (18,19). Adicionalmente, los estudios donde se reportan cambios significativos en su expresión después del tratamiento, aseguran que este evento está asociado a diferencias en la supervivencia de la enfermedad (20–22). Dado el importante valor pronóstico que tienen los biomarcadores de cáncer de mama y su utilidad para guiar el tratamiento de la enfermedad, la pregunta de investigación de este proyecto es: ¿Cuál es el impacto del cambio en la expresión de los biomarcadores, utilizados para la

clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos, asociado al tratamiento neoadyuvante en el pronóstico de las mujeres colombianas?

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el cáncer de mama en Colombia es considerado una problemática de salud pública, con cerca de 71.000 nuevos casos diagnosticados cada año y 2.200 muertes (23). Este representa el 13,1% del total de los tumores diagnosticados en mujeres en Colombia (2). De acuerdo con los datos reportados por Globocan, la mortalidad por cáncer de mama en nuestro país ha venido en aumento durante los últimos años (1). En el 2013 se reportó un valor ajustado de mortalidad de 9,83 por cada 100.000 habitantes, y en el 2018 esta cifra alcanzó un valor de 11,9 por cada 100.000 habitantes (24). Lo anterior resalta la necesidad de encontrar nuevas herramientas para evaluar el pronóstico de las pacientes, y así brindar terapias que se ajusten mejor al comportamiento de la enfermedad.

La evaluación de los cambios en la expresión de los biomarcadores de clasificación en subtipos intrínsecos, como consecuencia de la NAT, conllevaría a importantes implicaciones para la paciente, dado que según se ha reportado en otros estudios, este evento afecta el pronóstico de la enfermedad y podría generar cambios en el esquema de tratamiento (25–28). Por ende, implementar la reevaluación de los biomarcadores en el producto de la cirugía, le conferiría la oportunidad al oncólogo de reajustar el tratamiento y evaluar el pronóstico de sus pacientes.

Viendo este escenario desde otra perspectiva, la variación en el perfil de biomarcadores por la NAT también tendría importantes repercusiones económicas para las instituciones de salud con recursos limitados, como es el caso de algunas de las entidades sanitarias en Colombia, dada la necesidad de invertir el doble de presupuesto en dichas pruebas (29,30). De ahí la importancia de determinar si realmente la discordancia reportada en la expresión de los biomarcadores entre la biopsia y el producto quirúrgico es consecuencia de la NAT, o de otros factores como la heterogeneidad intratumoral, la variabilidad inter-evaluador o la insuficiente representación del tumor al momento del muestreo (14). Este estudio contribuirá a determinar si la reevaluación de los biomarcadores en el producto de la cirugía podría ser implementada como una estrategia para mejorar el manejo de las pacientes con cáncer de mama.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el impacto del cambio en la expresión de los biomarcadores, utilizados para la clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos, asociado al tratamiento neoadyuvante en el pronóstico de mujeres colombianas diagnosticadas en el Instituto Nacional de Cancerología entre los años 2013-2015.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con la administración de tratamiento neoadyuvante.
2. Determinar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con el esquema neoadyuvante recibido.
3. Analizar si los cambios en la expresión de los biomarcadores están asociados con diferencias en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.

### **4. HIPÓTESIS**

El cambio en la expresión de los biomarcadores, utilizados para la clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos, producto del tratamiento neoadyuvante, impacta significativamente el pronóstico de la enfermedad.

## **5. MARCO TEÓRICO**

### **5.1 Biomarcadores de clasificación del cáncer de mama**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, cuya complejidad se ve reflejada en los perfiles de expresión génica (4,31). Esto se reportó inicialmente en el trabajo de Perou y colaboradores (32) al evaluar los perfiles de expresión génica usando microarreglos de ADN copia (ADNc) para la detección de 8.102 genes en 65 muestras tumorales pertenecientes a 42 individuos. En este trabajo se identificaron 2 grandes grupos de tumores, los RE positivos (RE+) y RE negativos (RE-); en el primer grupo se ubican los tumores luminales, y en el segundo grupo los subtipos TN, HER2-enriquecido (HER2-E) y Normal-like. Análisis posteriores del mismo grupo de investigación en un mayor número de muestras identificaron que el subtipo luminal puede ser dividido a la vez en dos subgrupos, luminal A y luminal B, cada uno con un perfil molecular característico (6). Hoy en día los receptores hormonales RE y RP hacen parte de los biomarcadores evaluados en la práctica clínica para definir el tratamiento y evaluar el pronóstico de los pacientes (8,33).

#### **5.1.1 Receptor de estrógeno**

El RE es uno de los biomarcadores más importantes en cáncer de mama, dada la importante información que este brinda en cuanto a pronóstico y sensibilidad al tratamiento hormonal (34). El RE es un factor de transcripción dependiente de ligando, que regula la expresión de genes involucrados en procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis y migración celular, por ende, su desregulación está íntimamente asociada con la aparición de procesos tumorales (35). La señalización del RE esta mediada por dos isoformas, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , no obstante, se ha demostrado que la isoforma RE $\alpha$  es la responsable de la inducción de los procesos de proliferación y migración a través de mecanismos de señalización paracrina (35). Por el contrario, se ha reportado que el RE $\beta$  tiene funciones opuestas al RE $\alpha$ , principalmente asociadas al arresto del ciclo celular (36–38). La activación del RE $\alpha$  inicia con la unión del estrógeno a su receptor en el citoplasma; este proceso comprende dos vías de señalización: la genómica y la no genómica. En la primera el RE se dimeriza, se transloca al núcleo, y allí se une al ADN, específicamente a los elementos de respuesta al estrógeno (EREs), localizados cerca de la región promotora

de los genes blanco (39). En la vía no genómica se genera una señalización rápida mediada por segundos mensajeros, a partir de la interacción del RE con receptores tipo TK como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); esta interacción conlleva la activación de vías de proliferación como PI3K/Akt/mTOR y las MAPK-quinasas (40).

Los tumores RE+ comprenden aproximadamente el 75% de los casos de cáncer de mama. La prevalencia de estos varía de acuerdo con la edad, siendo más frecuentes en pacientes mayores de 50 años (34). Se ha documentado que la expresión del RE en el tejido normal se encuentra entre el 10% al 20% de las células mamarias, y que el aumento de este porcentaje se asocia con la aparición de lesiones proliferativas. Lo anterior sugiere que una mayor expresión del RE se asocia con un mayor riesgo a desarrollar procesos tumorales (41,42). No obstante, los tumores RE+ se caracterizan por tener una mejor diferenciación, y usualmente cuentan con un pronóstico más favorable, en comparación con los RE- (41).

### **5.1.2 Receptor de progesterona**

El RP es un marcador pronóstico importante en cáncer de mama, el cual se ha asociado con el desenlace de la enfermedad (43,44). Este es un factor de transcripción dependiente de ligando, que regula la expresión de genes asociados a procesos de desarrollo, diferenciación y proliferación celular (43–45). Así como el RE, la activación del RP también comprende dos vías, una genómica, en la cual el receptor dimerizado migra al núcleo para unirse a los elementos de respuesta a la progesterona (PREs), y otra no genómica, en la cual el RP interactúa con proteínas tipo quinasas como c-Src, y consecuentemente induce la activación de diferentes vías de señalización celular (46). Los tumores RP+ comprenden aproximadamente entre el 65% al 75% de los casos de cáncer de mama (47). A pesar de que la prevalencia de su expresión es menor que la del RE, la positividad del RP está fuertemente asociada a la de este último, por ende, son pocos los casos reportados que cuentan con un perfil RE-/RP+ (34,48). La expresión del RP también es útil para medir la respuesta al tratamiento hormonal; en los casos RE+/RP- se ha reportado una menor respuesta a la hormonoterapia y una mayor resistencia al tamoxifeno (49). En efecto, la expresión negativa del RP está asociada con una menor supervivencia libre de progresión (50).

### 5.1.3 Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2)

El HER2 es un receptor tipo TK de 185 kDa, codificado por el gen *ERBB2* ubicado en el locus q12 del cromosoma 17. Este hace parte de la familia de los receptores EGFR, donde también se encuentra HER1, HER3 y HER4. A diferencia de estas proteínas, el receptor HER2 no cuenta con un ligando propio, por lo que su actividad es dependiente de la activación previa de otros receptores TK, principalmente HER3 (51). La amplificación de *ERBB2* y consecuente sobreexpresión de HER2 se ha reportado en aproximadamente 10-15% de los casos de cáncer de mama (52). Este evento genera la acumulación de la proteína HER2 en la membrana celular, lo que llevará a que por cercanía esta pueda activarse de manera constitutiva y, así desencadenar una respuesta celular corriente abajo, bajo la actividad de proteínas quinasas y factores de transcripción asociados a proliferación celular como Ras/Raf/MAPK y PI3K/AKT/mTOR (52,53) Por ende, la amplificación del gen *ERBB2* se correlaciona con características de mal pronóstico como mayor tamaño tumoral, alto grado histológico y altas tasas de proliferación celular (52,54).

## 5.2 Clasificación del cáncer de mama en subtipos moleculares

### 5.2.1 Subtipos luminales A y B

Los resultados publicados por el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés) en el 2012, mostraron que los tumores luminales comprenden el grupo más heterogéneo. Dentro de estos se diferencian dos grandes subtipos: luminal A y luminal B. El primero se caracteriza por presentar alta expresión del gen del RE (*ESR1*) y otros genes relacionados como *GATA-3*, *X-box binding protein 1* y *LIV-1*; también cuentan con una baja tasa mutacional de *TP53* y baja expresión de genes asociados al clúster de proliferación. El subtipo luminal B se caracteriza por presentar menor expresión de *ESR1*, mayor expresión de genes asociados a proliferación celular como *MKI67*, *EGFR* y *ERBB2*, y mayor activación transcripcional de proteínas como c-MYC (5,54–56).

Los tumores luminales A usualmente son los de mayor prevalencia en la población general, no obstante, estudios en Latinoamérica, incluyendo Colombia, han reportado que el subtipo con mayor prevalencia en esta región es el luminal B (57–59). Los tumores luminales A se

caracterizan por la baja frecuencia de compromiso ganglionar, bajo tamaño tumoral y, como consecuencia, confieren el mejor pronóstico dentro de los subtipos del cáncer de mama (60,61). Por otro lado, los tumores luminales B cuentan con un comportamiento clínico más agresivo, e incluso su pronóstico ha sido equiparable al de los tumores RE- (62,63). Aproximadamente el 20% de estos tumores sobreexpresan el gen *ERBB2*, que codifica para el receptor HER2, un marcador de mal pronóstico para la enfermedad (62).

### **5.2.2 Subtipo HER2-enriquecidos (HER2-E)**

El cáncer de mama HER2-E se caracteriza por ser un subtipo que, a pesar de su baja prevalencia en la población general (10-15%), cuenta con un pronóstico desfavorable (64–66). Este comportamiento está dado principalmente por la sobreexpresión e hiperactivación del receptor HER2, el cual desencadena una respuesta proliferativa en la célula, como se mencionó anteriormente (64). Así mismo, de acuerdo con los resultados publicados por el TCGA, el subtipo HER2-E también se caracteriza por presentar una alta tasa mutacional en los genes *TP53* y *PIK3CA*, así como una alta frecuencia de la coamplificación con el gen *GRB7* (55).

Actualmente la supervivencia de estos pacientes ha mejorado drásticamente por la introducción de terapias dirigidas a HER2, que se administran en conjunto con agentes citotóxicos o, de manera dual, con anticuerpos y agentes bloqueadores de los dominios TK (66,67). Lo anterior enfatiza la importancia de llevar a cabo una lectura e interpretación acertada acerca del estado de expresión de este biomarcador, con el fin de definir con precisión los pacientes que se beneficiaran de la terapia anti-HER2. Inicialmente la evaluación de su estatus se lleva a cabo mediante técnicas de IHQ, donde se valora la intensidad de la tinción y el número de células tumorales positivas para esta. La hibridación fluorescente in situ (FISH) es la técnica confirmatoria en los casos donde la tinción por IHQ es inconclusa. Por medio del FISH, se analiza la amplificación del gen *ERBB2*, considerándose amplificado en tumores con 4-6 señales en promedio por célula, y una relación *ERBB2*/centrómero 17(CEP17) S2 (68). Estos criterios son ampliamente utilizados en la práctica clínica, no obstante, diferentes estudios han reportado una discordancia entre el estado de la amplificación del gen y la sobreexpresión de la proteína, un hecho que evidentemente tiene importantes implicaciones en la respuesta al tratamiento del paciente (69,70).

### 5.2.3 Subtipo triple negativo (TN)

El cáncer de mama TN, caracterizado por la falta de expresión de los receptores hormonales RE, RP y del receptor HER2 (71,72), fue descrito en el trabajo de Perou como un subtipo molecular con un perfil similar al de las células basales del epitelio mamario, las cuales se caracterizan por expresar marcadores como la citoqueratina (CK)-5, CK-17, integrina  $\beta$ 4, EGFR y laminina (32). Dentro del subtipo TN se ha reportado una alta heterogeneidad; esto se evidencia en los estudios donde se describe a la vez múltiples subgrupos moleculares dentro del subtipo de los TN (73,74). Dentro de estos, el grupo con mayor prevalencia corresponde al de tipo basal (55,72). La caracterización molecular reportada por el TCGA para este subtipo se hizo específicamente en tumores basales. Para estos se reportó una alta frecuencia de mutaciones en *TP53*, pérdida de *RB1* y *BRCA1*, junto con una alta expresión de genes de proliferación celular (55).

Las características moleculares del subtipo TN les confieren un comportamiento mucho más agresivo a las células tumorales, con mayor capacidad proliferativa y migratoria, en comparación con los demás subtipos. Actualmente, estos pacientes son manejados con fármacos citotóxicos, los cuales actúan bloqueando diferentes vías de proliferación celular de manera inespecífica (75). Dado que estos tumores no cuentan con terapias dirigidas como los demás subtipos, los pacientes con tumores TN presentan el pronóstico más desfavorable dentro de la población con cáncer de mama (6,76–78). Su presentación se asocia con mayor tamaño tumoral, alto grado histológico, compromiso ganglionar positivo, y baja tasa de supervivencia global (79).

## 5.3 Clasificación del cáncer de mama en subtipos intrínsecos para la práctica clínica

Hoy en día la clasificación de los tumores de mama en subtipos se lleva a cabo mediante la evaluación de la expresión proteica de algunos de los biomarcadores más informativos, por técnicas de IHQ, lo anterior con el fin de aproximarse a la clasificación molecular, y guiar el tratamiento de la enfermedad, de acuerdo con el perfil de expresión de estos biomarcadores (8,9).

En la actualidad se evalúa principalmente el RE, RP y el HER2. En algunos servicios médicos también se incluye el marcador de proliferación celular Ki67, una proteína nuclear

expresada durante el ciclo celular, y con expresión nula en la fase G0; este ha resultado particularmente útil para diferenciar los tumores luminales A de los luminales B (9,64). A este panel de 4 marcadores se le conoce como IHC4, y ya ha sido previamente validado para evaluar el pronóstico de la enfermedad (7,81).

El panel de expertos de St. Gallen (82) en el 2013 propuso los criterios para la clasificación de los tumores en subtipos intrínsecos, utilizando los 4 marcadores mencionados anteriormente, como una aproximación a la asignación del cáncer de mama en subtipos moleculares (Tabla 1). La implementación de esta clasificación en la práctica clínica ha permitido identificar fácilmente pacientes candidatos para recibir tratamiento con inhibidores de los receptores hormonales (ej. tamoxifeno) e inhibidores del receptor HER2 (ej. Trastuzumab, Pertuzumab) (10).

**Tabla 1.** Criterios de clasificación de los tumores de mama en subtipos intrínsecos, según el panel de St. Gallen del 2013 (82).

Subtipo intrínseco	Criterio
<b>Luminal A</b>	RE positivo
	RP positivo $\geq 20\%$
	HER2 negativo (0+/1+)
	Ki67 $< 20\%$
<b>Luminal B</b>	RE positivo
	HER2 negativo (0+/1+)
	<i>al menos una de las siguientes</i>
	RP positivo $< 20\%$
	Ki67 $\geq 20\%$
<b>Luminal B/HER2-positivo</b>	RE positivo
	HER2 positivo (3+)
	Cualquier expresión de RP y Ki67
<b>HER2-enriquecido</b>	RE negativo
	RP negativo
	HER2 positivo (3+)
	Cualquier expresión de Ki67
<b>Triple negativo</b>	RE negativo
	RP negativo
	HER2 negativo (0+/1+)
	Cualquier expresión de Ki67

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona

## **5.4 Características clínico-patológicas del cáncer de mama**

### **5.4.1 Diagnóstico del cáncer de mama**

El cáncer de mama es considerado por algunos, no como una sola enfermedad, sino como un conjunto de enfermedades que tienen lugar de origen en la glándula mamaria. Cada una de estas entidades cuenta con características particulares que le brindan un pronóstico diferencial al paciente (83). No obstante, el diagnóstico inicial del cáncer de mama se hace de manera homogénea en todos los pacientes. Este comprende una primera fase de revisión clínica, en la cual se evalúan síntomas como presencia de masas, dolor localizado, y cambios en la piel y el pezón (84). La siguiente fase comprende el examen de imágenes, por técnicas como la mamografía o ultrasonografía, para finalmente confirmar el diagnóstico mediante la revisión patológica de una biopsia del tumor (84,85). El examen confirmatorio brindará información importante respecto a las características del tumor, como el tipo y grado histológico, la expresión de los biomarcadores (ER, PR, HER2 y Ki67), la presencia de invasión histológica y el estadio patológico. Una vez se ha confirmado el diagnóstico y, si es el caso, se ha administrado NAT al paciente, se procederá con la resección quirúrgica del tumor. Las características del tejido, producto de la cirugía, también serán evaluadas, pero esta vez en todo el material obtenido (64).

#### **5.4.1.1 Clasificación histológica**

Anteriormente, la clasificación histológica del cáncer de mama se basaba en el lugar de origen de la lesión; si esta se encontraba ubicada en los ductos, se le clasificaba como un carcinoma ductal, y si por el contrario se ubicaba en los lobulillos, se le clasificaba como un carcinoma lobulillar. Así mismo, si la lesión se encontraba contenida en el área de origen, se le denominaba in situ, mientras que si esta se encontraba invadiendo los tejidos adyacentes, se le denominaba infiltrante (86). Después de que se demostrará que las células tumorales realmente se originan a partir de un mismo sitio anatómico, la unidad ductolobulillar terminal, la estrategia de clasificación del cáncer de mama por la Organización Mundial de la Salud (OMS) cambió (87,88). Hoy en día se reconocen 19 subtipos histológicos, donde se encuentra el carcinoma de tipo no especial (NOS), el lobulillar, y otros 17 de tipo especial. Los carcinomas NOS son los más comunes; representan aproximadamente entre el 70-75% de los tumores diagnosticados (88).

Algunos de los tumores de tipo especial son los carcinomas tubulares, cribiformes y adenoide quísticos, los cuales cuentan con un buen pronóstico (89,90).

#### **5.4.1.2 Grado tumoral**

La evaluación patológica de la biopsia también incluye la determinación del grado tumoral. Actualmente, este se calcula bajo los criterios del sistema Scarff–Bloom–Richardson, modificados por Elston y Ellis (91). Este sistema consiste en la evaluación de la formación de túbulos y acinos, la atipia nuclear y el número de células en mitosis presentes en el tumor. Cada criterio recibe una calificación del 1 al 3, y el valor de la suma total de los parámetros evaluados corresponderá al grado tumoral. Siendo así, los tumores con un score de 3-5 se clasifican como bien diferenciados, grado 1; tumores con un score de 6-7 corresponden a tejidos moderadamente diferenciados, grado 2; y los tumores con un score de 8-9 se clasifican como pobremente diferenciados, grado 3 (64). En efecto, el grado tumoral es una medida que refleja el comportamiento biológico del tumor y, por ende, su determinación le permitirá al oncólogo hacer una estimación del pronóstico del paciente y del curso de la enfermedad (84).

#### **5.4.1.3 Tamaño tumoral y sistema de estadificación TNM**

La determinación del tamaño tumoral representa una variable de pronóstico con alta utilidad clínica para el médico tratante (92). Su dimensión se obtiene al momento del diagnóstico por técnicas de imagen, y en un segundo momento durante la revisión macroscópica del producto de la cirugía, luego de la resección del tumor (64). Este parámetro está incluido dentro de los criterios para la estadificación de la enfermedad, mediante el sistema TNM, que además del tamaño tumoral (T), incluye la evaluación de otros parámetros como el compromiso ganglionar (N) y la presencia de metástasis (M) al momento del diagnóstico (93,94). Este sistema permite evaluar el alcance anatómico del tumor en el tejido, y brinda a la vez los parámetros para su estadificación en categorías del I al IV, siendo esta última indicativa de enfermedad metastásica (94).

#### **5.4.1.4 Invasión histológica**

La invasión histológica es un marcador pronóstico ampliamente descrito en cáncer de mama. Este proceso se refiere a la presencia de células tumorales, ya sea en los vasos linfáticos y/o sanguíneos (linfovascular), en los nervios (perineural) o en la dermis (dérmica) (95–97). La invasión linfovascular se ha visto asociada con un mayor tamaño tumoral, grado histológico, y menor edad de diagnóstico (98). Así mismo, también es un predictor de la supervivencia global y libre de recurrencia, (95,98,99). En cuanto a la invasión perineural, esta es mucho menos frecuente que la linfovascular (100), no obstante, también se ha visto asociada con características de mal pronóstico, como mayor tamaño tumoral y grado histológico, así como con una menor supervivencia libre de recurrencia en pacientes de alto riesgo (compromiso ganglionar) (100,101). La invasión dérmica, por otro lado, es una característica común en el cáncer de mama inflamatorio, un tipo de neoplasia menos común, pero con características clínico-patológicas agresivas (102). Se ha demostrado en estos casos que el compromiso dérmico está asociado con el riesgo de mortalidad por la enfermedad (97). Lo anterior resalta la importancia de hacer una evaluación apropiada de la invasión histológica en el tejido tumoral, dada la importante información pronóstica que esta característica brinda al médico oncólogo.

#### **5.4.1.5 Márgenes quirúrgicos**

El margen quirúrgico hace referencia a la distancia que hay entre las células tumorales y el borde del tejido removido, marcado con tinta china (103). Para carcinomas infiltrantes, se consideran márgenes negativos cuando la tinta del borde del tejido no toca el tumor, mientras que para carcinomas in situ, se consideran márgenes libres cuando el tumor se encuentra al menos 2mm alejado del borde (64,84). Dado que el objetivo final del procedimiento quirúrgico es eliminar por completo el tumor, la presencia de tinta china sobre el carcinoma es indicativo de la presencia de células tumorales residuales en la mama (103); por ende, el estatus de las márgenes quirúrgicas se considera como el principal predictor de recurrencia local (104). Como consecuencia, pacientes con márgenes positivas deberán ser sometidas nuevamente a cirugía de mama, con el fin de remover el tejido tumoral residual. Este procedimiento, por consiguiente, implicará mayor molestia para el paciente, y sin duda, mayores costos para el sistema de salud (64).

## **5.5 Opciones terapéuticas para el manejo del cáncer de mama**

Actualmente el tratamiento del cáncer de mama se elige teniendo en cuenta varios factores, como el examen físico, las características histopatológicas del tumor reportadas en la biopsia, y los resultados de imagenología durante el diagnóstico; estos factores permitirán la estadificación de la enfermedad de acuerdo al sistema TNM, mencionado anteriormente, y guiaran el manejo clínico del paciente (75,93,94). El tratamiento de los pacientes en estadios I-III, es decir, no metastásicos, tiene como objetivo erradicar el tumor presente en la mama y los nódulos linfáticos adyacentes, así como prevenir la extensión del mismo a otros tejidos (105). Para estos casos, el manejo puede ser local o sistémico. El primero se refiere a la resección quirúrgica del tumor, con opción de radiación postoperatoria, y el segundo consiste en la administración de tratamiento farmacológico, ya sea previo a la cirugía (NAT), posterior a la cirugía (adyuvancia), o ambos (75,105). Por otro lado, el cáncer de mama en estadio IV, es decir, metastásico, se considera incurable por lo que el tratamiento que se les ofrece a estos pacientes está enfocado principalmente en el manejo de los síntomas y en mejorar la calidad de vida (105,106).

A continuación, se describen las principales estrategias terapéuticas aplicadas para el tratamiento del cáncer de mama.

### **5.5.1 Manejo quirúrgico**

El manejo quirúrgico es la primera opción de tratamiento que reciben las pacientes con cáncer de mama local y regional (107). La cirugía a la vez comprende dos estrategias diferentes: mastectomía radical y cirugía conservadora de mama. La primera es aplicada usualmente cuando el estadio de la enfermedad es avanzado y el tumor se encuentra comprometiendo otros tejidos adyacentes. No obstante, hoy en día estos pacientes son candidatas a recibir tratamiento neoadyuvante, el cual les permitirá disminuir el tamaño tumoral, para así poder optar por una cirugía conservadora de mama (105,107,108). Esta última se refiere a la resección del parénquima mamario, sin comprometer la grasa subcutánea, la piel o el pezón, permitiendo el uso de implantes para la reconstrucción de la mama (109). A pesar de las ventajas que la cirugía conservadora ofrece en términos de estética, algunos estudios reportan que la recurrencia local en estos casos es mayor, comparado con las cirugías radicales. No obstante, estos estudios también reportan que la

administración de radioterapia disminuye significativamente las tasas de recurrencia en el grupo de los pacientes con cirugía conservadora (110,111). Es por esto que uno de los requerimientos para llevar a cabo este procedimiento es la posibilidad de recibir radioterapia posterior a la cirugía (112). Como resultado, hoy en día los estudios que han comparado las tasas de recurrencia loco-regional y la supervivencia global entre ambos procedimientos, reportan valores muy similares (111,113,114). Lo anterior confirma la hipótesis de que el pronóstico del paciente está más asociado a la presencia de metástasis distales, que podrán ser eliminadas mediante radioterapia, que a la estrategia de tratamiento quirúrgica local (115). Por lo tanto, siempre que sea posible se optará por ofrecer cirugía de mama conservadora, dadas las ventajas estéticas que esta opción ofrece a los pacientes (75,116).

Junto con la resección del tumor, en algunos casos también son removidos los nódulos linfáticos axilares, debido al pronóstico desfavorable que confiere el compromiso ganglionar para la enfermedad (117,118). El manejo que se brinde al paciente dependerá del estadio tumoral, así como de la presencia de adenopatías palpables al examen clínico, previo a la NAT (119). Dado el alto número de comorbilidades que conlleva la resección total de los nódulos linfáticos axilares (linfedemas, debilidad, pérdida de movimiento en el brazo), y al alto porcentaje de falsos negativos durante la revisión clínica de adenopatías, actualmente se ha implementado la evaluación del ganglio centinela (GC) en pacientes con nódulos palpables negativos (118,119). El GC se define como el primer ganglio que drena del tumor, por ende, es la primera ruta de acceso de las células tumorales para migrar a otros tejidos (120). Una de las técnicas más utilizadas para su evaluación es la aplicación peritumoral de un agente colorante azul, que guíara al cirujano en la identificación visual de los ductos linfáticos marcados con este mismo agente, para posteriormente ser removidos y evaluados por un patólogo. Otras técnicas incluyen el uso de marcadores radioactivos o la combinación de ambos (119,120). Todavía no es claro si aun en pacientes con GC positivo debería realizarse vaciamiento ganglionar axilar, dado que un alto porcentaje de estos no presenta compromiso ganglionar adicional (121). Incluso se ha demostrado que los pacientes con GC positivo que no son sometidos a vaciamiento ganglionar axilar, no presentan diferencias significativas en cuanto a recurrencia local, regional y supervivencia global, respecto a las que si fueron sometidas a este procedimiento. En este sentido, la resección total está indicada en pacientes con 3 o más GC comprometidos (122).

### **5.5.2 Radioterapia**

La radioterapia hace parte de la estrategia de tratamiento loco-regional del cáncer de mama, y usualmente es la continuación de la cirugía, en pacientes en estadios tempranos y avanzados de la enfermedad (123). Este se fundamenta en la administración localizada de una alta cantidad de radiación ionizante, es decir, energía a un tejido determinado, la cual será capaz de generar daño en la cadena del ADN y, por ende, inducción de muerte celular. Al ser un tratamiento localizado, el daño generado en el tejido sano adyacente a la zona de interés será prácticamente nulo (124). Otros efectos reportados de la radioterapia incluyen la inducción de la respuesta inmunológica, que actúa sobre las células tumorales no irradiadas adyacentes al tumor (efecto bystander) y sobre otras células tumorales distales, fuera del área de irradiación (efecto abscopal) (125). Su uso está indicado principalmente para la erradicación del tumor, sin embargo, también es utilizado para el tratamiento del dolor y el manejo de los síntomas de la enfermedad metastásica (84).

Para mujeres con nódulos comprometidos, la irradiación localizada de los ganglios linfáticos ha mostrado ser una estrategia útil para mejorar el desenlace del paciente. Usualmente se les administra a mujeres con tumores > 5cm y con más de 3 ganglios comprometidos (126,127). Múltiples estudios han reportado los beneficios de la radioterapia en la supervivencia global de mujeres con enfermedad metastásica, y la disminución en el riesgo de recurrencia (128–130). Hoy en día, la radioterapia posterior a la cirugía de mama se considera un protocolo estándar. Los resultados publicados por el metaanálisis del Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (130) reportaron que la radioterapia es capaz de reducir el riesgo de recurrencia local de 35% a 19%, y el riesgo de mortalidad de 25% a 21% en mujeres con cáncer de mama, independientemente del compromiso ganglionar.

### **5.5.3 Manejo farmacológico**

La selección del tratamiento farmacológico para el cáncer de mama está sujeto a diferentes factores como el riesgo de recurrencia, las comorbilidades del paciente, compromiso de ganglios linfáticos, y otras características del tumor, como la tasa de proliferación, el grado tumoral, y el subtipo molecular (o subtipo intrínseco) (108). Este último representa uno de principales factores decisivos, tanto para la selección del tipo de tratamiento farmacológico,

como para la selección del momento en el que se administrará. Por ejemplo, para ciertos subtipos, como el HER2-E y el TN, la NAT se considera un protocolo estándar para evaluar la respuesta patológica completa (pCR); esta se refiere a la ausencia de células tumorales en el espécimen quirúrgico, posterior a la cirugía. Por otro lado, los pacientes con tumores positivos para el RE y/o RP, independiente del estatus del HER2, deberán recibir tratamiento hormonal (84).

Hoy en día se sabe que el futuro del tratamiento del cáncer de mama está en el desarrollo de terapias dirigidas a blancos moleculares, como los receptores hormonales y el HER2, que brinden el mayor beneficio clínico posible y además eviten la presentación de eventos adversos en el paciente (76). A continuación, se describirán los principales esquemas de tratamiento farmacológico del cáncer de mama, de acuerdo con el perfil de expresión de los biomarcadores de clasificación en subtipos intrínsecos (RE, RP y HER2).

### **5.5.3.1 Terapia hormonal**

Tumores con expresión positiva de los receptores hormonales (S1%), ya sea RE o RP, o ambos, deberán recibir terapia hormonal por al menos 5 años. Esta terapia incluye la administración de moduladores selectivos del RE (SERMs), como el tamoxifeno y raloxifeno, y otros agentes inhibidores de la enzima aromatasa, como el anastrozol, letrozol y exemestane (84,108). La selección del fármaco para tumores RE+ está sujeta principalmente al estado menopáusico del paciente. El tamoxifeno actúa inhibiendo la unión del estrógeno a su receptor, bloqueando la respuesta celular que se genera al activar el RE (131); este es efectivo tanto en mujeres pre-menopáusicas como post-menopáusicas. Los inhibidores de la aromatasa bloquean la conversión de andrógenos a estrógenos, y solo son administrados a pacientes post-menopáusicas (105). Hoy en día a las mujeres pre-menopáusicas de alto riesgo también se les administra, junto con el tamoxifeno, un agente análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), el cual inhibe la producción de estrógenos y genera supresión ovárica. Este esquema ha demostrado mejorar significativamente la supervivencia de las mujeres que anteriormente solo recibían tamoxifeno (132).

Dentro de la terapia hormonal, el tamoxifeno ha demostrado ser altamente efectivo en el control de la enfermedad, mejorando significativamente el riesgo de recurrencia y la sobrevida de las pacientes, después de la cirugía de mama (133–135). Incluso se ha

demostrado que estos beneficios son independientes del estado menopaúsico, la expresión del RP y el compromiso ganglionar (134). No obstante, a pesar de que se ha reportado que una mayor duración del tratamiento confiere menor riesgo de recurrencia (135), estos beneficios solo son evidentes dentro de los primeros 10 años de su administración (134). La duración del tratamiento aun es un tema en discusión, dado que a pesar de los beneficios demostrados, el tamoxifeno también se ha asociado con efectos secundarios como mayor riesgo de cáncer endometrial y eventos tromboembólicos (75,108).

Por otro lado, los inhibidores de aromatasa hacen parte de la terapia estándar en mujeres postmenopáusicas. Incluso se ha reportado que el riesgo de recurrencia en mujeres tratadas por 5 años con inhibidores de aromatasa es menor, en comparación con las mujeres tratadas con tamoxifeno (136–138). Uno de los esquemas implementados hoy en día en mujeres postmenopáusicas es el cambio de agente terapéutico o “terapia switch” de un SERM a un inhibidor de aromatasa a los 2-3 años de tratamiento (105). Esta estrategia ha demostrado conferir un menor riesgo de recurrencia a los 5 años, comparado con mujeres tratadas exclusivamente con tamoxifeno (136). No obstante, los inhibidores de aromatasa también se han asociado con otros eventos adversos, como la osteopenia y la osteoporosis (133,138).

### **5.5.3.2 Quimioterapia citotóxica**

Los agentes citotóxicos actúan bloqueando la proliferación celular de manera no específica, es decir, no solo actúan sobre las células tumorales, sino también sobre otros tejidos del cuerpo, generando importantes efectos adversos como cardiotoxicidad y mayor riesgo de desarrollar tumores en otros tejidos (139,140). Aun así, su administración ha demostrado ser muy efectiva para disminuir el riesgo de recurrencia y la mortalidad por cáncer de mama, independientemente de la edad, el compromiso ganglionar, y las características del tumor (141).

El régimen estándar de tratamiento citotóxico en pacientes con menor riesgo (compromiso ganglionar negativo) incluye la administración de antraciclinas (doxorrubicina, epirubicina) en combinación con la ciclofosfamida (esquema AC), o de este último en conjunto con metotrexato y 5-fluorouracilo (esquema CMF). Pacientes con mayor riesgo (compromiso ganglionar positivo) también se les administra taxanos (paclitaxel, docetaxel) de manera secuencial, por un periodo de 18 a 24 meses (84,105,108). Adicionalmente, estudios en

pacientes con tumores TN han demostrado que la administración de platinos al esquema de antraciclinas y taxanos durante la NAT aumenta la tasa de pCR (142,143); no obstante, debido a la toxicidad de estos fármacos, su inclusión en el esquema de tratamiento debe hacerse con precaución (108). La estrategia de administración de estos agentes también es un factor importante para tener en cuenta. Se ha demostrado que la administración por dosis densa, que se refiere a la reducción del intervalo de tiempo entre cada dosis, puede mejorar la supervivencia global y libre de recurrencia (144,145); lo anterior se atribuye a la disminución en el tiempo que tendrán las células tumorales para recuperarse entre cada ciclo de quimioterapia (140).

La terapia citotóxica es el tratamiento estándar para pacientes con tumores RE-, debido a que su administración en estos ha mostrado altas tasas de reducción en el riesgo de recurrencia (146). Por otro lado, pacientes con tumores luminales y con compromiso ganglionar también son candidatos para recibir tratamiento con quimioterapia citotóxica. No obstante, algunos pacientes sin compromiso ganglionar también pueden ser candidatos para recibir esta terapia; el beneficio adicional que obtendrán dependerá principalmente del riesgo de recurrencia (105,147). Una estrategia útil para definir como se beneficiarán los pacientes RE+ sin compromiso ganglionar, de la quimioterapia, es la aplicación del ensayo genómico Oncotype DX, el cual provee un puntaje de acuerdo con el riesgo de recurrencia; se considera alto si es  $\geq 31$ , bajo si es  $< 18$ , e intermedio si se ubica entre este rango. Pacientes catalogados con mayor riesgo se benefician ampliamente de la quimioterapia citotóxica, mientras que los de bajo riesgo no reciben beneficio alguno de su administración(148). A pesar de que el panorama de tratamiento para los pacientes con riesgo intermedio no se definió en este estudio, un ensayo clínico reciente demostró que aquellas mujeres con riesgo de recurrencia intermedio tampoco reciben un beneficio significativo bajo la quimioterapia citotóxica (149). Dada la toxicidad que estos fármacos pueden tener en el paciente, el balance entre el beneficio obtenido y los efectos adversos que generan deberá ser valorado (75).

### **5.5.3.3 Terapia biológica**

La terapia biológica para cáncer de mama fue introducida en la década de los 90s, con la llegada del anticuerpo monoclonal trastuzumab. Dicho evento modificó completamente la estrategia de tratamiento en pacientes con sobreexpresión del HER2 (150). Este anticuerpo

se une específicamente a la región extracelular del receptor, lo que inhibe su activación y, por ende, la de múltiples vías de señalización celular corriente abajo (151,152). Se ha sugerido que también tiene otros mecanismos de acción, como el reclutamiento de células inmunes efectoras, responsables de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (152). La efectividad de este fármaco fue rápidamente demostrada en múltiples ensayos clínicos, donde tanto la supervivencia global y libre de recurrencia mejoró significativamente para los pacientes tratados con esta terapia durante al menos 1 año (153–155). Hoy en día, el tratamiento estándar para pacientes con sobreexpresión de HER2 consiste en la administración de un esquema de antraciclinas, ciclofosfamida, y posteriormente taxanos más trastuzumab, durante 1 año (67). Terapias con mayor duración no han demostrado conferir beneficios adicionales a los pacientes y, al contrario, se han asociado con la presentación de eventos adversos, como cardiotoxicidad (156).

Durante los últimos años se han desarrollado nuevas terapias biológicas, como la conjugación del anticuerpo trastuzumab con un agente citotóxico (T-DM1), y el desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos a distintos dominios del receptor HER2 (152,157). Dentro de estos últimos se encuentra el pertuzumab, el cual se une específicamente al dominio extracelular de dimerización II, e inhibe la unión del HER2 con otros miembros de la familia EGFR (158). Otro agente es el lapatinib, el cual actúa sobre el dominio TK del HER2, inhibiendo la autofosforilación del receptor y, por ende, la activación de múltiples vías de señalización celular corriente abajo (159). El beneficio de la administración dual de la terapia anti-HER2 ha sido explorado ampliamente. Un estudio reciente demostró que la supervivencia libre de enfermedad mejora significativamente en mujeres tratadas simultáneamente con trastuzumab y pertuzumab, en comparación con aquellas que son tratadas con solo uno de estos fármacos; además, cuando ambos se administran junto con un taxano en el esquema de la NAT, se observa una mayor tasa de pCR (160). Por el contrario, otros estudios que han evaluado el beneficio de la administración dual de trastuzumab y lapatinib, no han reportado diferencias significativas en la pCR entre el grupo tratado con ambos o con solo uno de estos agentes (161–163). Respecto al anticuerpo conjugado T-DM1, también conocido como trastuzumab emtasina, se ha sugerido su uso en pacientes que después de recibir NAT con trastuzumab, no han logrado alcanzar la pCR; lo anterior es el resultado del ensayo clínico donde se demostró un riesgo de recurrencia y muerte 50% menor en pacientes tratados durante la adyuvancia con T-DM1 (164).

Otros agentes biológicos para el tratamiento del cáncer de mama incluyen inhibidores de moléculas involucradas en la activación de vías de señalización asociadas a proliferación celular. Dentro de estos se encuentran los inhibidores de CDK4/6, como el ribociclib, palbociclib y abemaciclib, y los inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR, como el everolimus, alpelisib y capivasertib (157). Para el caso de tumores TN, se ha evaluado el uso de inmunoterapia, específicamente de anticuerpos dirigidos a las células tumores con expresión positiva del ligando de muerte programada 1 (PD-L1). Esta molécula es capaz de unirse a su receptor PD-1 en la superficie de los linfocitos T, generando inactivación de la respuesta inmunológica celular contra el tumor (165). Recientemente se ha demostrado los beneficios en la supervivencia libre de recurrencia con la administración del anti-PDL1 atezolizumab, en mujeres con tumores TN en estadios avanzados (166). Hoy en día el atezolizumab constituye la primera inmunoterapia aprobada para el tratamiento del cáncer de mama TN avanzado, con expresión positiva de PD-L1 (157).

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Diseño del estudio**

Se trata de un estudio observacional analítico. Este proyecto hace parte del estudio titulado “Ancestría genética como potencial modulador de la expresión de los genes *ERBB2/GRB7/MIEN1* en pacientes colombianas con cáncer de mama” del Instituto Nacional de Cancerología (INC), financiado con recursos de la convocatoria de inversión nacional del año 2017.

### **6.2 Definición de los sujetos de estudio**

Se incluyeron mujeres con cáncer de mama infiltrante, diagnosticadas en el INC entre los años 2013-2015, y que además cumplieran con los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico histológico confirmado de cáncer de mama invasivo.
- Disponibilidad de los bloques de parafina y láminas histológicas provenientes de cirugías de mama (cuadrantectomías o mastectomías).
- Presencia de al menos 10% de contenido tumoral invasivo.

De cada paciente se recolectaron las láminas de hematoxilina y eosina (H&E) y los bloques de tejido tumoral embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE), producto de la cirugía de mama que se encontraban almacenados en el archivo de patología del INC. Un solo patólogo revisó y confirmó el diagnóstico histopatológico para cada caso seleccionado para verificar el cumplimiento de los criterios de inclusión; así mismo, se seleccionó el bloque con mayor representación tumoral en los bloques de FFPE del producto de la cirugía.

### **6.3 Cálculo de tamaño de muestra**

Como se mencionó anteriormente, este estudio hace parte de un proyecto en curso del INC, cuyo primer objetivo específico corresponde a la evaluación del cambio en la expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con la administración de tratamiento neoadyuvante, por lo tanto, el tamaño de muestra se calculó

a partir de los parámetros utilizados para este último. Se usó la fórmula para tamaño de muestra a partir de una proporción, descrita por García *et al* (167), usando el dato de la prevalencia de la población con ancestría indígena en Colombia, que corresponde al 37.8% (57) y se aplicó de la siguiente manera:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 * p * (1 - p)}{\alpha^2} = \frac{1.96^2 * 0.378 * (1 - 0.378)}{0.05^2} = 361 \text{ casos}$$

Donde:

- Valor Z ( $Z_{\alpha/2}$ ) = 1,96
- Error ( $\alpha$ ) = 0,05
- Proporción de ancestría indígena en Colombia ( $p$ ) = 0,378

A partir de esta cohorte de pacientes, se seleccionaron aquellos que, además de cumplir con los criterios de inclusión mencionados anteriormente, también tuvieran reporte de la expresión de los biomarcadores en la biopsia. De los 361 casos incluidos, 337 contaban con esa información.

## 6.4 Métodos de recolección de la información

### 6.4.1 Revisión de la información clínica

Para la selección de los casos del estudio, se partió de una base de datos suministrada por el registro epidemiológico del INC, con 1.916 casos diagnosticados con cáncer de mama en la institución, entre los años 2013 y 2015. Se revisó el reporte de patología para cada uno de los casos, y a partir de esta cohorte se preseleccionaron 575 pacientes. La población restante fue excluida por no haber sido sometida a cirugía de mama en el INC, no contar con el material disponible en la institución, o por la ausencia de células tumorales restantes en la pieza quirúrgica. De estos, se procedió a recolectar las láminas de H&E y los bloques de FFPE almacenados en el archivo de patología del INC, para su posterior revisión por el patólogo. De los casos que cumplieron con los criterios de inclusión, se obtuvo adicionalmente la información de la expresión de los biomarcadores RE, RP, HER2 y Ki67

en la biopsia y de las variables clínico-patológicas (Tabla 2) a partir del sistema de historias clínicas del INC. La información de la expresión de los biomarcadores en la biopsia fue recolectada en su mayoría a partir de los reportes de patología, por lo que la lectura de los biomarcadores en esta muestra fue interpretada por múltiples patólogos.

Con el objetivo de asegurar la homogeneidad en la lectura de los biomarcadores para la publicación de los resultados del proyecto en una revista indexada (Anexo 1), un solo patólogo reevaluó la expresión del RE, RP, HER2 y Ki67 en la biopsia para 139 casos.

#### **6.4.2 Inmunohistoquímica**

La expresión de los biomarcadores en el producto de la cirugía se evaluó a partir la técnica de IHQ. Se realizó un corte de 3µm en el bloque de FFPE con mayor representación tumoral, seleccionado por el patólogo. Este ensayo se llevó a cabo como un servicio técnico en el laboratorio de patología del INC, usando el sistema de preparación de muestras automatizado BenchMark XT de Roche. Se incluyeron controles positivos, y como cromógeno se utilizó diaminobenzidina (DAB).

La evaluación de los biomarcadores en la pieza quirúrgica fue llevada a cabo por un solo patólogo, siguiendo los siguientes criterios establecidos por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO)/Colegio Americano de Patólogos (CAP) (168,169):

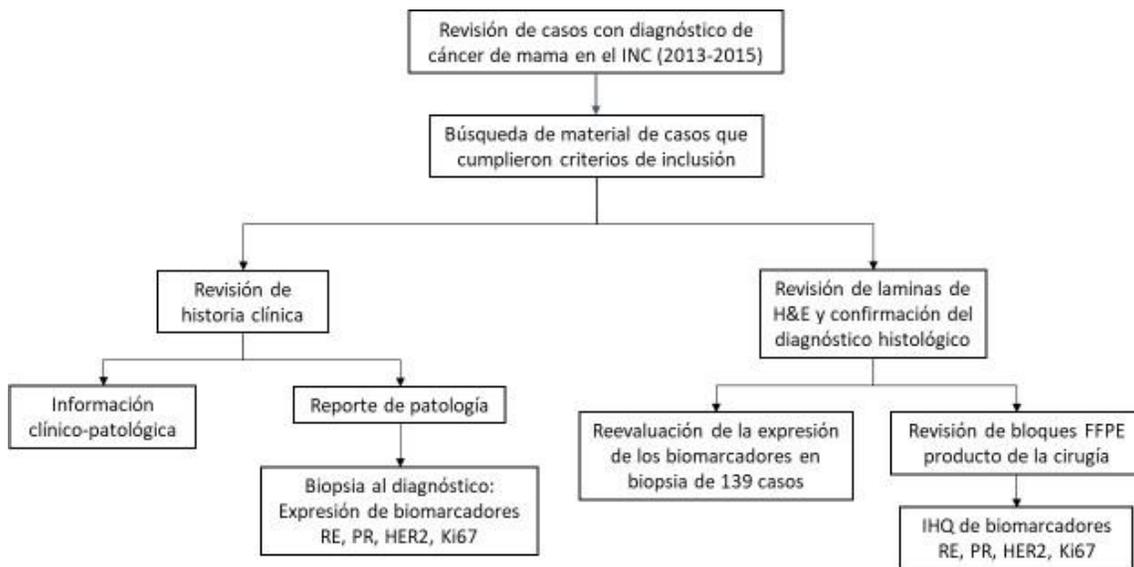
- La expresión de los receptores hormonales (RE y RP) se considera positiva si al menos 1% de las células tumorales presenta tinción nuclear; de lo contrario se define como negativa. El porcentaje de expresión corresponde al número de células evaluadas en la lámina con tinción nuclear positiva.
- La expresión de HER2 se evalúa de forma semicuantitativa, de la siguiente manera:
  - Se considera expresión negativa cuando hay ausencia de tinción de membrana o tinción débil para menos del 10% de las células tumorales, asignándose un puntaje de 0, o tinción débil para más del 10% de las células tumorales evaluadas, asignándose un puntaje de 1+.
  - Se considera expresión equivoca en los casos con tinción débil a moderada en más del 10% de las células tumorales, asignándose un puntaje de 2+.
  - Se considera expresión positiva en los casos con tinción de membrana completa e intensa en más del 10% de las células tumorales, asignándose un puntaje de 3+.

Adicional a la evaluación semicuantitativa de la expresión de HER2, el patólogo también asignó un porcentaje de expresión al receptor, con el objetivo de evaluar esta variable de manera continua. El porcentaje de expresión fue calculado como el número de células evaluadas en la lámina con tinción positiva. La información de la expresión cuantitativa de HER2 se recolectó para 139 casos, en sus respectivas muestras de biopsia y producto quirúrgico.

- La expresión del marcador de proliferación celular Ki67 se calculó como el porcentaje de células en la lámina con tinción nuclear positiva.

### 6.4.3 Flujograma de los procedimientos

A continuación, en la Figura 1 se ilustra el flujograma de los procedimientos de recolección de la información realizados a lo largo del proyecto:



**Figura 1.** Flujograma de los procedimientos realizados a lo largo del proyecto. INC: Instituto Nacional de Cancerología; H&E: hematoxilina y eosina; FFPE: embebidos en parafina y fijados con formalina; IHQ: inmunohistoquímica; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

#### 6.4.4 Variables de estudio

La información clínico-patológica de los casos incluidos fue registrada en el siguiente formato, usando la plataforma Redcap:

**Tabla 2.** Variables clínico-patológicas incluidas en el estudio

Variable	Tipo de variable	Categorías
<b>Información patológica</b>		
Tipo de carcinoma mamario	Cualitativa Nominal	Ductal, Lobulillar
Grado de diferenciación según la escala de Bloom Richardson	Cualitativa Ordinal	I, II, III
Invasión histológica	Cualitativa Nominal	Linfática, Vascular, Perineural, Dérmica
Compromiso de bordes	Cualitativa Nominal	Positivo, Negativo
Vaciamiento ganglionar	Cualitativa Nominal	Positivo, Negativo
Número de ganglios comprometidos	Cuantitativa Discreta	No. ganglios comprometidos/ No. ganglios extirpados
Porcentaje tumoral del bloque seleccionado	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Estatus del RE	Cualitativa Nominal	Positivo, Negativo
Porcentaje de expresión del RE	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Estatus del RP	Cualitativa Nominal	Positivo, Negativo
Porcentaje de expresión del RP	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Estatus del HER2	Cualitativa Ordinal	Positivo (3+), Equívoco (2+), Negativo (1+), Negativo (0+)
Porcentaje de expresión de Ki67	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Subtipo del cáncer de mama	Cualitativa Nominal	Luminal A, Luminal B, Luminal B/HER2+, Triple Negativo, HER2-enriquecido, No clasificable
<b>Características del paciente</b>		
Peso	Cuantitativa Continua	Kilogramos (Kg)
Altura	Cuantitativa Continua	Metros (m)
Índice de masa corporal (IMC)	Cuantitativa Continua	Índice
Fecha de nacimiento	Cuantitativa Discreta	Fecha

<b>Información clínica</b>		
Estadio clínico inicial	Cualitativa Ordinal	I, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV
Metástasis al momento del diagnóstico	Cualitativa Nominal	Si, No
Tamaño tumoral al diagnóstico	Cuantitativa Continua	Milímetros (mm)
¿Recibió Neoadyuvancia?	Cualitativa Nominal	Si, No
Terapia Citotóxica Neoadyuvante	Cualitativa Nominal	Regímenes de neoadyuvancia citotóxica
Terapia Hormonal Neoadyuvante	Cualitativa Nominal	Regímenes de neoadyuvancia hormonal
Respuesta a la Neoadyuvancia	Cualitativa Nominal	Completa, parcial, estable, progresión
Manejo quirúrgico definitivo	Cualitativa Nominal	Mastectomía, cuadrantectomía
Fecha de cirugía	Cuantitativa Discreta	Fecha
¿Recibió Adyuvancia?	Cualitativa Nominal	Si, No
Terapia Citotóxica adyuvante	Cualitativa Nominal	Regímenes de adyuvancia citotóxica
Terapia Hormonal adyuvante	Cualitativa Nominal	Regímenes de adyuvancia hormonal
Radioterapia adyuvante	Cualitativa Nominal	Completa, Incompleta, No recibió
<b>Información de seguimiento</b>		
Fecha del diagnóstico del cáncer de mama	Cuantitativa Discreta	Fecha
Edad a la fecha del diagnóstico	Cuantitativa Continua	Edad en años
¿Presentó recurrencia?	Cualitativa Nominal	Si, No
Tipo de recurrencia	Cualitativa Nominal	Local, Regional, Regional-sistémica, Sistémica
Año de la primera recurrencia	Cuantitativa Discreta	Año
Estado vital al momento de la finalización del estudio	Cualitativa Nominal	Viva, Muerta
Fecha de muerte según historia clínica	Cuantitativa Discreta	Fecha
Año de muerte según registraduría	Cuantitativa Discreta	Año
Fecha del último control	Cuantitativa Discreta	Fecha

## 6.5 Plan de análisis estadístico por objetivo específico

**Objetivo 1:** Evaluar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con la administración de tratamiento neoadyuvante.

Los cambios en la expresión de los biomarcadores en las muestras pareadas fueron analizados en los casos tratados con NAT (grupo con NAT) y en los no tratados con NAT (grupo sin NAT), como variaciones en el estatus y en el porcentaje de expresión. Para el primer caso (estatus), esta se analizó como una variable categórica: positivo y negativo para los receptores hormonales; positivo (3+), equívoco (2+) y negativo (0+/1+) para HER2; baja (<20%) y alta (≥20%) expresión para Ki67. Este punto de corte se estableció a partir de los criterios de clasificación de tumores de mama en subtipos intrínsecos, según el panel de expertos de St. Gallen en el 2013 (82). También se evaluó el cambio en la asignación del subtipo intrínseco para ambos grupos, en muestras pareadas de biopsia y producto quirúrgico, de acuerdo con los criterios especificados en la Tabla 1. Adicionalmente, se calculó el porcentaje de concordancia del estatus de los biomarcadores entre la biopsia y la pieza quirúrgica en las muestras pareadas, como el número de casos concordantes sobre el número de casos totales, multiplicado por 100. La evaluación del porcentaje de expresión se analizó como una variable continua.

Se evaluaron las diferencias en el estatus de los biomarcadores y en la asignación del subtipo intrínseco en las muestras pareadas, en los grupos con NAT y sin NAT, aplicando la prueba de independencia Chi-cuadrado. Para esta se eliminaron los datos faltantes en las categorías analizadas, con el objetivo de evitar sesgos en los resultados. Las diferencias en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en muestras pareadas fueron analizadas mediante la prueba Wilcoxon signed-rank, después de verificar que los datos no siguen una distribución normal, usando la prueba Kolmogorov-Smirnov con la corrección Lilliefors.

**Objetivo 2:** Determinar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con el esquema neoadyuvante recibido

Se categorizaron los pacientes del grupo con NAT de acuerdo con el esquema de tratamiento neoadyuvante recibido en: hormonal, citotóxico, citotóxico + trastuzumab y

combinado (hormonal + citotóxico). Para cada uno de los grupos se evaluaron los cambios en el estatus y en el porcentaje de expresión de los biomarcadores, bajo los mismos parámetros utilizados en el primer objetivo específico.

Las diferencias en el estatus de los biomarcadores en muestras pareadas, en los grupos con NAT hormonal, citotóxica, citotóxica + trastuzumab y combinada, se evaluaron mediante la prueba de independencia Chi-cuadrado, donde también se eliminaron los datos faltantes en las categorías analizadas. Las diferencias en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en muestras pareadas fueron analizadas mediante la prueba Wilcoxon signed-rank, después verificar que los datos no siguen una distribución normal, usando la prueba Kolmogorov-Smirnov con la corrección Lilliefors.

**Objetivo 3:** Analizar si los cambios en la expresión de los biomarcadores están asociados con el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama

Se realizó un análisis de supervivencia con el objetivo de evaluar las diferencias en esta variable de acuerdo con los cambios observados en los biomarcadores. Para este análisis, se recolectó la información de recurrencia y estado vital del paciente; esta se actualizó por última vez en marzo del 2020, de acuerdo con la información registrada en la historia clínica, la Base de Datos Única de Afiliados BDUA del Sistema General de Seguridad Social en Salud (BDUA-SGSSS) y la Registraduría Nacional del Estado Civil de Colombia.

Los criterios utilizados para el análisis de supervivencia fueron los siguientes:

- La supervivencia global (SG) se definió como el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico hasta la fecha de muerte por cualquier causa, de acuerdo con datos obtenidos en la página de la BDUA-SGSSS y de la Registraduría Nacional.
- La supervivencia libre de recurrencia (SLR) se definió como el tiempo transcurrido desde el año de la cirugía hasta el año de la primera recurrencia.

Los criterios utilizados para definir la recurrencia fueron los siguientes:

- Recurrencia local: presencia de masas tumorales en la misma mama del tumor primario.
- Recurrencia regional: presencia de masas tumorales en los ganglios linfáticos adyacentes a la mama.

- Recurrencia sistémica: presencia de masas tumorales en un órgano diferente a la mama.

Para los receptores hormonales, los casos se categorizaron de acuerdo con el cambio en el estatus del biomarcador, de la siguiente manera: grupo de ganancia de estatus (Negativo  $\rightarrow$  Positivo) y grupo de pérdida de estatus (Positivo  $\rightarrow$  Negativo). Para el biomarcador HER2, los casos se agruparon de la misma manera (grupo de ganancia de estatus y pérdida de estatus) utilizando las categorías correspondientes: Positivo (3+), Equívoco (2+), Negativo (0+/1+). Para el biomarcador Ki67, primero se categorizó su expresión usando un punto de corte del 20%, y se agruparon en: ganancia de expresión (<20%  $\rightarrow$   $\geq$ 20%) y pérdida de expresión ( $\geq$ 20%  $\rightarrow$  <20%).

El análisis de supervivencia se realizó comparando las diferencias en el desenlace entre los grupos de ganancia y pérdida de estatus para cada uno de los biomarcadores analizados, en los grupos con NAT y sin NAT. Adicionalmente, se calculó el cociente de riesgo (HR) junto con el intervalo de confianza (CI) del 95%, para evaluar la asociación entre la pérdida y ganancia de los biomarcadores con la SG y SLR, en los grupos con NAT y sin NAT. El modelo multivariado se ajustó por aquellas variables de pronóstico asociadas con diferencias en la presentación de la enfermedad, de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Las diferencias en la SG y SLR en los grupos con pérdida y ganancia de estatus fueron analizadas aplicando el método de Kaplan-Meier y el test de log-rank. El HR para estas medidas fue calculado usando el modelo de riesgo proporcional de Cox; para los grupos donde el número de eventos fue cero, se aplicó la corrección de Haldane-Anscombe.

Finalmente, se evaluó el cambio en el grado de diferenciación tumoral según la escala Scarff-Bloom-Richardson, en muestras de biopsia y tejido quirúrgico, en el grupo con NAT, en los casos con ganancia y pérdida de Ki67, aplicando la prueba de independencia Chi-cuadrado.

Todos los análisis fueron realizados en el software estadístico R Studio (versión 1.3.1093). Se tomó como valor significativo un  $p < 0,05$ .

## 6.6 Consideraciones éticas

De acuerdo con la resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, donde se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos, este proyecto se clasificó como “investigación sin riesgo”, dado que es un estudio retrospectivo donde únicamente se revisaron historias clínicas y se utilizaron muestras biológicas ya almacenadas. Al no realizarse ningún tipo de intervención sobre las pacientes incluidas, el Comité de Ética e Investigaciones del INC aprobó el proyecto institucional “Ancestría genética como potencial modulador de la expresión de los genes *ERBB2/GRB7/MIEN1* en mujeres colombianas con cáncer de mama”, dentro del cual se enmarca el presente estudio, y consideró que no era necesaria la toma de consentimiento informado en las pacientes incluidas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características clínico-patológicas

Las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran especificadas en la Tabla 3. Se incluyeron 337 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante. La mayor parte de los pacientes incluidos fueron diagnosticados después de los 50 años (77,2%), y se encontraron en sobrepeso (IMC 25-30) (40,4%). La mayoría de los casos fueron diagnosticados en estadio clínico III (44,5%) y grado tumoral II (54,2%), según la escala de clasificación Scarff-Bloom Richardson. El 51,3% de los pacientes incluidos presentaron invasión histológica, de los cuales el 42,0% fue de tipo linfovascular. Así mismo, el 78,3% de los casos fueron sometidos a vaciamiento ganglionar axilar, y de estos el 61,7% presentó compromiso ganglionar. Por otra parte, el 53,1% de los pacientes recibieron NAT, principalmente bajo un esquema citotóxico (68,2%); de estos casos, el 37,4% presentaron respuesta a la NAT de tipo parcial. De los casos que recibieron NAT, el 70,4% se encontraron en estadio clínico III, mientras que de los casos sin NAT, la mayor parte se encontraron en estadio clínico II (63,7%).

En su mayoría, los pacientes incluidos recibieron mastectomía (57,0%) como manejo quirúrgico de la enfermedad. Como complemento a la adyuvancia, el 82,8% de los casos completaron la radioterapia, no obstante, el 23,4% presentó recurrencia de la enfermedad, principalmente de tipo sistémica (51,0%).

**Tabla 3.** Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos.

	<b>Categoría</b>	<b>N (%) n=337</b>
<b>Edad de diagnóstico</b>	<50 años	77 (22,8)
	S 50 años	260 (77,2)
<b>Índice de masa corporal (IMC)</b>	S25	116 (34,4)
	25-30	136 (40,4)
	S30	84 (24,9)
<b>Estadio clínico</b>	I (I, Ia, Ib)	34 (10,1)
	II (IIa, IIb)	146 (43,3)
	III (IIIa, IIIb, IIIc)	150 (44,5)
	IV	7 (2,1)

<b>Scarff-Bloom Richardson</b>	I	25 (7,4)	
	II	182 (54,2)	
	III	129 (38,4)	
<b>Tamaño tumoral al diagnóstico</b>	<20 mm	86 (25,5)	
	>50 mm	105 (31,2)	
	21-49 mm	137 (40,7)	
	No hay dato	9 (2,7)	
<b>Invasión histológica</b>	Positiva	173 (51,3)	
	Negativa	132 (39,2)	
	No hay dato	32 (9,5)	
<b>Tipo de invasión histológica</b>	Dérmica	18 (8,8)	
	Linfovascular	86 (42,0)	
	Linfovascular, dérmica	22 (10,7)	
	Linfovascular, perineural	23 (11,2)	
	Linfovascular, perineural, dérmica	6 (2,9)	
	Perineural	15 (7,3)	
	Perineural, dérmica	3 (1,5)	
	No hay dato	32 (15,6)	
	<b>Compromiso de bordes</b>	Negativo	308 (91,4)
		Positivo	25 (7,4)
No hay dato		4 (1,2)	
<b>Vaciamiento ganglionar</b>	No	73 (21,7)	
	Si	264 (78,3)	
<b>Compromiso de ganglios</b>	Negativo	101 (38,3)	
	Positivo	163 (61,7)	
<b>Tratamiento neoadyuvante</b>	No recibió	158 (46,9)	
	Si recibió	179 (53,1)	
<b>Esquema de neoadyuvancia administrado</b>	Citotóxico	122 (68,2)	
	Citotóxico y trastuzumab	32 (17,9)	
	Combinado (hormonal + citotóxico)	15 (8,4)	
	Hormonal	10 (5,6)	
<b>Respuesta a la neoadyuvancia</b>	Clínico-patológica	24 (13,4)	
	Estable	10 (5,6)	
	Parcial	67 (37,4)	
	Progresión	27 (15,1)	
	No hay dato	51 (28,5)	
<b>Manejo quirúrgico</b>	Cuadrantectomía	145 (43,0)	
	Mastectomía	192 (57,0)	
<b>Tratamiento adyuvante</b>	Recibió	312 (92,6)	
	No recibió	25 (7,4)	
<b>Esquema adyuvante administrado</b>	Hormonal	147 (47,1)	
	Citotóxico	40 (12,8)	

	Citotóxico + trastuzumab	16 (5,1)
	Combinado (hormonal + citotóxico)	109 (34,9)
<b>Radioterapia</b>	Completa	279 (82,8)
	Incompleta	2 (0,6)
	No recibió	36 (10,7)
	No hay dato	20 (5,9)
<b>Recurrencia de la enfermedad</b>	Negativa	235 (69,7)
	Positiva	79 (23,4)
	No hay dato	23 (6,8)
<b>Tipo de recurrencia</b>	Local	10 (9,8)
	Regional	12 (11,8)
	Regional-sistémica	4 (3,9)
	Sistémica	52 (51,0)
	No hay dato	24 (23,5)

## 7.2 Expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto de cirugía de mama

La evaluación de la expresión de los biomarcadores en la biopsia mostró que la mayor parte de los casos cuenta con expresión positiva del RE (79,2%), RP (71,2%), expresión negativa (0+/1+) del HER2 (74,2%) y un alto índice de proliferación celular (Ki67 S20%) (66,5%). La expresión de los biomarcadores en el producto de la cirugía mostró un perfil similar, donde los receptores hormonales también fueron predominantemente positivos (RE: 76,9%, PR: 68,2%), el receptor HER2 negativo (0+/1+) (71,5%), y el índice de proliferación celular Ki67 presentó alta expresión (59,9%) en la mayoría de los casos (Tabla 4). Dado que, como se evidencia en los resultados, la expresión de los biomarcadores puede variar de acuerdo con el tejido (biopsia vs. quirúrgico), se procedió a analizar las diferencias estadísticas en la expresión de los biomarcadores entre muestras pareadas de biopsias y producto quirúrgico, agrupando los casos de acuerdo con la administración de NAT.

**Tabla 4.** Estatus de los biomarcadores de mama de acuerdo con el tejido evaluado.

	<b>Categoría</b>	<b>Biopsia n=337</b>	<b>Quirúrgico n=337</b>
		N (%)	N (%)
<b>Estatus del RE</b>	Negativo	70 (20,8)	78 (23,1)
	Positivo	267 (79,2)	259 (76,9)
<b>Estatus del RP</b>	Negativo	96 (28,5)	107 (31,8)
	Positivo	240 (71,2)	230 (68,2)
	No hay dato	1 (0,3)	0 (0)
<b>Estatus del HER2</b>	Positivo (3+)	46 (13,6)	53 (15,7)
	Equívoco (2+)	35 (10,4)	43 (12,8)
	Negativo (0+/1+)	250 (74,2)	241 (71,5)
	No hay dato	6 (1,8)	0 (0)
<b>Estatus del Ki67</b>	Alta expresión (>20%)	224 (66,5)	202 (59,9)
	Baja expresión (<20%)	93 (27,6)	135 (40,1)
	No hay dato	20 (5,9)	0 (0)

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

**7.3 Objetivo específico 1. Evaluar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con la administración de tratamiento neoadyuvante.**

Con el objetivo de evaluar si los cambios en la expresión de los biomarcadores son consecuencia del tratamiento neoadyuvante, los casos incluidos fueron agrupados de la siguiente manera: grupo sin NAT y grupo con NAT. Sobre estos, se evaluó si hay diferencias estadísticamente significativas en el estatus y el porcentaje de expresión entre muestras pareadas de biopsia y producto quirúrgico.

**7.3.1 Grupo sin NAT**

**Estatus de los biomarcadores**

Se evaluó el cambio en el estatus de los biomarcadores entre muestras pareadas de biopsia y producto de cirugía, en 158 casos que no recibieron tratamiento neoadyuvante. Para el análisis del receptor HER2 y el marcador Ki67, se excluyeron aquellos casos sin información (HER2: 4 casos, Ki67: 10 casos). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras pareadas para el estatus de los receptores hormonales (RE:  $p = 1$ ; RP:  $p = 0,8953$ ), el HER2 ( $p=0,2203$ ), ni tampoco el índice de proliferación celular Ki67 ( $p=0,6344$ ) (Tabla 5). No obstante, se observó un número de casos con variación en el estatus de algunos de los biomarcadores, aun cuando estos no fueron sometidos a ningún tratamiento previo a la cirugía. Para el RE, se observó 1 caso con ganancia y 2 con pérdida de positividad, lo que corresponde a una concordancia en el estatus del 98,1%, entre la biopsia y el producto quirúrgico en las muestras pareadas. Para el RP se observaron 3 casos con ganancia y 5 con pérdida de positividad (concordancia: 94,9%). En cuanto al índice de proliferación celular Ki67, un total de 23 casos mostraron variaciones en el estatus; 9 de estos cambiaron a un estado de expresión alto, y 14 a un estado de expresión bajo (concordancia: 84,5%) (Tabla 7).

**Tabla 5.** Cambio en el estatus de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico, en los grupos sin NAT y con NAT.

		Grupo sin NAT			Grupo con NAT		
		n = 158			n = 179		
	Categoría	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor
RE	Negativo	27 (17,1)	28 (17,7)	1	43 (24,0)	50 (27,9)	0,4696
	Positivo	131 (82,9)	130 (82,3)		136 (76,0)	129 (72,1)	
RP	Negativo	37 (23,4)	39 (24,7)	0,8953	59 (33,1)	67 (37,6)	0,4378
	Positivo	121 (76,6)	119 (75,3)		119 (66,9)	111 (62,4)	
HER2 <sup>+</sup>	Negativo (0+/1+)	123 (79,9)	110 (71,4)	0,2203	127 (71,8)	129 (72,9)	0,9716
	Equívoco (2+)	14 (9,1)	21 (13,6)		21 (11,9)	20 (11,3)	
	Positivo (3+)	17 (11,0)	23 (14,9)		29 (16,4)	28 (15,8)	
Ki67 <sup>+</sup>	Alto (S20%)	92 (62,2)	87 (58,8)	0,6344	132 (78,1)	106 (62,7)	0,00289
	Bajo (<20%)	56 (37,8)	61 (41,2)		37 (21,9)	63 (37,3)	

\*Casos excluidos del análisis por falta de información en el grupo sin NAT: HER2: 4 casos; Ki67: 10 casos, y en el grupo con NAT: HER2: 2 casos, Ki67: 10 casos. NAT: neoadyuvancia; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

La evaluación del cambio en el estatus del receptor HER2 entre la biopsia y la pieza quirúrgica en el grupo sin NAT también mostró variaciones en algunos casos, aunque no estadísticamente significativas. De 123 casos inicialmente negativos en la biopsia, 18 ganaron expresión, 13 de estos de manera incompleta pasando de un estado negativo a un estado equívoco, y 5 de un estado equívoco a un estado positivo. De la misma forma, de 17 casos inicialmente positivos en la biopsia, solo 2 perdieron expresión, cambiando a un estado equívoco. Así mismo, de los 14 casos inicialmente clasificados como equívocos, 5 cambiaron a un estatus negativo y 3 a un estatus positivo (concordancia: 79,7%) (Tabla 8). Es importante aclarar que en la práctica clínica el cambio de estatus negativo (0+/1+) a la categoría equívoca (2+) no se considera una ganancia completa del receptor HER2 hasta que este resultado no sea confirmado por FISH. No obstante, dado que no todos los casos evaluados cuentan con el resultado de la prueba confirmatoria, en este trabajo, este evento se interpretó como ganancia incompleta de su expresión.

### **Cambios en la clasificación en subtipos intrínsecos**

Se evaluó el cambio en la asignación del subtipo intrínseco entre muestras pareadas de biopsia y producto quirúrgico, en el grupo sin NAT, de acuerdo con los criterios especificados en la Tabla 1. Aquellos casos con expresión equívoca (2+) del HER2 donde la información de los demás biomarcadores no permitiera su clasificación dentro de las demás categorías, fueron asignados dentro del grupo “No clasificable”. Adicionalmente, se excluyeron 8 casos del análisis debido a que no fue posible clasificarlos por falta de información en la expresión del Ki67. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la asignación de subtipos intrínsecos en el grupo sin NAT ( $p=0,4485$ ), sin embargo, fue posible observar una tendencia a la disminución en el porcentaje de tumores luminales B (Biopsia: 45,0% vs. Quirúrgico: 36,2%), así como también al aumento en el porcentaje de tumores luminales B/HER2+, de 6,7% en la biopsia a 10,7% en la pieza quirúrgica (Tabla 6).

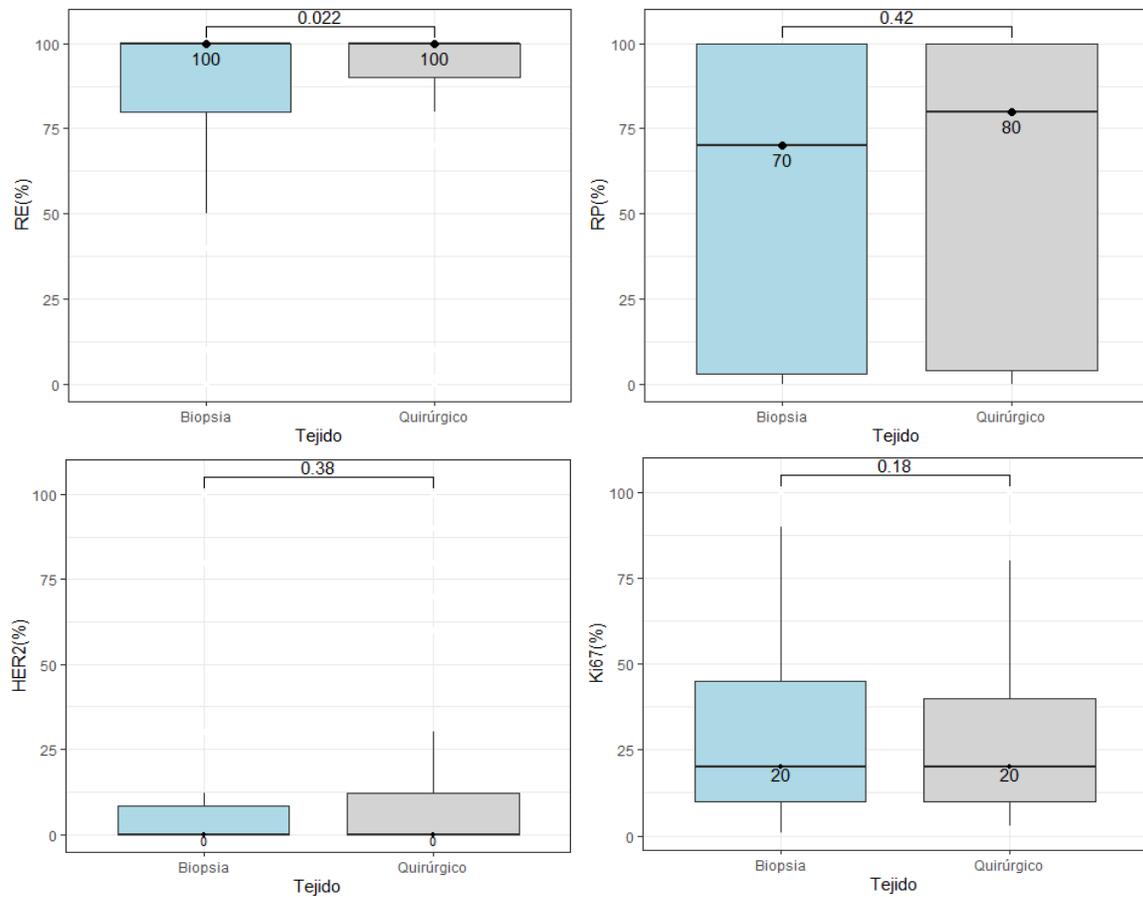
**Tabla 6.** Cambios en la clasificación de los tumores en subtipos intrínsecos de acuerdo con los criterios establecidos en el panel de St. Gallen del 2013 (82), en muestras de biopsia y producto quirúrgico, en los grupos sin NAT y con NAT.

Subtipo intrínseco	Grupo sin NAT+ n=149			Grupo con NAT+ n=176		
	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor
Luminal A	42 (28,2)	45 (30,2)	0,4485	29 (16,5)	41 (23,3)	0,1481
Luminal B	67 (45,0)	54 (36,2)		83 (47,2)	62 (35,2)	
Luminal B/ HER2+	10 (6,7)	16 (10,7)		18 (10,2)	15 (8,5)	
HER2- enriquecido	6 (4,0)	7 (4,7)		10 (5,7)	13 (7,4)	
Triple negativo	19 (12,8)	17 (11,4)		31 (17,6)	34 (19,3)	
No clasificable	5 (3,4)	10 (6,7)		5 (2,8)	11 (6,3)	

No clasificable: casos con expresión equívoca (2+) del HER2 donde la expresión de los biomarcadores restantes no permitió su clasificación en las demás categorías. \*Se excluyeron 10 casos del grupo sin NAT y 3 casos del grupo con NAT para el análisis por falta de información en el biomarcador Ki67. NAT: neoadyuvancia.

### Porcentaje de expresión de los biomarcadores

Se evaluó el cambio en el porcentaje de expresión de los biomarcadores entre biopsias y el producto quirúrgico, en muestras pareadas de casos sin tratamiento neoadyuvante. El porcentaje de expresión de los biomarcadores en la biopsia no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al tejido quirúrgico para el RP ( $p=0,419$ ), HER2 ( $p=0,383$ ) y Ki67 ( $p=0,185$ ). Contrario a este resultado, fue posible observar diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de expresión para el RE ( $p=0,022$ ) entre muestras pareadas de casos sin NAT (Figura 2).

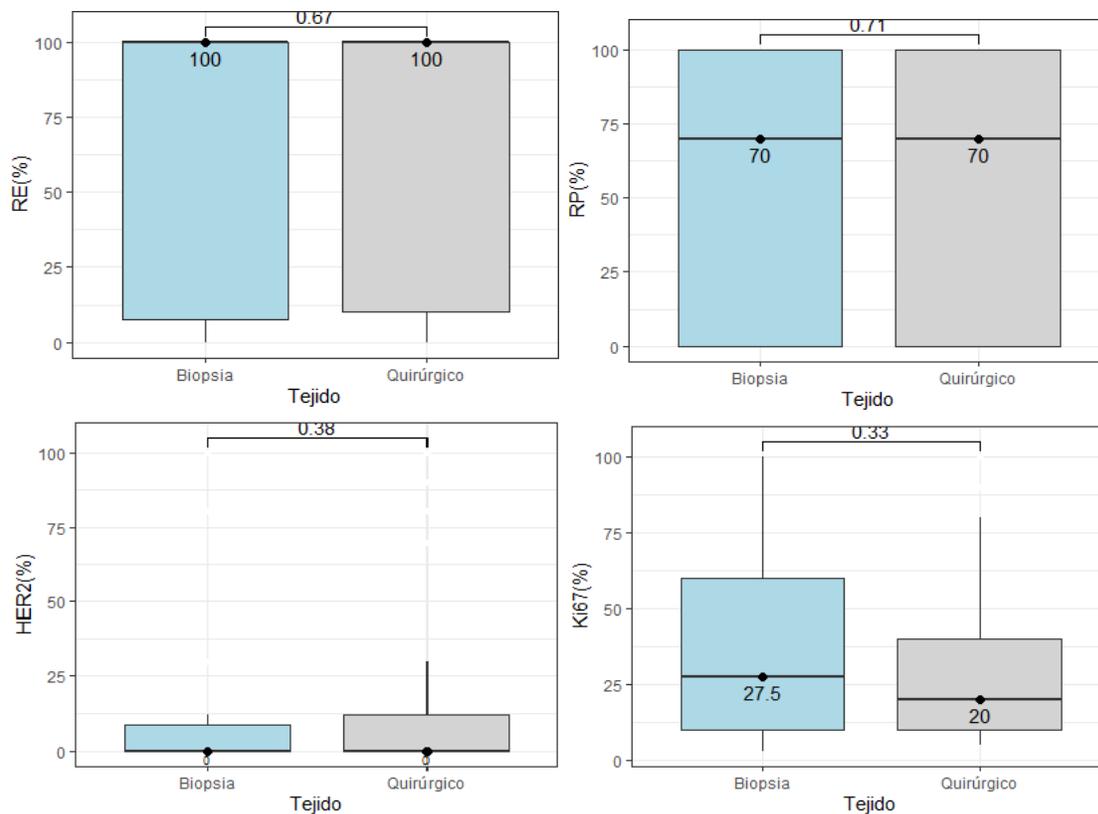


**Figura 2.** Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en las biopsias y el producto quirúrgico en el grupo de casos sin NAT. Los puntos representan el valor de la mediana del biomarcador evaluado de acuerdo con el tejido. RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

Debido a que los resultados obtenidos en el grupo sin NAT mostraron diferencias en el porcentaje de expresión del RE entre las biopsias y el producto quirúrgico, se decidió analizar nuevamente el cambio en la expresión, esta vez exclusivamente en aquellos casos donde, tanto el producto de la biopsia como el material de la cirugía fueron valorados por un mismo patólogo; lo anterior con el fin de determinar si las diferencias reportadas podrían ser el resultado de la variabilidad por observador.

### 7.3.2 Diferencias en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en casos sin NAT, evaluados por el mismo patólogo.

Se analizaron las diferencias en la expresión de los biomarcadores en las biopsias y el producto quirúrgico, para 61 casos sin tratamiento previo con NAT, cuya expresión fue valorada por un mismo patólogo. Este nuevo análisis, donde se elimina la variabilidad por observador, no mostró diferencias significativas en el porcentaje de expresión para ninguno de los biomarcadores evaluados, incluyendo el RE ( $p=0,67$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en las biopsias y el producto quirúrgico en el grupo de casos sin NAT, evaluados por un mismo patólogo. Los puntos representan el valor de la mediana del biomarcador evaluado de acuerdo con el tejido. RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

### 7.3.3 Grupo con NAT

#### Estatus de los biomarcadores

Se evaluó el cambio en el estatus de los biomarcadores entre muestras pareadas de biopsias y productos de cirugía, en 179 casos tratados con NAT; para el análisis del RP, HER2 y el marcador Ki67, se excluyeron aquellos casos sin información del estatus (RP: 1 caso, HER2: 2 casos, Ki67: 10 casos). Los resultados obtenidos no mostraron cambios estadísticamente significativos en el estatus de los receptores hormonales (RE:  $p=0,4696$ ; RP:  $p=0,4378$ ) (Tabla 5). No obstante, al igual que para el grupo sin NAT, también se encontraron algunos casos con cambios en el estatus de ambos biomarcadores. Para el RE, 7 casos presentaron pérdida de positividad, y ninguno ganancia en el estatus del receptor (concordancia: 96,1%), mientras que, para el RP 15 casos presentaron pérdida de positividad y 7 mostraron ganancia de estatus del receptor (concordancia: 87,6%); de los 15 casos mencionados anteriormente, 2 corresponden a casos que también perdieron la expresión del RE.

Por otra parte, la evaluación del Ki67 después de la NAT mostró una disminución estadísticamente significativa en el número de casos con alta expresión del biomarcador ( $p=0,00288$ ). En total se observaron 6 casos con ganancia y 32 con pérdida en la expresión del Ki67 (concordancia: 77,5%) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Cambios en el estatus del biomarcador Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, en los grupos sin NAT y con NAT.

	Quirúrgico		No. casos con ganancia de Ki67	No. casos con pérdida de Ki67	p valor
	Biopsia	Producto de cirugía			
<b>Grupo sin NAT+</b> n=148	Bajo (<20%)	47	9	14	0,6344
	Alto (≥20%)	14			
<b>Grupo con NAT+</b> n=169	Bajo (<20%)	31	6	32	0,00288
	Alto (≥20%)	32			

\*Se excluyeron 10 casos del grupo con NAT y sin NAT para este análisis por falta de información en la expresión del Ki67. NAT: neoadyuvancia.

La evaluación del cambio en el receptor HER2 en el grupo con NAT tampoco mostró variaciones estadísticamente significativas ( $p=0,9716$ ). No obstante, se observó que de 127

casos inicialmente negativos para HER2, 11 cambiaron al estatus equívoco y 3 al positivo. Así mismo, de 29 casos positivos en la biopsia, 1 cambió al estatus equívoco y 6 al estatus negativo (concordancia: 80,8%) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Cambios en el estatus de HER2 en muestras de biopsia y producto de cirugía, en los grupos sin NAT y con NAT

	Quirúrgico			No. casos con ganancia de HER2	No. casos con pérdida de HER2	p valor	
	Biopsia	Negativo (0+/1+)	Equívoco (2+)				Positivo (3+)
<b>Grupo sin NAT+</b> n=154	<b>Negativo (0+/1+)</b>	105	13	5	21	7	0,2203
	<b>Equívoco (2+)</b>	5	6	3			
	<b>Positivo (3+)</b>	0	2	15			
<b>Grupo con NAT+</b> n=177	<b>Negativo (0+/1+)</b>	113	11	3	17	17	0,9716
	<b>Equívoco (2+)</b>	10	8	3			
	<b>Positivo (3+)</b>	6	1	22			

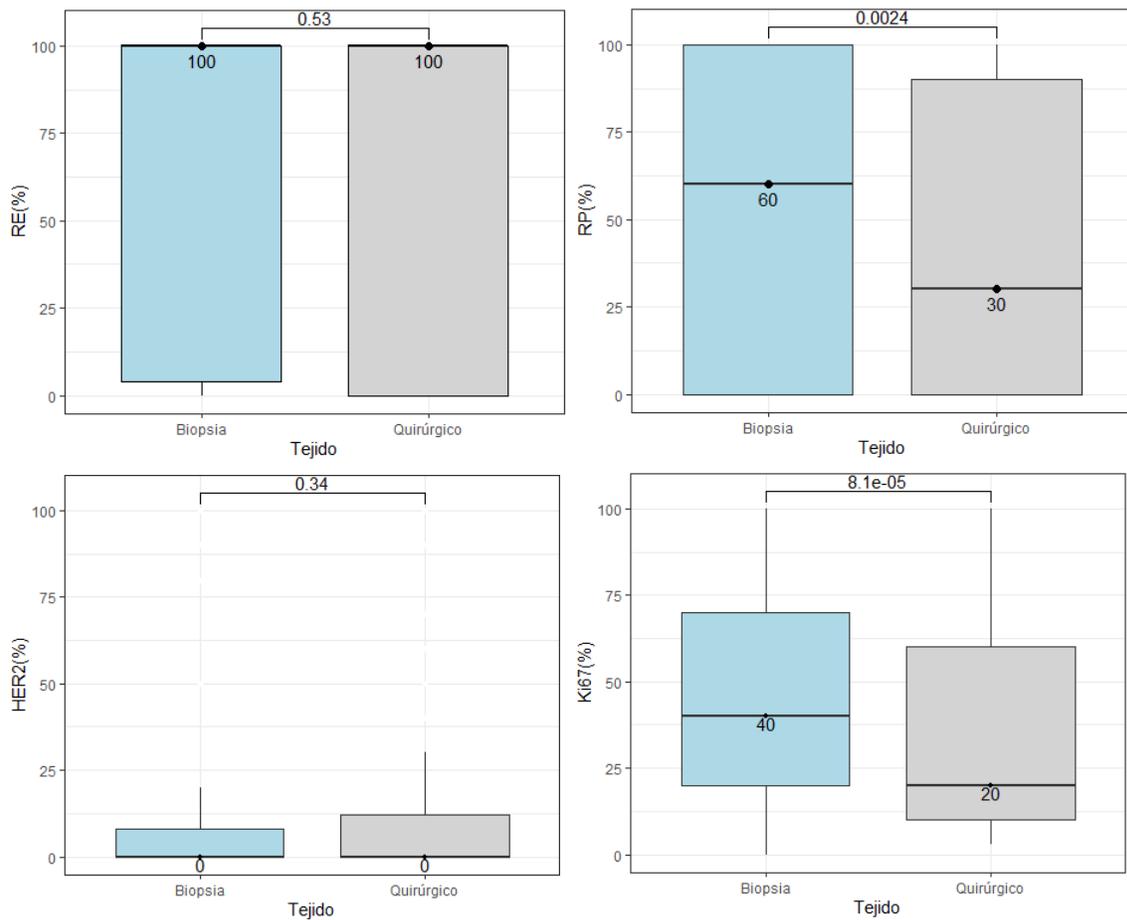
\*Se excluyeron 4 casos del grupo sin NAT, y 2 casos del grupo con NAT para este análisis por falta de información en la expresión del HER2. NAT: neoadyuvancia.

### Cambios en la clasificación en subtipos intrínsecos

Se evaluó el cambio en la asignación del subtipo intrínseco entre muestras pareadas de biopsia y producto quirúrgico, en el grupo con NAT, de acuerdo con los criterios establecidos en el panel de St. Gallen del 2013 (82). Se excluyeron 3 casos del análisis debido a que no fue posible clasificarlos por falta de información en la expresión del Ki67. La evaluación del cambio en la asignación del subtipo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras pareadas después de la NAT ( $p=0,1481$ ), sin embargo, fue posible observar una tendencia al aumento en el porcentaje de tumores luminales A después del tratamiento (Biopsia: 16,5% vs. Quirúrgico: 23,3%), así como también al aumento en el porcentaje de tumores no clasificables (Biopsia: 2,8% vs. Quirúrgico: 6,3%), que corresponden a casos con expresión equívoca (2+) del HER2 donde la información de los demás biomarcadores no permitió su clasificación dentro de las demás categorías (Tabla 6).

## Porcentaje de expresión de los biomarcadores

La evaluación del cambio en el porcentaje de expresión de los biomarcadores entre las biopsias y el producto quirúrgico, en muestras pareadas de casos con tratamiento previo, mostró una disminución significativa en el porcentaje de expresión del RP ( $p=0,0024$ ) y del Ki67 ( $p<0,001$ ). Para los demás biomarcadores no se observaron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de expresión después de la administración de NAT (RE:  $p=0,53$ ; HER2:  $p=0,34$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico en el grupo con NAT. Los puntos representan el valor de la mediana para cada biomarcador de acuerdo con el tejido evaluado. RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

## **7.4 Objetivo específico 2. Determinar el cambio en la expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2 y Ki67 en muestras de biopsia y producto de cirugía, de acuerdo con el esquema neoadyuvante recibido**

El análisis del cambio en la expresión de los biomarcadores en el primer objetivo mostró diferencias estadísticamente significativas en el grupo con NAT, lo que sugiere que el tratamiento previo a la cirugía modifica su expresión. No obstante, dado que el esquema de tratamiento varía de acuerdo con el perfil de los biomarcadores, se decidió evaluar si los cambios reportados en el grupo con NAT están asociados a uno de los esquemas farmacológicos. Para esto se agruparon los casos de acuerdo con el tipo de tratamiento, en esquema hormonal (n=10), citotóxico (n=122), citotóxico + trastuzumab (n=32) y combinado (citotóxico + hormonal) (n=15). Para cada grupo, se evaluó el cambio en el estatus y el porcentaje de expresión de los biomarcadores entre muestras pareadas (biopsia y espécimen quirúrgico). Debido a que el porcentaje de expresión del HER2 no se calcula de manera rutinaria en la práctica clínica, este dato solo se obtuvo para un grupo de 78 pacientes (NAT hormonal: 6 casos, citotóxica: 56 casos, citotóxica + trastuzumab: 11 casos, combinada: 5 casos).

### **7.4.1 Esquema hormonal**

Los resultados del análisis en muestras pareadas no mostraron diferencias significativas en el estatus de los receptores hormonales (RE:  $p=1$ ; RP:  $p=1$ ), ni tampoco del HER2 ( $p=1$ ). No obstante, para el biomarcador Ki67 fue posible observar un aumento en el número de casos con una baja expresión (<20%) en el producto quirúrgico ( $p=0,0388$ ) (Tabla 9). Por otro lado, la evaluación del cambio en el porcentaje de expresión mostró nuevamente una disminución estadísticamente significativa en el índice de proliferación Ki67 (17,5% vs 10%,  $p=0,0215$ ), y también del RP (95% vs 45%,  $p=0,0173$ ), pero no del RE ( $p=1$ ) ni del HER2 ( $p=0,422$ ) (Tabla 10).

### **7.4.2 Esquema citotóxico**

El análisis en muestras pareadas mostró una tendencia a la pérdida de positividad de los receptores hormonales (RE: 73,8% vs 70,5%,  $p=0,668$ ; RP: 63,6% vs 60,3%,  $p=0,691$ ) y,

al contrario, a la ganancia de positividad del receptor HER2 (0,4% vs 4,1%,  $p=0,244$ ) en el producto quirúrgico, sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Para el índice de proliferación Ki67 se encontró una disminución estadísticamente significativa en el número de casos con alta expresión (S20%) ( $p= 0,0325$ ) (Tabla 9). En línea con estos resultados, el análisis del cambio en los porcentajes de expresión después de la NAT citotóxica mostró una disminución estadísticamente significativa en el Ki67 (40% vs 20%,  $p= 0,0073$ ), y en el RP (60% vs 30%,  $p=0,0260$ ) (Tabla 10).

### **7.4.3 Esquema citotóxico + trastuzumab**

Para este esquema de tratamiento, se observó una tendencia a la pérdida de positividad de los receptores hormonales (RE: 65,6% vs 59,4%,  $p=0,796$ ; RP: 65,6% vs 56,2%,  $p= 0,608$ ) y del marcador Ki67 (92,9% vs 82,1%,  $p= 0,419$ ), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otro lado, para el HER2 se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de casos positivos después del tratamiento con este esquema neoadyuvante (81,2% vs 65,6,  $p= 0,0085$ ) (Tabla 9). Sin embargo, al evaluar la expresión del HER2 como una variable continua, solo fue posible observar una tendencia a la disminución en la expresión de este marcador después del tratamiento (95% vs 65%,  $p=0,672$ ). Para el biomarcador Ki67, se observó una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de expresión, del 50% en la biopsia al 30% en la pieza quirúrgica ( $p= 0,0363$ ), después de la administración de este esquema de NAT (Tabla 10).

### **7.4.4 Esquema combinado**

En el grupo de pacientes con el esquema combinado (NAT hormonal + citotóxica), no se observaron tendencias ni cambios significativos en el estatus de los receptores hormonales (RE:  $p=1$ ; RP:  $p=1$ ), ni en el HER2 ( $p=1$ ), a excepción del Ki67 donde, así como para los demás grupos de tratamiento, se observó una disminución en el número de casos con alta expresión (S20%), aunque este cambio no fue estadísticamente significativo (76,9% vs 61,5%,  $p= 0,671$ ) (Tabla 9). En línea con estos resultados, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de expresión para ningún biomarcador evaluado, aunque aun así fue posible observar una tendencia a la disminución en la expresión del RP (80% vs 20%,  $p= 0,362$ ) (Tabla 10).

**Tabla 9.** Cambios en estatus de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico, de acuerdo con el esquema de NAT recibido.

Estatus	Categoría	Esquema hormonal n = 10			Esquema citotóxico n = 122			Esquema citotóxico + trastuzumab n = 32			Esquema combinado n = 15		
		Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor
RE	Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	1	32 (26,2)	36 (29,5)	0,6684	11 (34,4)	13 (40,6)	0,7963	0 (0,0)	1 (6,7)	1
	Positivo	10 (100,0)	10 (100,0)		90 (73,8)	86 (70,5)		21 (65,6)	19 (59,4)		15 (100,0)	14 (93,3)	
RP	Negativo	1 (10,0)	2 (20,0)	1	44 (36,4)	48 (39,7)	0,6912	11 (34,4)	14 (43,8)	0,6084	3 (20,0)	3 (20,0)	1
	Positivo	9 (90,0)	8 (80,0)		77 (63,6)	73 (60,3)		21 (65,6)	18 (56,2)		12 (80,0)	12 (80,0)	
HER2	Equívoco	1 (10,0)	2 (20,0)	1	14 (11,6)	15 (12,4)	0,2439	6 (18,8)	3 (9,4)	0,00851	0 (0,0)	0 (0,0)	1
	Negativo	9 (90,0)	8 (80,0)		106 (87,6)	101 (83,5)		0 (0,0)	8 (25,0)		12 (85,7)	12 (85,7)	
	Positivo	0 (0,0)	0 (0,0)		1 (0,8)	5 (4,1)		26 (81,2)	21 (65,6)		2 (14,3)	2 (14,3)	
Ki67	Alto (S20%)	5 (50,0)	0 (0,0)	0,0388	91 (77,1)	75 (63,6)	0,0325	26 (92,9)	23 (82,1)	0,419	10 (76,9)	8 (61,5)	0,6709
	Bajo (<20%)	5 (50,0)	10 (100,0)		27 (22,9)	43 (36,4)		2 (7,1)	5 (17,9)		3 (23,1)	5 (38,5)	

NAT: neoadyuvancia; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.

**Tabla 10.** Cambios en el porcentaje de expresión de los biomarcadores en muestras de biopsia y producto quirúrgico, de acuerdo con el esquema de NAT recibido.

Mediana [IQR]	Esquema hormonal n = 10			Esquema citotóxico n = 122			Esquema citotóxico + trastuzumab n = 32			Esquema combinado n = 15		
	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor
RE	100 [100, 100]	100 [100, 100]	1	100 [0, 100]	100 [0, 100]	1	80 [0, 100]	90 [0, 100]	0,7781	100 [70, 100]	100 [100, 100]	0,5839
RP	95,00 [82,5, 100]	45 [3,2, 80]	0,01732	60 [0, 100]	30 [0, 90]	0,02604	30 [0, 80]	20 [0, 82,5]	0,9747	80 [1, 100]	20 [3, 95]	0,3621
HER2*	1,50 [0, 4,5]	0 [0, 0]	0,4227	0 [0, 0]	0 [0, 0]	0,1247	95 [57,5, 100]	65 [11, 100]	0,6726	0 [0, 0]	0 [0, 0]	1
Ki67	17,50 [11,2, 23,7]	10 [10, 10]	0,02154	40 [20, 70]	20 [10, 70]	0,00736	50 [28,7, 72,5]	30 [20, 60]	0,03639	30 [20, 80]	20 [12,5, 55]	0,2402

\*El cambio en la expresión del HER2 fue evaluado para 6 casos con NAT hormonal, 56 con NAT citotóxica, 11 con NAT citotóxica + trastuzumab, y 5 con NAT combinada. NAT: neoadyuvancia; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; IQR: rango intercuartílico.

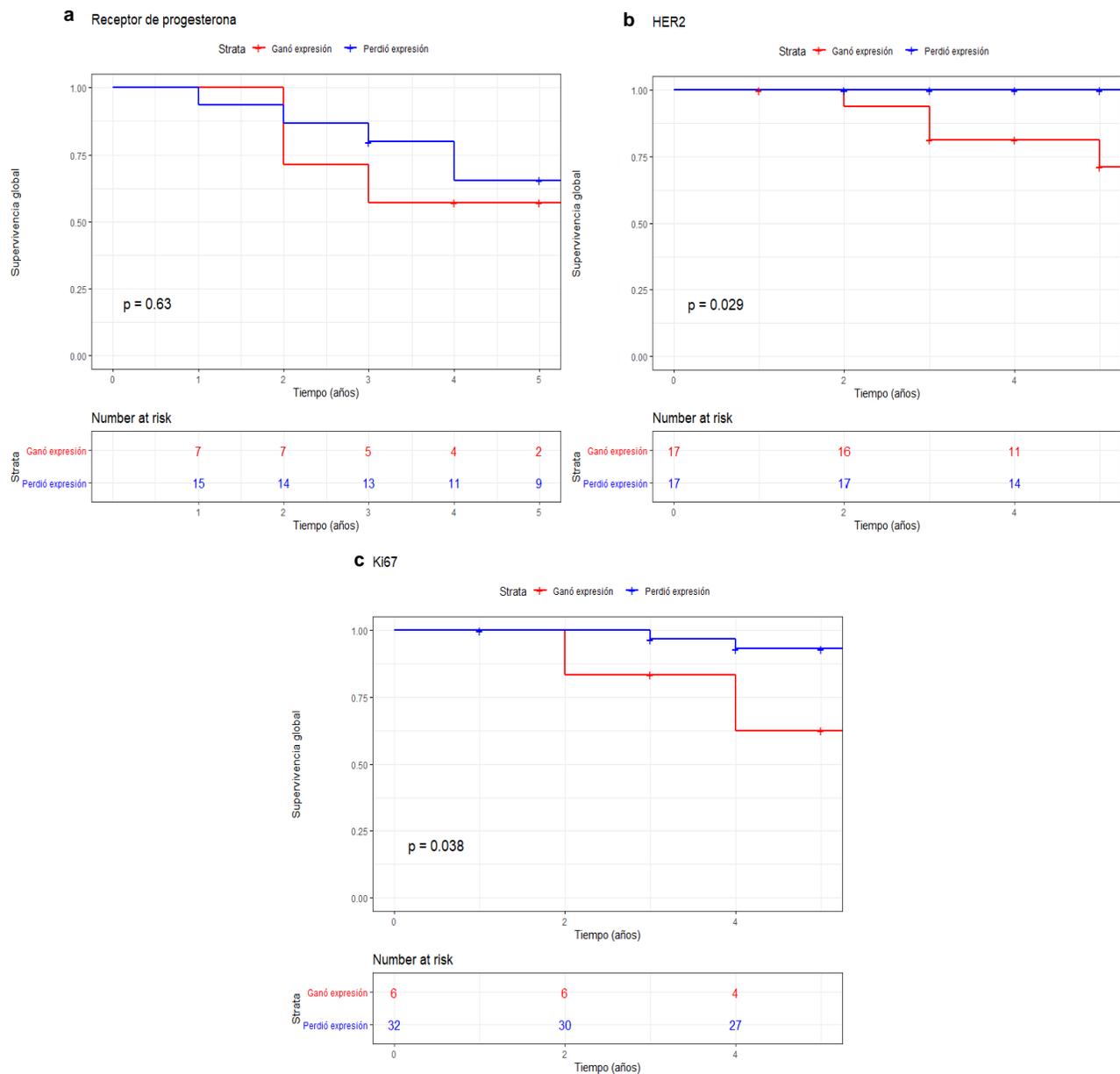
## **7.5 Objetivo específico 3. Analizar si los cambios en la expresión de los biomarcadores están asociados con diferencias en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.**

El análisis previo permitió identificar diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los biomarcadores entre la biopsia y la pieza quirúrgica, principalmente en el grupo con NAT, sugiriendo que estas variaciones se encuentran asociadas al tratamiento. No obstante, en el grupo de casos sin NAT también fue posible observar algunos cambios en la expresión de los biomarcadores. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar si las variaciones reportadas se encuentran asociadas con el pronóstico de los pacientes, se agruparon los casos de acuerdo con la pérdida y la ganancia en el estatus de los biomarcadores que presentaron mayor frecuencia de variación, en los grupos con NAT y sin NAT. En el primer grupo se incluyó el RP, HER2 y el Ki67, y en el segundo grupo se incluyó el HER2 y el Ki67.

### **7.5.1 Supervivencia global y libre de recurrencia**

#### **7.5.1.1 Grupo con NAT**

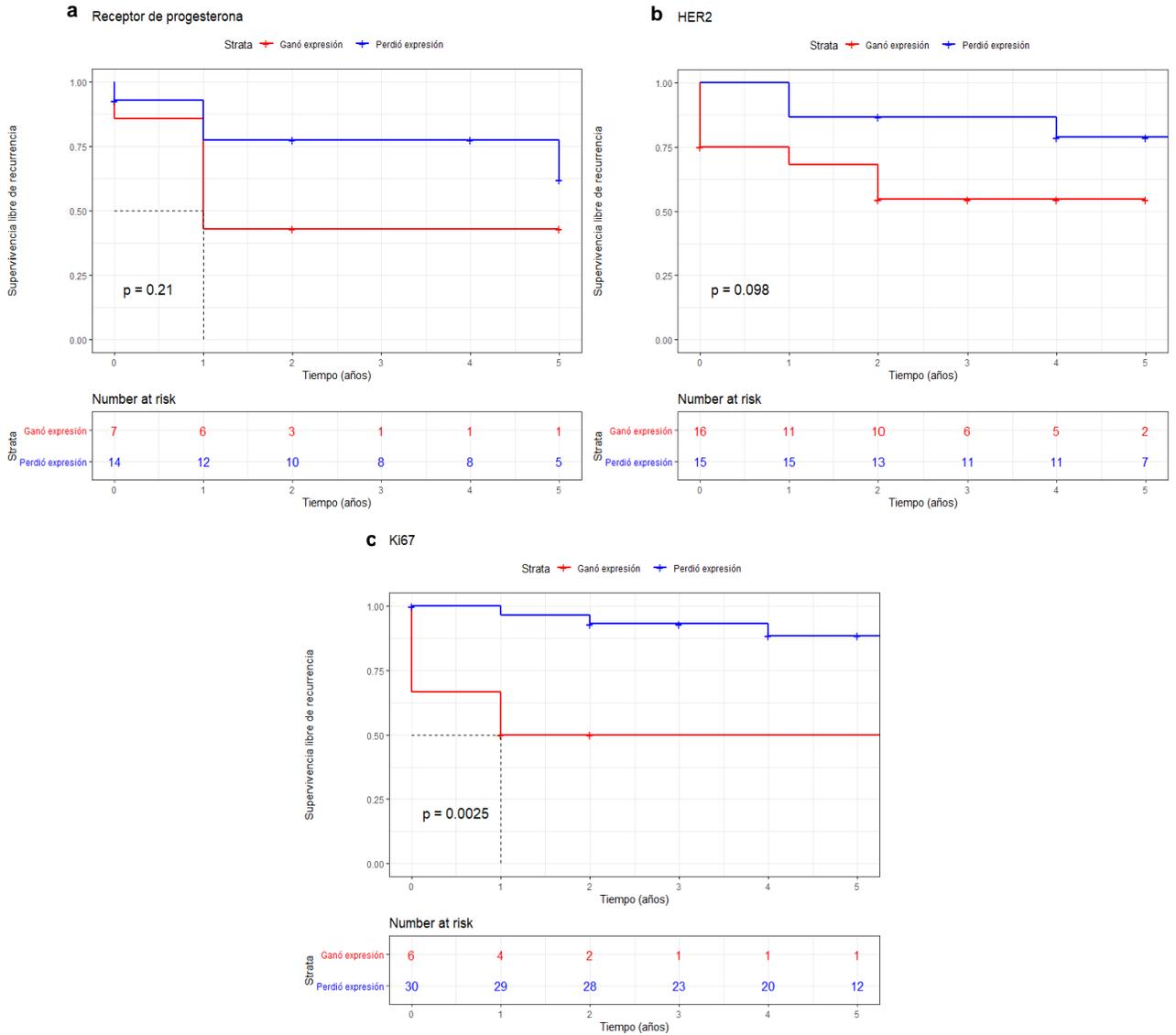
El tiempo de seguimiento medio para el grupo con NAT fue de 4,2 años. El tiempo medio de SG para los casos con pérdida del RP fue de 4,2 años, mientras que para el grupo con ganancia del receptor fue de 3,8 años ( $p=0,63$ ), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Con respecto al HER2 y el Ki67, se observó un tiempo medio de SG significativamente menor en los casos con ganancia de expresión de estos biomarcadores, respecto a los casos con pérdida de expresión (HER2: 4,5 años vs 5 años,  $p=0,029$ ; Ki67: 4,2 años vs 4,9 años,  $p=0,038$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Supervivencia global en los casos con pérdida y ganancia de expresión de los biomarcadores a) RP, b) HER2 y c) Ki67, en el grupo con NAT. RP: receptor de progesterona; NAT: neoadyuvancia.

Los resultados del tiempo medio de SLR en los casos con pérdida y ganancia del RP y HER2 no mostraron diferencias estadísticamente significativas (RP: 4,0 años vs 2,5 años,  $p=0,21$ ; HER2: 4,3 años vs 3,0 años,  $p= 0,098$ ) en ambos grupos. No obstante, fue posible observar una tendencia en el grupo con ganancia de HER2 a presentar menor SLR. Para

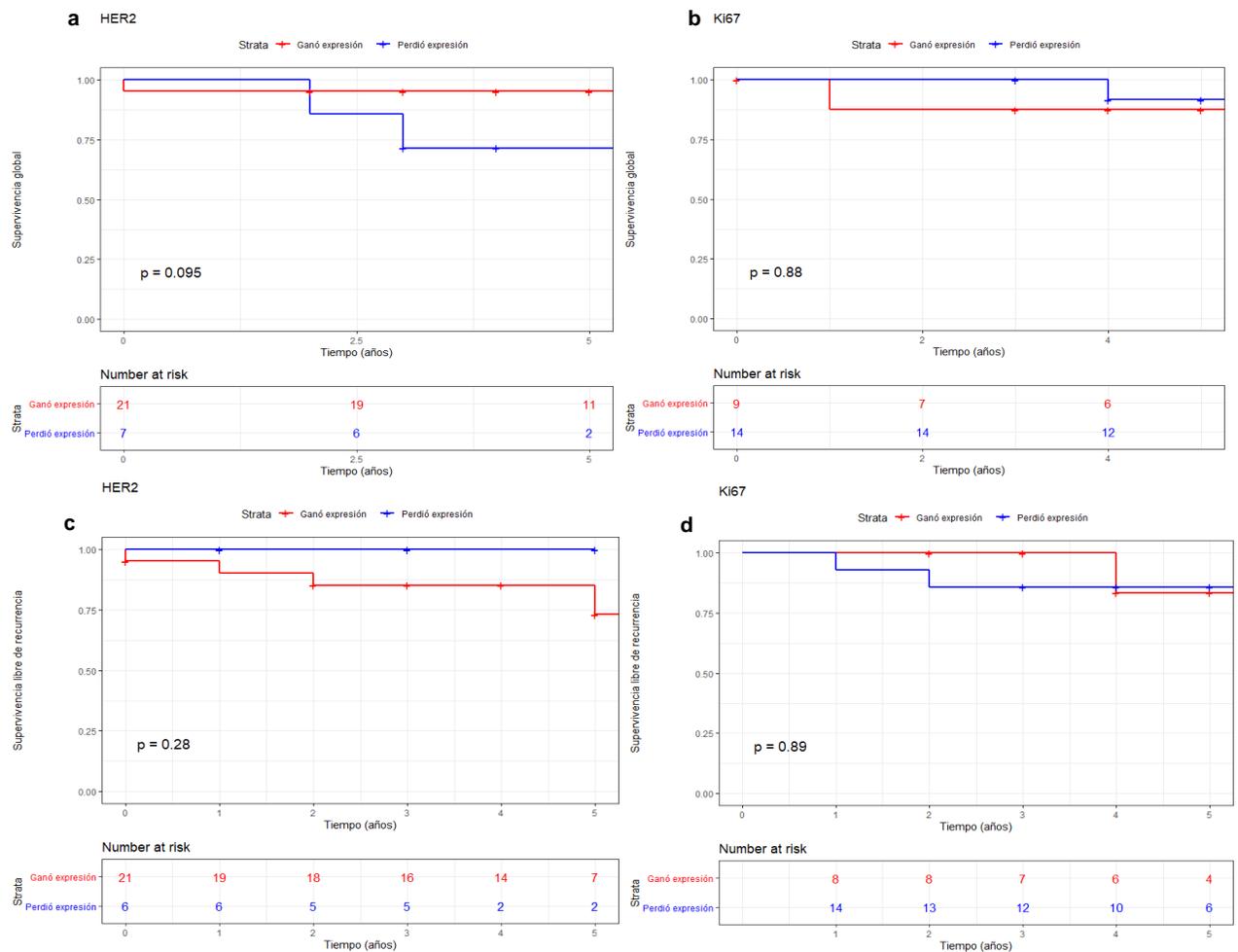
el índice de proliferación Ki67, se encontró un tiempo medio de SLR significativamente menor en los casos con ganancia del biomarcador, respecto a aquellos con pérdida (2,6 años vs 4,7 años,  $p=0,0025$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Supervivencia libre de recurrencia en los casos con pérdida y ganancia de expresión de los biomarcadores a) RP, b) HER2 y c) Ki67, en el grupo con NAT. RP: receptor de progesterona; NAT: neoadyuvancia.

### 7.5.1.2 Grupo sin NAT

El tiempo de seguimiento medio para el grupo sin NAT fue de 4,4 años. La SG para los casos con pérdida y ganancia del HER2 fue de 4,2 años y 4,7 años, respectivamente; no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,095$ ) (Figura 7a). De la misma manera, el tiempo medio de SG para los casos con pérdida y ganancia del biomarcador Ki67 (4,9 años vs 4,5 años, respectivamente) tampoco varió de manera significativa ( $p=0,88$ ) (7b). El análisis de SLR para ambos biomarcadores evaluados tampoco no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 7c y 7d).



**Figura 7.** Supervivencia global (a, b) y libre de recurrencia (c, d) en los casos con pérdida y ganancia de los biomarcadores HER2 (a, c) y Ki67 (b, d), en el grupo de casos sin NAT. NAT: neoadyuvancia.

## 7.5.2 Riesgo de mortalidad y recurrencia

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, donde se observaron diferencias en la SG y SLR de acuerdo con el cambio en el estatus de los biomarcadores, se llevó a cabo un modelo de riesgo proporcional de Cox en el grupo con NAT y sin NAT, para determinar si estas diferencias observadas podrían ser explicadas por otras variables clínico-patológicas que impacten el pronóstico de la enfermedad.

### 7.5.2.1 Selección de variables clínico-patológicas

Con el objetivo de seleccionar las variables clínico-patológicas asociadas con el pronóstico del cáncer de mama, e incluirlas en el modelo multivariado, se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox univariado para evaluar su asociación con el riesgo de mortalidad y de recurrencia en la totalidad de los casos. Este análisis mostró que los pacientes con el subtipo intrínseco HER2-enriquecido y TN al diagnóstico tienen un mayor riesgo de mortalidad y de recurrencia. Otras variables también asociadas con el pronóstico de la enfermedad fueron el estadio clínico, la respuesta a la NAT y el grado de diferenciación tumoral, por lo que estas fueron seleccionadas para ser incluidas en el modelo multivariado. Por otro lado, la administración de adyuvancia se encontró asociada con menor riesgo de mortalidad, pero no de recurrencia, por lo que esta variable fue seleccionada para el modelo de regresión multivariado de la SG. La edad, el compromiso de los bordes quirúrgicos y la invasión histológica no se encontraron asociadas con el riesgo de mortalidad y de recurrencia, por lo tanto, fueron excluidas para los análisis posteriores (Tabla 11).

**Tabla 11.** Modelo de riesgo proporcional de Cox univariado para la SG y SLR en las variables clínico-patológicas de pronóstico.

Factor	SG		SLR	
	HR (95% CI)	p valor	HR (95% CI)	p valor
<b>Edad</b>				
<50 años	1	0,257	1	0,862
≥50 años	1,40 (0,78 - 2,51)		1,04 (0,61 - 1,77)	
<b>Grado de diferenciación tumoral</b>				
I/II	1	<0,001	1	<0,001

III	3,57 (2,21 - 5,76)		3,04 (1,92 - 4,79)	
<b>Invasión histológica</b>				
Negativa	1	0,0544	1	0,143
Positiva	1,64 (0,99 - 2,73)		1,43 (0,88 - 2,31)	
<b>Compromiso de bordes quirúrgicos</b>				
Negativo	1	0,58	1	0,0866
Positivo	1,26 (0,54 - 2,91)		1,83 (0,91 - 3,68)	
<b>Subtipo intrínseco al diagnóstico</b>				
Luminal A	1		1	
Luminal B	1,79 (0,78 - 4,07)	0,1628	3,98 (1,42 - 11,16)	0,0084
HER2-enriquecido	3,64 (1,06 - 12,44)	0,0393	4,57 (1,02 - 20,46)	0,0465
Triple negativo	9,17 (4,01 - 20,95)	<0,001	15,91 (5,54 - 45,64)	<0,001
<b>Estadio clínico</b>				
I/II	1	<0,001	1	<0,001
III/IV	2,38 (1,47 - 3,86)		3,42 (2,09 - 5,62)	
<b>Respuesta a la NAT</b>				
Clínico-patológica	1		1	
Estable/parcial	1,10 (0,40 - 2,99)	0,84	0,73 (0,32 - 1,69)	0,475
Progresión	4,17 (1,53 - 11,36)	0,0051	2,79 (1,17 - 6,62)	0,0195
<b>Tratamiento adyuvante</b>				
No recibió	1	0,0016	1	0,831
Si recibió	0,32 (0,16 - 0,65)		0,88 (0,27 - 2,8)	

SG: supervivencia global; SLR: supervivencia libre de recurrencia; HR: cociente de riesgo. CI: intervalo de confianza; NAT: neoadyuvancia.

### 7.5.2.2 Análisis de riesgo según el cambio en la expresión de los biomarcadores

Se llevó a cabo un modelo univariado en los grupos con NAT y sin NAT para evaluar el impacto pronóstico del cambio en la expresión de los biomarcadores (Tabla 12), para posteriormente ajustarlo por aquellas variables clínico-patológicas previamente asociadas con el pronóstico de la enfermedad. Los resultados del primer análisis mostraron que la pérdida en la expresión del Ki67 después de la NAT está asociada con un mejor pronóstico de la enfermedad, donde aquellos casos con pérdida del biomarcador mostraron una reducción en el riesgo de recurrencia, respecto a aquellos con ganancia del biomarcador (HR: 0,11, 95% CI, 0,02-0,58,  $p=0,009$ ). También fue posible observar para el Ki67 una tendencia en los casos con pérdida del biomarcador después de la NAT, a presentar menor

riesgo de mortalidad, respecto a los casos con ganancia del biomarcador (HR: 0,16, 95% CI, 0,02 -1,14,  $p=0,0675$ ). De la misma manera, los casos con pérdida del receptor HER2 después de la NAT presentaron una tendencia a presentar menor riesgo de mortalidad (HR: 0,14, 95% CI, 0,01-1,25,  $p=0,0786$ ). Por otro lado, el cambio en la expresión del HER2 y el Ki67 en el grupo sin NAT no se encontró asociada con diferencias en el riesgo de mortalidad y recurrencia del cáncer de mama.

**Tabla 12.** Modelo de riesgo proporcional de Cox univariado para la SG y SLR en los grupos con ganancia y pérdida de los biomarcadores, según la administración de NAT.

Factor	SG		SLR	
	HR (95% CI)	p valor	HR (95% CI)	p valor
<b>Grupo con NAT</b>				
<b>RP</b>				
Ganancia de expresión	1	0,622	1	0,200
Pérdida de expresión	0,69 (0,16 - 2,92)		0,40 (0,09 - 1,62)	
<b>HER2</b>				
Ganancia de expresión	1	0,0786	1	0,112
Pérdida de expresión	0,14 (0,01 - 1,25)		0,33 (0,08 - 1,29)	
<b>Ki67</b>				
Ganancia de expresión	1	0,0675	1	0,009
Pérdida de expresión	0,16 (0,02 -1,14)		0,11 (0,02 - 0,58)	
<b>Grupo sin NAT</b>				
<b>HER2</b>				
Ganancia de expresión	1	0,143	1	0,882
Pérdida de expresión	6,01 (0,54 - 66,34)		0,84 (0,09 - 7,57)	
<b>Ki67</b>				
Ganancia de expresión	1	0,881	1	0,887
Pérdida de expresión	1,20 (0,10 -13,36)		1,19 (0,10 - 13,14)	

SG: supervivencia global; SLR: supervivencia libre de recurrencia; HR: cociente de riesgo; CI: intervalo de confianza; RP: receptor de progesterona; NAT: neoadyuvancia.

Con el objetivo de evaluar si la asociación reportada entre el cambio en la expresión del biomarcador Ki67 con la recurrencia de la enfermedad, en el grupo con NAT, puede ser explicada por diferencias en la presentación de variables clínico-patológicas de pronóstico, se ajustó el modelo por el grado de diferenciación tumoral y la respuesta a la NAT. No se incluyó el subtipo intrínseco al diagnóstico ni el estadio clínico debido a que todos los casos con ganancia y pérdida del Ki67 presentaron tumores del subtipo luminal B y estadio clínico III, por lo que no hubo necesidad de ajustar por estas variables. El resultado del modelo

multivariado mostró que aun cuando se controla por las variables de confusión anteriormente mencionadas, la pérdida en la expresión del marcador de proliferación Ki67 se encuentra asociada significativamente con un pronóstico más favorable, donde aquellas mujeres con disminución en la expresión del biomarcador Ki67 presentaron una reducción significativa en el riesgo de recurrencia (HR: 0,12, 95% CI, 0,01–0,98,  $p=0,0483$ ) (Tabla 13). Este análisis no se llevó a cabo para los demás biomarcadores, dado que la asociación con el riesgo de mortalidad y recurrencia en el modelo univariado no fue estadísticamente significativa.

**Tabla 13.** Modelo de riesgo proporcional de Cox univariado y multivariado para la SLR, de acuerdo con el cambio en la expresión del biomarcador Ki67, en el grupo con NAT.

SLR	Univariado		Multivariado*	
Factor	HR (95% CI)	p valor	HR (95% CI)	p valor
<b>Grupo con NAT</b>				
<b>Ki67</b>				
Ganancia de expresión	1	0,009	1	0,0483
Pérdida de expresión	0,11 (0,02 – 0,58)		0,12 (0,01 – 0,98)	

SLR: supervivencia libre de recurrencia; HR: cociente de riesgo; NAT: neoadyuvancia. CI: intervalo de confianza. \*Ajustado por el grado de diferenciación tumoral y la respuesta a la NAT.

### 7.5.2.3 Variación en el grado de diferenciación tumoral de acuerdo con cambio de Ki67

Dado que los resultados obtenidos previamente indican que el cambio en la expresión del Ki67 después de la NAT impactan la supervivencia y el riesgo de recurrencia de las pacientes con cáncer de mama, se evaluó si este evento se encuentra también asociado con cambios en el grado de diferenciación tumoral según la escala Scarff–Bloom–Richardson, en el grupo con NAT. Al analizar estas diferencias en casos con ganancia y pérdida de Ki67, fue posible observar que ninguno de los dos eventos se asoció con cambios estadísticamente significativos en el grado tumoral (pérdida:  $p=0,4851$ ; ganancia:  $p=0,1824$ ), no obstante, en los casos con ganancia de Ki67 fue posible observar una tendencia al aumento en el porcentaje de tumores con grado tumoral III, del 0% en la biopsia a 50% en la pieza quirúrgica (Tabla 14).

**Tabla 14.** Cambio en el grado de diferenciación tumoral según la escala Scarff–Bloom–Richardson, de acuerdo con la pérdida y ganancia del Ki67 en el grupo con NAT.

Grupo con NAT	Scarff-Bloom Richardson	Biopsia N (%)	Quirúrgico N (%)	p valor
Pérdida de Ki67 (n=32)	I	1 (3,2)	3 (10,0)	0,4851
	II	27 (87,1)	23 (76,7)	
	III	3 (9,7)	4 (13,3)	
Ganancia de Ki67 (n=6)	I	0 (0)	0 (0)	0,1824
	II	6 (100,0)	3 (50,0)	
	III	0 (0)	3 (50,0)	

NAT: neoadyuvancia.

## 8. DISCUSIÓN

En este de trabajo de investigación se propuso la evaluación de los cambios en la expresión de los biomarcadores de cáncer de mama (RE, RP, HER2 y Ki67) en muestras pareadas de biopsia y producto de cirugía en casos con tratamiento previo neoadyuvante, pero a la vez, en casos sin NAT, con el objetivo de determinar si el tratamiento neoadyuvante se encuentra asociado a las variaciones en el perfil de los biomarcadores, y al mismo tiempo evaluar el impacto en el pronóstico que confiere este evento en las pacientes con la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la NAT es el principal factor asociado a estos cambios, induciendo la disminución significativa en los porcentajes de expresión de los biomarcadores, principalmente del RP y del Ki67. No obstante, solamente la pérdida en la expresión del Ki67 después de la NAT, se encontró asociado con un mejor pronóstico de la enfermedad, confiriendo un menor riesgo de recurrencia.

El marcador Ki67 es una proteína nuclear, la cual se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), con excepción de la fase G0, lo cual lo hace un marcador útil para evaluar el estado de proliferación de las células tumorales (170,171). Como consecuencia de la administración de fármacos quimioterapéuticos, los cuales bloquean por diferentes mecanismos la proliferación celular, se han reportado disminuciones en la expresión de

este biomarcador después de la NAT (172,173), lo cual es consistente con los resultados reportados en este estudio. Por otra parte, con menor frecuencia, también se han reportado

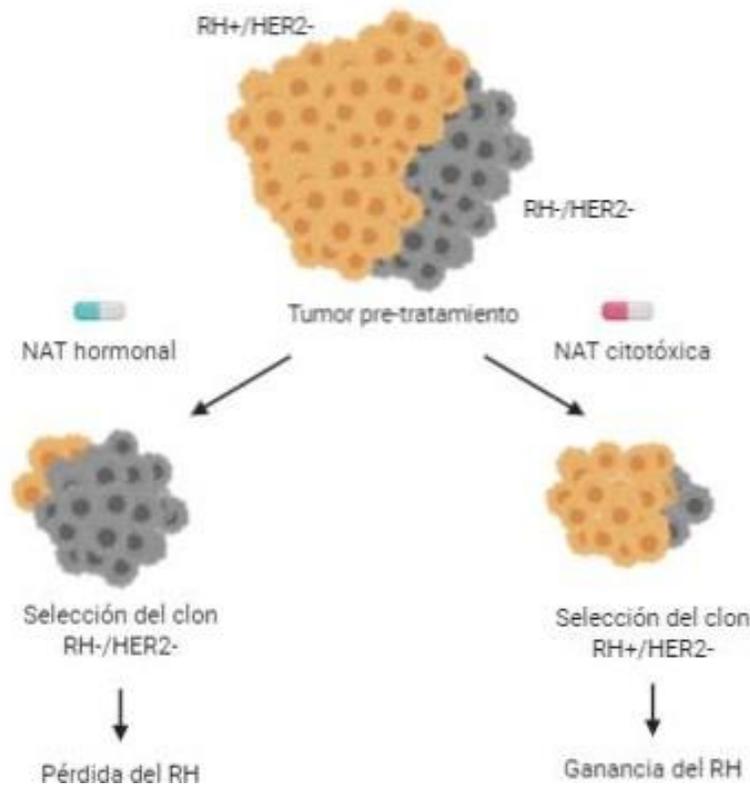
casos donde se presentan ganancias en la expresión de Ki67 después de la NAT (174). Este evento se ha asociado con mayor riesgo de recurrencia y menor supervivencia, comparado con pacientes con bajos niveles de expresión de Ki67, posterior al tratamiento (175). Incluso en estudios donde se han llevado a cabo análisis multivariados, se ha reportado la expresión del Ki67 como un factor pronóstico independiente para la recurrencia y supervivencia de la enfermedad (170,176). Lo anterior es concordante con los resultados de este estudio, donde también se observaron menores tiempo de SG y SLR en pacientes con ganancia en la expresión del Ki67 posterior a NAT, además de también haberse encontrado asociado de manera independiente con el riesgo de recurrencia de la enfermedad. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió evaluar si el cambio en el Ki67 después de la NAT también se encontraba asociado con diferencias en el grado de diferenciación tumoral, una variable con importante valor pronóstico (177,178), y a pesar de que este análisis no mostró cambios estadísticamente significativos, es posible que lo anterior sea consecuencia del bajo tamaño de muestra en los grupos con ganancia (n=6) y pérdida de la expresión de este biomarcador (n=32).

Los estudios anteriormente mencionados, junto con los resultados obtenidos en este estudio, demuestran la importancia de implementar la evaluación del Ki67 después de la NAT, con el objetivo de seleccionar aquellos pacientes con un pronóstico menos favorable, y a ellos poder brindarles mejores estrategias para el manejo de la enfermedad. Por otro lado, los resultados aquí presentados demuestran que este biomarcador no cambia de manera significativa en casos sin NAT, y aun en aquellos donde fue posible observar variaciones en su expresión, este evento no se encontró asociado con el pronóstico de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior, no se considera indispensable la reevaluación del Ki67 en pacientes que no han recibido previamente NAT.

Actualmente, la respuesta patológica completa (pCR) representa una de las variables con mayor valor pronóstico en el cáncer de mama, especialmente en la valoración de la supervivencia de los pacientes. Este marcador permite clasificar aquellos que tendrán un desenlace favorable, de aquellos que probablemente no lo tendrán (179). No obstante, aún es necesaria la implementación de nuevos marcadores que permitan definir el pronóstico de los casos que no alcanzaron una pCR (180). Para este grupo de pacientes como alternativa, se ha propuesto la evaluación de los cambios en el porcentaje de expresión del RP, dado que al igual que el Ki67, su expresión cambia con frecuencia después de la NAT, y estos cambios se han asociado con el pronóstico de la enfermedad (14,28,181). Los

resultados presentados en este estudio demuestran que la expresión del RP disminuye de forma significativa después de la NAT, especialmente en casos tratados con los esquemas hormonal y citotóxico. No obstante, al evaluar el impacto pronóstico que confiere este cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los casos con pérdida del RP, respecto a los casos con ganancia del receptor, ni tampoco se encontró que la pérdida del RP confiera un mayor riesgo de mortalidad y de recurrencia de la enfermedad. Estos resultados difieren de lo reportado en otros estudios, donde la pérdida en la expresión del RP se ha encontrado asociada con una menor supervivencia, así como con la presentación de variables clínico-patológicas de pronóstico desfavorable (tumores >2cm y compromiso ganglionar) (14,16,182,183). Esta discordancia puede deberse al bajo tamaño de muestra en los grupos evaluados, por lo que aún es necesario seguir explorando estos resultados en un mayor tamaño de muestra.

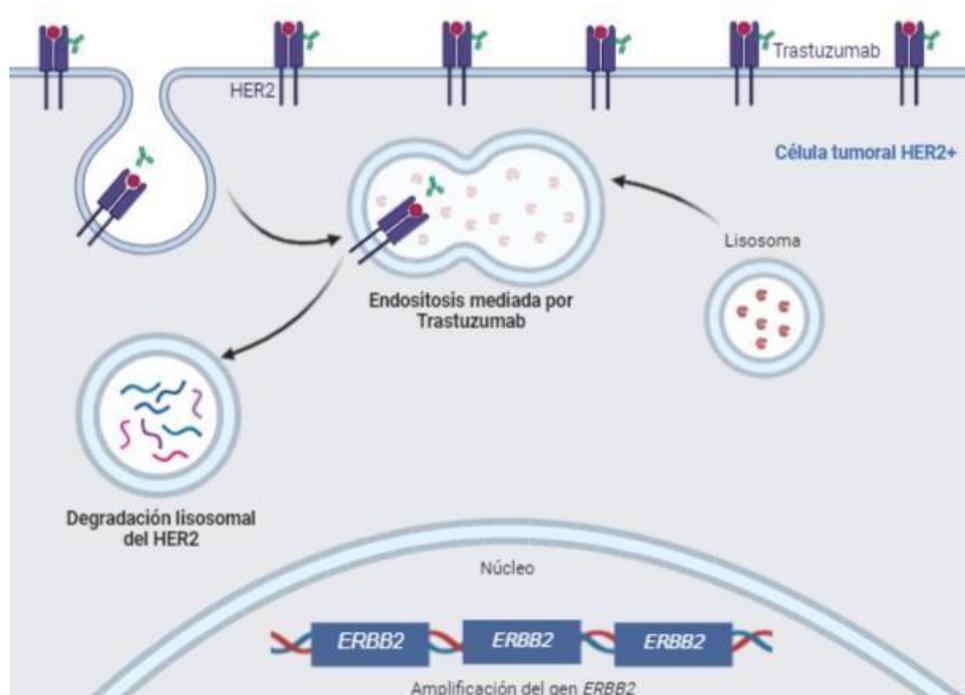
Dentro de las hipótesis que explican la pérdida en la expresión del RP después de la NAT, se encuentra la supresión de la función ovárica inducida por el tratamiento, que consecuentemente disminuye los niveles hormonales circulantes en sangre, generando inhibición en la expresión de sus receptores (25). Otra hipótesis incluye la selección positiva de clones que no expresan los receptores hormonales, inducido por la NAT, generando la disminución de las células RE/RP positivas en el tumor residual (184,185) (Figura 8). Dado el importante valor pronóstico del cambio en el RP después de la NAT, su reevaluación en la pieza quirúrgica podría ser implementada como una estrategia adicional para evaluar el pronóstico de aquellos pacientes sin pCR. De hecho, se ha propuesto estudiar su expresión, junto con la del Ki67 después de la NAT, para valorar la recurrencia de pacientes con tumores del subtipo luminal B/HER2 negativo (183).



**Figura 8.** Ilustración de la selección clonal inducida por la NAT, asociado al cambio en la expresión de los biomarcadores de mama (184,185). RH: receptor hormonal. NAT: neoadyuvancia.

La evaluación del biomarcador HER2 en los tumores de mama es actualmente una de las principales herramientas para valorar el pronóstico de la enfermedad, así como para guiar el tratamiento de los pacientes (186). Aun cuando la expresión per se del HER2 se considera de mal pronóstico, este evento confiere la posibilidad de administrar tratamientos blanco-dirigidos como el anticuerpo monoclonal trastuzumab, lo cual ha cambiado drásticamente de forma positiva el curso de la enfermedad durante los últimos años (187). Estudios previos han reportado que el cambio en el perfil de los biomarcadores, incluyendo el HER2, puede impactar el manejo terapéutico de la enfermedad (28). No obstante, la frecuencia de variación de este biomarcador después de la NAT es baja, comparada con la del Ki67 y el RP (20). Lo anterior es consistente con los resultados reportados en este estudio, donde tampoco se identificaron cambios estadísticamente significativos en el estatus ni el porcentaje de expresión del HER2, en los grupos con NAT y sin NAT. No

obstante, al evaluar los cambios en HER2 de acuerdo con el esquema de NAT, fue posible observar una disminución significativa en el número de casos positivos en el grupo con NAT citotóxica + trastuzumab. Este evento también ha sido reportado en otros estudios (188–190). Ignatov y colaboradores (188) encontraron una asociación entre la administración de trastuzumab con la pérdida de la expresión del HER2, donde el 47.3% de los casos tratados con dicho anticuerpo presentaron pérdida de la expresión de HER2; este evento incluso aumentó al 63.2% con la adición de pertuzumab al esquema de tratamiento. A pesar de que los mecanismos que explican la pérdida del HER2 inducido por el trastuzumab aún no se han dilucidado completamente, se ha propuesto que este agente tiene la capacidad de inducir su internalización mediada por endosomas y degradación lisosomal (191,192) (Figura 9). Otras hipótesis sostienen que el cambio en el receptor HER2 puede ser producto de la eliminación de los clones positivos, dejando en el tejido células tumorales negativas para el biomarcador, de la misma manera en que se ilustra en la Figura 8 para los receptores hormonales. Lo anterior se sugiere por los resultados de los ensayos donde se ha demostrado que el tratamiento con trastuzumab no solo induce la pérdida en la expresión del HER2, sino también puede inducir la pérdida de la amplificación del gen *ERBB2* (190).



**Figura 9.** Ilustración del mecanismo de endocitosis del receptor HER2 mediado por el anticuerpo monoclonal trastuzumab, y su degradación lisosomal, generando la pérdida en la expresión del receptor (191,192).

Por otra parte, la ganancia en la expresión del receptor HER2 ha sido observada con menor frecuencia, especialmente en casos con esquemas de NAT basados en tratamiento citotóxico exclusivo (193,194). Un estudio de González-Angulo y colaboradores (195), en el cual se analizaron las diferencias en los perfiles de expresión génica en muestras pareadas de tumores de mama pre- y post- tratamiento, mostró que los tumores clasificados como HER2 negativos al diagnóstico presentaron un aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm de *ERBB2*, después de la NAT citotóxica. Lo anterior es similar a los resultados obtenidos en este estudio, donde a pesar de no ser estadísticamente significativos, fue posible observar una tendencia a ganar positividad en la expresión del receptor HER2 en los casos tratados con el esquema citotóxico. Adicionalmente, el análisis de supervivencia mostró que este evento se encuentra asociado con un desenlace desfavorable, donde aquellos casos con ganancia del HER2 presentaron una menor SG. Los mecanismos biológicos que explican este evento aún siguen sin ser dilucidados completamente. Algunas hipótesis sostienen que la terapia citotóxica podría inducir procesos de selección clonal y mecanismos de resistencia que regulan positivamente eventos como la sobreexpresión del HER2 (196). Por otro lado, este cambio podría a la vez estar correlacionado con las variaciones en los demás biomarcadores, dado que la expresión de los receptores hormonales y del HER2 pueden regularse mutuamente (197).

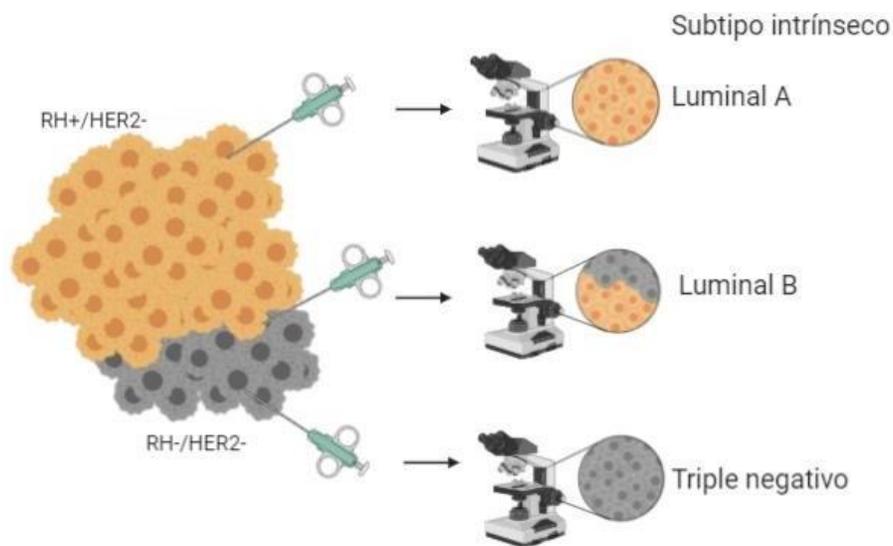
Por otra parte, la pérdida de la expresión de HER2 se ha visto asociada con una menor supervivencia y una menor tasa de pCR (27,190,198). Esto es opuesto a los resultados reportados en este estudio en donde en el modelo univariado de Cox se encontró una asociación sugestiva entre la pérdida de la expresión de HER2 con un menor riesgo de mortalidad ( $p=0,07$ ). A pesar de que aún no es claro cómo afectan los cambios en el HER2 después de la NAT el pronóstico de las pacientes, es posible que la mejor supervivencia asociada a la pérdida del receptor reportada en este estudio pueda ser consecuencia de la disminución de la tasa proliferativa del tumor (199). Lo anterior se analizó en los casos con variación en HER2, donde fue posible observar una tendencia en el grupo con pérdida del receptor a presentar mayor expresión del marcador de proliferación Ki67 (datos no mostrados). Analizando los resultados desde otra perspectiva, se observó que los casos con ganancia de HER2 después de la NAT presentaron una menor SG. Lo anterior puede ser el resultado de que, al no detectarse la expresión del biomarcador en la biopsia al momento del diagnóstico, estos casos no hayan podido beneficiarse de la terapia con trastuzumab. Es necesario seguir explorando este evento en un mayor número de pacientes.

Se ha descrito ampliamente que la expresión del RE es uno de los principales marcadores de pronóstico en el cáncer de mama. Su expresión se asocia con tumores bien diferenciados y con menor capacidad infiltrante (25). Su evaluación es determinante para la selección de tratamientos de tipo hormonal, por lo cual, la variación del RE tiene importantes implicaciones para manejo de la enfermedad (28). Al igual que para el HER2, la tasa de cambio del RE es menor que lo descrito para el RP y el Ki67 (22,25). Múltiples estudios no han encontrado cambios estadísticamente significativos en este biomarcador después de la administración de NAT (14,19,200), lo cual es consistente con lo observado en este estudio, donde tampoco fue posible observar diferencias en el estatus, ni en el porcentaje de expresión después de la NAT. No obstante, contrario a este resultado, la evaluación en el porcentaje de expresión en el grupo de casos sin NAT mostró diferencias significativas entre las muestras pareadas. Debido a que ningún estudio anterior ha reportado previamente cambios estadísticos para el RE en casos sin tratamiento previo, se decidió evaluar si este resultado podía ser producto de la variabilidad de lectura por el observador. A pesar de que el segundo análisis solo se realizó sobre 61 casos sin NAT, fue posible observar que una vez la evaluación de este biomarcador es realizada de manera homogénea por el mismo patólogo, el cambio en el porcentaje de expresión del RE pierde la significancia estadística. Lo anterior sugiere que la variabilidad inter-observador es una variable para tener en cuenta cuando se ha de evaluar el cambio del perfil de los biomarcadores de cáncer de mama.

El objetivo inicial de incluir un grupo de casos sin NAT en el proyecto iba dirigido a poder detectar cambios en la expresión de los biomarcadores, no solo producto de la NAT, sino también de otros factores, dado que múltiples estudios aseguran que eventos como la heterogeneidad intratumoral, la poca representación del tumor en la biopsia y la presencia de falsos negativos y positivos por la técnica, también pueden influir en la expresión de los biomarcadores en la pieza quirúrgica (14,25,188,189). Como se mencionó anteriormente, los resultados en este estudio mostraron diferencias en la expresión del RE en casos sin NAT, lo cual se asoció posteriormente a un efecto por la variabilidad inter-observador. No obstante, otros factores posiblemente asociados como la heterogeneidad intratumoral, no fue posible valorarlos mediante el diseño de este estudio.

La evaluación de la heterogeneidad intratumoral implica la revisión de la totalidad del material quirúrgico (14,201), y no solo de una sección del tejido, como fue el caso para este estudio. A pesar de que debido a esta limitante no fue posible evaluar la asociación de este

factor con el cambio de los biomarcadores, este evento ha sido ampliamente descrito por otros autores. Zhou y colaboradores (14) evaluaron el estatus del biomarcador HER2 por IHQ y FISH de manera detallada en el producto de la cirugía, y pudieron identificar la heterogeneidad intratumoral en la amplificación del gen *ERBB2*, así como regiones del tumor con diferentes niveles de expresión semicuantitativa del receptor por técnicas de IHQ. Así mismo, también se demostró que los tumores de mayor tamaño (>2cm) presentan mayor tasa de cambio en la expresión de los receptores hormonales. Este evento se ha asociado a un efecto de dilución de la muestra en aquellos tumores de mayor tamaño, donde el porcentaje de expresión de los biomarcadores disminuye a medida que aumenta el número de células disponibles para evaluar en el tejido (202,203). Este efecto también puede repercutir en la clasificación molecular de los tumores, como fue demostrado por González-Angulo y colaboradores (195), en un estudio donde se evaluó el efecto del muestreo en la asignación del tumor en subtipos moleculares, aplicando el panel de genes PAM50. Sus resultados demostraron que la clasificación molecular del mismo tumor puede variar de acuerdo con el método de muestreo utilizado, confirmando la presencia de diferentes clones celulares a lo largo del tejido, que no es posible evaluar en su totalidad, en una sola biopsia (Figura 10).



**Figura 10.** Ilustración del efecto del muestreo durante la biopsia del tumor inicial en la evaluación del perfil de los biomarcadores de mama, y su clasificación en subtipos intrínsecos (195). RH: receptor hormonal.

La heterogeneidad intratumoral está directamente relacionada con la coexistencia de diferentes subclones tumorales, cada uno con distintas características moleculares dentro del mismo tejido (201,204). Este evento se considera uno de los principales determinantes de la resistencia terapéutica y la falla en el tratamiento de la enfermedad. Muchos pacientes son sometidos a regímenes terapéuticos específicos, aun cuando solo un pequeño porcentaje de las células del tumor son positivas para el blanco a tratar, razón por la cual la heterogeneidad intratumoral se asocia con bajas tasas de supervivencia (186,201,205,206). A pesar de que en este estudio no se evaluó directamente la heterogeneidad en el tejido, aun así, fue posible observar la presencia de factores como la variabilidad en la lectura por el observador, lo cual podría ser una consecuencia indirecta de dicha heterogeneidad. Por esta razón, se decidió igualmente evaluar las implicaciones en la supervivencia que tienen estos cambios en los casos sin NAT con variaciones para HER2 y Ki67. No obstante, en dicho análisis no fue posible detectar diferencias significativas en la SG y SLR para ninguno de los biomarcadores. De la misma manera, el análisis univariado de Cox no detectó diferencias en el riesgo de mortalidad y recurrencia de acuerdo con el cambio en la expresión del HER2 y el Ki67. Aun cuando los resultados expuestos en este estudio no muestran diferencias en la supervivencia para aquellos casos, es necesario seguir explorando las implicaciones clínicas de estos cambios en el cáncer de mama, dada la naturaleza altamente heterogénea y dinámica de estos tumores (207). Incluso, como consecuencia de este evento, se ha propuesto la posibilidad de caracterizar múltiples veces a lo largo del tratamiento las lesiones individuales de los pacientes con cáncer de mama (201).

Dentro de las principales limitantes de este proyecto se encontró el bajo tamaño de muestra en los diferentes grupos de estudio, lo cual pudo haber limitado el poder estadístico de los análisis, especialmente durante la evaluación de los cambios en los biomarcadores de acuerdo con el esquema de NAT. Adicionalmente, dado que solo se evaluó la expresión de los biomarcadores en uno de los fragmentos de la pieza quirúrgica, no fue posible valorar la presencia de heterogeneidad intratumoral. Por lo tanto, se considera necesario explorar la totalidad del tejido en los próximos estudios. Adicionalmente, dentro de los resultados aquí reportados se resalta la importancia de que la lectura de los biomarcadores para un mismo paciente se lleve a cabo preferiblemente por un solo patólogo, con el objetivo de evitar sesgos en los resultados emitidos como consecuencia de la variabilidad por el observador.

## **9. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la NAT es el principal factor asociado a los cambios en la expresión de los biomarcadores, utilizados para la clasificación de los tumores en subtipos intrínsecos. Estos cambios corresponden principalmente a la pérdida en la expresión del RP y del Ki67. Adicionalmente, se demostró que la administración de tratamiento citotóxico en conjunto con el anticuerpo monoclonal trastuzumab, es capaz de disminuir la positividad del HER2. Las variaciones reportadas en los biomarcadores de mama producto de la NAT, tienen un impacto en el desenlace de los pacientes, donde la pérdida en la expresión del marcador de proliferación Ki67 se encontró asociado con una mejor supervivencia, así como con un menor riesgo de recurrencia, independiente de otras variables clínico-patológicas importantes para el pronóstico de la enfermedad. Otros factores como la variabilidad de lectura por el observador también pueden estar asociados a la presentación de cambios en los biomarcadores de cáncer de mama, razón por la cual se considera importante asegurar la homogeneidad de la lectura de los biomarcadores para un mismo paciente. A partir de los resultados presentados en este estudio, se propone la reevaluación de los biomarcadores de mama, principalmente del Ki67 en el producto de la cirugía de los pacientes que recibieron NAT, como una estrategia prometedora, capaz de brindar importante información para evaluar el pronóstico y el riesgo de recurrencia de la enfermedad.

## **10. PERSPECTIVAS**

A partir de este estudio, se plantea la realización de un trabajo de investigación en el cual se evalúe la presencia de la heterogeneidad intratumoral en el cáncer de mama, y su asociación con los cambios en la expresión de los biomarcadores de clasificación en subtipos intrínsecos, para así mismo poder evaluar el impacto de este evento en la supervivencia, y en el riesgo de mortalidad y recurrencia de la enfermedad.

## 11. REFERENCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394–424.
2. Globocan. Breast: Cancer incidence and mortality statistics worldwide and by region [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 29]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
3. Skibinski A, Kuperwasser C. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* [Internet]. 2015;34(42):5309–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.475>
4. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: Is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2009;6(12):718–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.166>
5. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2012 Oct [cited 2018 Mar 21];38(6):698–707. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737211002441>
6. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Sep 11 [cited 2018 Mar 21];98(19):10869–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815>
7. Kwa M, Makris A, Esteva FJ. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017;14(10):595–610. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.74>
8. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Apr 3];8(2):102–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24000280>
9. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* [Internet]. 2014 Jul 31 [cited 2018 Nov 9];465(1):1–14. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-014-1593-7>

10. Yeo SK, Guan J-L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? Trends in Cancer [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Nov 8];3(11):753–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405803317301759>
11. Selli C, Sims AH. Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer as a Model for Translational Research [Internet]. Vol. 13, Breast Cancer: Basic and Clinical Research. SAGE Publications Ltd; 2019 [cited 2020 Jun 27]. Available from: </pmc/articles/PMC6381436/?report=abstract>
12. Liu S V., Melstrom L, Yao K, Russell CA, Sener SF. Neoadjuvant therapy for breast cancer. J Surg Oncol [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2019 Jan 28];101(4):283–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jso.21446>
13. Arnaout A, Lee J, Gelmon K, Poirier B, Lu FI, Akra M, et al. Neoadjuvant therapy for breast cancer: Updates and proceedings from the seventh annual meeting of the canadian consortium for locally advanced breast cancer. Curr Oncol [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Jun 27];25(5):e490. Available from: </pmc/articles/PMC6209552/?report=abstract>
14. Zhou X, Zhang J, Yun H, Shi R, Wang Y, Wang W. Alterations of biomarker profiles after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer : tumor heterogeneity should be taken into consideration. Oncotarget. 2015;6(34).
15. Meattini I, Bicchierai G, Saieva C, De Benedetto D, Desideri I, Becherini C, et al. Impact of molecular subtypes classification concordance between preoperative core needle biopsy and surgical specimen on early breast cancer management: Single-institution experience and review of published literature. Eur J Surg Oncol [Internet]. 2017;43(4):642–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2016.10.025>
16. Jin X, Jiang YZ, Chen S, Yu K Da, Shao ZM, Di GH. Prognostic value of receptor conversion after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: A prospective observational study. Oncotarget. 2015;6(11):9600–11.
17. Peng J, Zhang X, Song J, Ran L, Luo R, Wang Y. Neoadjuvant chemotherapy reduces the expression rates of ER, PR, HER2, Ki67, and P53 of invasive ductal carcinoma. Medicine (Baltimore). 2019;98(2):1–8.
18. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. Vol. 12, Nature Reviews Clinical Oncology. Nature Publishing Group;

2015. p. 381–94.

19. Kinsella MD, Nassar A, Siddiqui MT, Cohen C. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post- neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: A single institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(6):530–6.
20. Parinyanitikul N, Lei X, Chavez-Macgregor M, Liu S, Mittendorf EA, Litton JK, et al. Receptor status change from primary to residual breast cancer after neoadjuvant chemotherapy and analysis of survival outcomes. *Clin Breast Cancer.* 2015 Apr 1;15(2):153–60.
21. Tural D, Karaca M, Zirtiloglu A, M Hacıoglu B, Sendur MA, Ozet A. Receptor discordances after neoadjuvant chemotherapy and their effects on survival. *J BUON* [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 11];24(1):20–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30941947>
22. Ahn S, Kim HJ, Kim M, Chung YR, Kang E, Kim EK, et al. Negative conversion of progesterone receptor status after primary systemic therapy is associated with poor clinical outcome in patients with breast cancer. *Cancer Res Treat.* 2018 Oct 1;50(4):1418–32.
23. Duarte C, Salazar A, Strasser-Weippl K, de Vries E, Wiesner C, Krush L, et al. Breast cancer in Colombia: A growing challenge for the health care system. In: *Cancer Research* [Internet]. American Association for Cancer Research (AACR); 2019 [cited 2020 Jun 27]. p. P5-13-12-P5-13–12. Available from: [https://scihub.tw/https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/4\\_Supplement/P5-13-12](https://scihub.tw/https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/4_Supplement/P5-13-12)
24. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
25. Shuai Y, Ma L. Prognostic value of pathologic complete response and the alteration of breast cancer immunohistochemical biomarkers after neoadjuvant chemotherapy [Internet]. Vol. 215, *Pathology Research and Practice*. Elsevier GmbH; 2019 [cited 2020 Feb 11]. p. 29–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30501932>
26. Yang L, Zhong X, Pu T, Qiu Y, Ye F, Bu H. Clinical significance and prognostic value of receptor conversion in hormone receptor positive breast cancers after neoadjuvant

chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2018;16(1):1–9.

27. Guarneri V, Dieci M V., Barbieri E, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, et al. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2013 Dec 1;24(12):2990–4.
28. Xian Z, Quinones AK, Tozbikian G, Zynger DL. Breast cancer biomarkers before and after neoadjuvant chemotherapy: does repeat testing impact therapeutic management? *Hum Pathol* [Internet]. 2017;62:215–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.12.019>
29. Suárez-Rozo LF, Puerto-García S, Rodríguez-Moreno LM R-M. La crisis del sistema de salud colombiano: una aproximación desde la legitimidad y la regulación. *Rev Gerenc Polít Salud* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jun 27];16(32):34–50. Available from: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.rgps16-32.cssc>
30. Álvarez Salazar GJ, García Gallego M, Londoño Usme M. Crisis de la salud en Colombia: limitantes del acceso al derecho fundamental a la salud de los adultos mayores. *CES Derecho*. 2016;(2):106–25.
31. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* [Internet]. 2010 May 25 [cited 2018 Mar 21];7(5):e1000279. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520800>
32. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2000 Aug 17 [cited 2018 Apr 16];406(6797):747–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602>
33. Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2016 Sep 24 [cited 2018 Nov 16];159(2):257–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558625>
34. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes [Internet]. Vol. 7, *Journal of Cancer*. Ivspring International Publisher; 2016 [cited 2020 Jul 17]. p. 1281–94. Available from:

/pmc/articles/PMC4934037/?report=abstract

35. Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. [Internet]. Vol. 2, Cold Spring Harbor perspectives in biology. Cold Spring Harb Perspect Biol; 2010 [cited 2020 Jul 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20739412/>
36. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen Receptor  $\beta$  Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2020 Jul 17];64(1):423–8. Available from: <http://mammary.nih.gov/tools/mousework/Cunha001/index/html>.
37. Omoto Y, Iwase H. Clinical significance of estrogen receptor  $\beta$  in breast and prostate cancer from biological aspects [Internet]. Vol. 106, *Cancer Science*. Blackwell Publishing Ltd; 2015 [cited 2020 Jul 17]. p. 337–43. Available from: </pmc/articles/PMC4409875/?report=abstract>
38. Hua H, Zhang H, Kong Q, Jiang Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis 06 Biological Sciences 0604 Genetics [Internet]. Vol. 7, *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Jul 17]. p. 24. Available from: </pmc/articles/PMC6148803/?report=abstract>
39. Manavathi B, Dey O, Gajulapalli VNR, Bhatia RS, Bugide S, Kumar R. Derailed estrogen signaling and breast cancer: An authentic couple [Internet]. Vol. 34, *Endocrine Reviews*. *Endocr Rev*; 2013 [cited 2020 Jul 17]. p. 1–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22947396/>
40. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2020 Jul 17];19(4):833–42. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article/19/4/833/2741274>
41. Murphy CE, Carder PJ, Lansdown MRJ, Speirs V. Steroid hormone receptor expression in male breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2006 Feb;32(1):44–7.
42. Huang B, Warner M, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy [Internet]. Vol. 418, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd; 2015 [cited 2020 Jul 17]. p. 240–4. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25433206/>

43. Caldarella A, Barchielli A. Prognostic role of progesterone receptor expression in a population-based analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 18];143(12):2505–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28889189/>
44. Bravaccini S, Bronte G, Scarpi E, Ravaioli S, Maltoni R, Mangia A, et al. The impact of progesterone receptor expression on prognosis of patients with rapidly proliferating, hormone receptor-positive early breast cancer: a post hoc analysis of the IBIS 3 trial. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18];12. Available from: [/pmc/articles/PMC7047424/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34444444/)
45. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: Defining a role in breast cancer [Internet]. Vol. 6, *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*. NIH Public Access; 2011 [cited 2020 Jul 18]. p. 359–69. Available from: [/pmc/articles/PMC3156468/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3156468/)
46. Garg D, Ng SSM, Baig KM, Driggers P, Segars J. Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2017;28(9):656–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.006>
47. Yu K-D, Jiang Y-Z, Hao S, Shao Z-M. Molecular essence and endocrine responsiveness of estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. *BMC Med* [Internet]. 2015 Dec 5 [cited 2020 Jul 17];13(1):254. Available from: <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0496-z>
48. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor-positive phenotype. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Oct 20 [cited 2020 Jul 17];25(30):4772–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17876012/>
49. Liu XY, Ma D, Xu XE, Jin X, Yu K Da, Jiang YZ, et al. Genomic landscape and endocrine-resistant subgroup in estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative, and HER2-negative breast cancer. *Theranostics* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 17];8(22):6386–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30613307/>
50. Kurozumi S, Matsumoto H, Hayashi Y, Tozuka K, Inoue K, Horiguchi J, et al. Power of PgR expression as a prognostic factor for ER-positive/HER2-negative breast

cancer patients at intermediate risk classified by the Ki67 labeling index. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 May 22 [cited 2020 Jul 17];17(1):354. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3331-4>

51. Mitri Z, Constantine T, O'regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract.* 2012;2012.
52. Poloz Y, Dowling RJO, Stambolic V. Fundamental pathways in breast cancer 1: Signaling from the membrane. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management.* Springer International Publishing; 2017. p. 3–12.
53. English DP, Roque DM, Santin AD. HER2 expression beyond breast cancer: Therapeutic implications for gynecologic malignancies. Vol. 17, *Molecular Diagnosis and Therapy.* NIH Public Access; 2013. p. 85–99.
54. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification , clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):2929–43.
55. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature* [Internet]. 2012 [cited 2018 Mar 21];490(7418):61–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465532/pdf/nihms393293.pdf>
56. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, Mckinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 [cited 2018 Aug 14];14(5). Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
57. Serrano-Gomez SJ, Sanabria-Salas MC, Hernández-Suarez G, García O, Silva C, Romero A, et al. High prevalence of luminal B breast cancer intrinsic subtype in Colombian women. *Carcinogenesis* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 17];37(7):669–76. Available from: [www.r-project](http://www.r-project).
58. Serrano-Gómez SJ, Fejerman L, Zabaleta J. Breast Cancer in Latinas: A focus on intrinsic subtypes distribution. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(1):3–10.
59. Gómez R, Ossa CA, Montoya ME, Echeverri C, Ángel G, Ascuntar J, et al. Impact of immunohistochemistry-based molecular subtype on chemosensitivity and survival in Hispanic breast cancer patients following neoadjuvant chemotherapy.

- Ecancermedalscience [Internet]. 2015 [cited 2018 Nov 2];9:562. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26316883>
60. Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *C Open* [Internet]. 2017 Sep 25 [cited 2020 Jul 18];5(3):E734–9. Available from: </pmc/articles/PMC5621954/?report=abstract>
  61. Liu N, Yang Z, Liu X, Niu Y. Lymph node status in different molecular subtype of breast cancer: Triple negative tumours are more likely lymph node negative. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 18];8(33):55534–43. Available from: </pmc/articles/PMC5589678/?report=abstract>
  62. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets [Internet]. Vol. 13, *Breast Cancer Research*. *Breast Cancer Res*; 2011 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22217398/>
  63. Li ZH, Hu PH, Tu JH, Yu NS. Luminal B breast cancer: Patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jul 18];7(40):65024–33. Available from: </pmc/articles/PMC5323135/?report=abstract>
  64. Vingiani A, Viale G. The pathology report. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. Springer International Publishing; 2017. p. 157–68.
  65. Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance [Internet]. Vol. 8, *World Journal of Clinical Oncology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2017 [cited 2020 Jul 22]. p. 120–34. Available from: </pmc/articles/PMC5385433/?report=abstract>
  66. Godoy-Ortiz A, Sanchez-Muñoz A, Parrado MRC, Álvarez M, Ribelles N, Dominguez AR, et al. Deciphering HER2 breast cancer disease: Biological and clinical implications. *Front Oncol* [Internet]. 2019 Oct 29 [cited 2020 Jul 22];9(OCT):1124. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  67. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2 - Positive breast cancer: Planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Nov 20 [cited 2020 Jul 10];32(33):3744–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25332249/>

68. Wolff AC, McShane LM, Hammond MEH, Allison KH, Fitzgibbons P, Press MF, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364–82.
69. Nassar A, Khor A, Radhakrishnan R, Radhakrishnan A, Cohen C. Correlation of HER2 overexpression with gene amplification and its relation to chromosome 17 aneuploidy: A 5-year experience with invasive ductal and lobular carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jul 22];7(9):6254–61. Available from: [www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)
70. Luoh S-W, Ramsey B, Hanlon Newell A, Troxell M, Hu Z, Chin K, et al. HER-2 gene amplification in human breast cancer without concurrent HER-2 over-expression. *Springerplus* [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2020 Jul 22];2(1):386. Available from: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-386>
71. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2016;13(11):674–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
72. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2013;(18):123–33.
73. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Jul [cited 2020 Jul 23];121(7):2750–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21633166/>
74. Lehmann BD, Jovanovic B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. Sapino A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jun 16 [cited 2020 Jul 23];11(6):e0157368. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157368>
75. Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin* [Internet]. 2018;13(3):339–54. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>

76. Palazzo A, Colleoni M. Adjuvant systemic therapies by subtypes: Guidelines. In: Breast Cancer: Innovations in Research and Management. Springer International Publishing; 2017. p. 535–9.
77. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular classification of triple-negative breast cancer [Internet]. Vol. 19, Journal of Breast Cancer. Korean Breast Cancer Society; 2016 [cited 2020 Jul 23]. p. 223–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27721871/>
78. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2020 Jul 23];13(15):4429–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17671126/>
79. Diaz Casas S, Lancheros García E, Sánchez Campo A, Sanchez Pedraza R, Roman Vasquez V, Mendoza SD, et al. Clinical Behavior of Triple Negative Breast Cancer in a Cohort of Latin American Women. Cureus [Internet]. 2019 Jun 21 [cited 2020 Jul 23];11(6). Available from: [/pmc/articles/PMC6701886/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6701886/)
80. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. J Clin Oncol. 2013;31(22):2783–90.
81. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer. J Clin Oncol [Internet]. 2011 Nov 10 [cited 2018 Nov 9];29(32):4273–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990413>
82. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol [Internet]. 2013 [cited 2019 Jan 30];24:2206–2223. Available from: <http://guidance.nice.org.uk/DT/4>

83. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer [Internet]. Vol. 121, Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation; 2011 [cited 2020 Jul 15]. p. 3786–8. Available from: </pmc/articles/PMC3195489/?report=abstract>
84. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. Vol. 5, Nature Reviews Disease Primers. 2019.
85. Wang L. Early diagnosis of breast cancer. Sensors (Switzerland) [Internet]. 2017 Jul 5 [cited 2020 Jul 15];17(7). Available from: </pmc/articles/PMC5539491/?report=abstract>
86. Guerini-Rocco E, Fusco N. Premalignant and pre-invasive lesions of the breast. In: Breast Cancer: Innovations in Research and Management. Springer International Publishing; 2017. p. 103–20.
87. Wellings SR. A Hypothesis of the Origin of Human Breast Cancer from the Terminal Ductal Lobular Unit. Pathol Res Pract. 1980 Apr 1;166(4):515–35.
88. Lakhani SR IA for R on CWHO. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. Lakhani SR EISSTP van de VM, editor. Vol. 4. 2012.
89. Miyai K. Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances. World J Clin Cases [Internet]. 2014 [cited 2020 Jul 15];2(12):732. Available from: </pmc/articles/PMC4266822/?report=abstract>
90. Munzone E, Giobbie-Hurder A, Gusterson BA, Mallon E, Viale G, Thürlimann B, et al. Outcomes of special histotypes of breast cancer after adjuvant endocrine therapy with letrozole or tamoxifen in the monotherapy cohort of the BIG 1-98 trial. Ann Oncol. 2015;26:2442–9.
91. ELSTON CW, ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology [Internet]. 1991 [cited 2020 Jul 15];19(5):403–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1757079/>
92. Kasangian AA, Gherardi G, Biagioli E, Torri V, Moretti A, Bernardin E, et al. The prognostic role of tumor size in early breast cancer in the era of molecular biology. PLoS One [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Oct 20];12(12). Available from: </pmc/articles/PMC5718505/?report=abstract>

93. Chavez-MacGregor M, Mittendorf EA, Clarke CA, Lichtensztajn DY, Hunt KK, Giordano SH. Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. *Oncologist*. 2017;22(11):1292–300.
94. Akaza H. TNM classification [Internet]. Vol. 85, Japanese Journal of Urology. Japanese Urological Association; 1994 [cited 2020 Jul 3]. p. 229–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
95. Ryu YJ, Kang SJ, Cho JS, Yoon JH, Park MH. Lymphovascular invasion can be better than pathologic complete response to predict prognosis in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Med (United States)* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2020 Jul 16];97(30). Available from: </pmc/articles/PMC6078671/?report=abstract>
96. Chen S-H, Zhang B-Y, Zhou B, Zhu C-Z, Sun L-Q, Feng Y-J. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 16];9(1):1–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30755808>
97. Abramowitz MC, Li T, Morrow M, Sigurdson ER, Anderson P, Nicolaou N, et al. Dermal lymphatic invasion and inflammatory breast cancer are independent predictors of outcome after postmastectomy radiation. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials* [Internet]. 2009 Feb [cited 2020 Jul 16];32(1):30–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19194121/>
98. Lee AHS, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer* [Internet]. 2006 Feb [cited 2020 Jul 16];42(3):357–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16377180/>
99. Song YJ, Shin SH, Cho JS, Park MH, Yoon JH, Jegal YJ. The role of lymphovascular invasion as a prognostic factor in patients with lymph node-positive operable invasive breast cancer [Internet]. Vol. 14, Journal of Breast Cancer. *J Breast Cancer*; 2011 [cited 2020 Jul 16]. p. 198–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22031801/>
100. Karak SG QNBRAJ. Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma - PubMed. *Conn Med* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 16];74(1):17–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20175368/>

101. Koca E, Kuzan TY, Dizdar O, Babacan T, Sahin I, Ararat E, et al. Outcomes of locally advanced breast cancer patients with S10 positive axillary lymph nodes. *Med Oncol* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2020 Jul 16];30(3):1–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-013-0615-7>
102. Mamouch F, Berrada N, Aoullay Z, El Khanoussi B, Errihani H. Inflammatory Breast Cancer: A Literature Review. *World J Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 16];9(5–6):129–35. Available from: [/pmc/articles/PMC6279456/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306279456/)
103. Rubio IT, Marco V. La importancia de los márgenes quirúrgicos en la cirugía conservadora en el cáncer de mama [Internet]. Vol. 79, *Cirugia Espanola*. Ediciones Doyma, S.L.; 2006 [cited 2020 Jul 16]. p. 3–9. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-la-importancia-margenes-quirurgicos-cirugia-13083667>
104. Houssami N, MacAskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME, et al. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010 Dec [cited 2020 Jul 16];46(18):3219–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20817513/>
105. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2019;321(3):288–300.
106. Sledge GW. Curing Metastatic Breast Cancer. *J Oncol Pract*. 2016;12(1):6–10.
107. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical diagnosis and management of breast cancer. *J Nucl Med*. 2016;57:9S-16S.
108. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10074):1134–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
109. Luini A. The conservative mastectomy. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. Springer International Publishing; 2017. p. 345–58.
110. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Oct 17 [cited 2020 Jul 5];347(16):1233–41. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393820/>

111. Cao JQ, Olson RA, Tyldesley SK. Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer. *Curr Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jul 3];20(6):e593. Available from: </pmc/articles/PMC3851357/?report=abstract>
112. Lurie RH, Anderson BO, Abraham J, Aft R, Agnese D, Allison KH, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. *Natl Compr Cancer Netw*. 2020;4.
113. Wapnir IL, Anderson SJ, Mamounas EP, Geyer CE, Jeong JH, Tan-Chiu E, et al. Prognosis after ipsilateral breast tumor recurrence and locoregional recurrences in five national surgical adjuvant breast and bowel project node-positive adjuvant breast cancer trials. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2020 Jul 3];24(13):2028–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16648502/>
114. Onitilo AA, Engel JM, Stankowski R V., Doi SAR. Survival comparisons for breast conserving surgery and mastectomy revisited: Community experience and the role of radiation therapy. *Clin Med Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2020 Jul 5];13(2):65–73. Available from: </pmc/articles/PMC4504664/?report=abstract>
115. Veronesi U. Conservative surgery. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. Springer International Publishing; 2017. p. 335–44.
116. Nava MB, Rocco N, Catanuto G. Conservative mastectomies: an overview. *Gland Surg* [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 5];4(6):463–6. Available from: </pmc/articles/PMC4647005/?report=abstract>
117. Abass MO, Gismalla MDA, Alsheikh AA, Elhassan MMA. Axillary Lymph Node Dissection for Breast Cancer: Efficacy and Complication in Developing Countries. *J Glob Oncol* [Internet]. 2018 Dec [cited 2020 Jul 5];4(4):1–8. Available from: </pmc/articles/PMC6223503/?report=abstract>
118. Zahoor S, Haji A, Battoo A, Qurieshi M, Mir W, Shah M. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: A clinical review and update [Internet]. Vol. 20, *Journal of Breast Cancer*. Korean Breast Cancer Society; 2017 [cited 2020 Jul 5]. p. 217–27. Available from: </pmc/articles/PMC5620435/?report=abstract>
119. Galimberti V. Management of the axilla. In: *Breast Cancer: Innovations in Research*

and Management. Springer International Publishing; 2017. p. 357–63.

120. Bembenek A, Schlag PM. Sentinel node detection. 2001 [cited 2020 Jul 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6977/>
121. Hwang RF, Krishnamurthy S, Hunt KK, Mirza N, Ames FC, Feig B, et al. Clinicopathologic factors predicting involvement of nonsentinel axillary nodes in women with breast cancer [Internet]. Vol. 10, *Annals of Surgical Oncology*. Ann Surg Oncol; 2003 [cited 2020 Jul 5]. p. 248–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12679309/>
122. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman K V., Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2011 Feb 9 [cited 2020 Jul 5];305(6):569–75. Available from: <https://jamanetwork.com/>
123. Castaneda SA, Strasser J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2017;26(3):371–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2017.01.013>
124. Orecchia R. Conceptual basis and principles of radiation oncology. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. Springer International Publishing; 2017. p. 611–9.
125. Dagueneat E, Louati S, Wozny AS, Vial N, Gras M, Guy JB, et al. Radiation-induced bystander and abscopal effects: important lessons from preclinical models [Internet]. *British Journal of Cancer*. Springer Nature; 2020 [cited 2020 Jul 12]. p. 1–10. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0942-3>
126. Poortmans PM, Collette S, Kirkove C, Van Limbergen E, Budach V, Struikmans H, et al. Internal Mammary and Medial Supraclavicular Irradiation in Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2020 Jul 13];373(4):317–27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1415369>
127. Whelan TJ, Olivetto IA, Parulekar WR, Ackerman I, Chua BH, Nabid A, et al. Regional Nodal Irradiation in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2020 Jul 13];373(4):307–16. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1415340>

128. Gera R, Chehade HELH, Wazir U, Tayeh S, Kasem A, Mokbel K. Locoregional therapy of the primary tumour in de novo stage IV breast cancer in 216 066 patients: A meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2020 Jul 12];10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59908-1>
129. Sofi AA, Mohamed I, Koumaya M, Kamaluddin Z. Local therapy in metastatic breast cancer is associated with improved survival. *Am J Ther* [Internet]. 2013 Sep [cited 2020 Jul 12];20(5):487–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822115/>
130. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, 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* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2020 Jul 12];378(9804):1707–16. Available from: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)
131. Pérez Edo L. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos. *Rev Esp Reum.* 2004;31(1):13–7.
132. Francis PA, Pagani O, Fleming GF, Walley BA, Colleoni M, Láng I, et al. Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Jul 12 [cited 2020 Jul 8];379(2):122–37. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1803164>
133. Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *Ochsner J.* 2017;17:405–11.
134. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2011 Aug 27 [cited 2020 Jul 9];378(9793):771–84. Available from: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)
135. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* [Internet]. 2013 Mar 9 [cited 2020 Jul 9];381(9869):805–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
136. Bradley R, Burrett J, Clarke M, Davies C, Duane F, Evans V, et al. Aromatase

inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2015 Oct 3 [cited 2020 Jul 9];386(10001):1341–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>

137. ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2020 Jul 9];365(9453):60–2. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673604176666/fulltext>
138. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 9];11(12):1135–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21087898/>
139. Shah AN, Gradishar WJ. Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role? *Oncologist* [Internet]. 2018 Oct [cited 2020 Jul 10];23(10):1153–61. Available from: </pmc/articles/PMC6263120/?report=abstract>
140. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview. *BMC Med* [Internet]. 2015;13(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0439-8>
141. Albain K, Anderson S, Arriagada R, Barlow W, Bergh J, Bliss J, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2012 Feb 4 [cited 2020 Jul 10];379(9814):432–44. Available from: </pmc/articles/PMC3273723/?report=abstract>
142. Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): A randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2020 Jul 10];15(7):747–56. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204514701603/fulltext>
143. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603

- (Alliance). *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Jul 10];33(1):13–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25092775/>
144. Bonilla, L. Ben-Aharon, I. Vidal, L. Gafter-Gvili, A. Leibovici, L. Stemmer S. Dose-Dense Chemotherapy in Nonmetastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2020 Jul 10];102(24):1845–54. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/107/4/djv044/894954>
  145. Citron ML. Dose-dense chemotherapy: Principles, clinical results and future perspectives [Internet]. Vol. 3, *Breast Care*. Karger Publishers; 2008 [cited 2020 Jul 10]. p. 251–5. Available from: </pmc/articles/PMC2974980/?report=abstract>
  146. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *J Am Med Assoc* [Internet]. 2006 Apr 12 [cited 2020 Jul 10];295(14):1658–67. Available from: </pmc/articles/PMC1459540/?report=abstract>
  147. Colleoni M, Cole BF, Viale G, Regan MM, Price KN, Maiorano E, et al. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: Results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jun 20 [cited 2020 Jul 9];28(18):2966–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20458051/>
  148. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 Aug 10 [cited 2020 Jul 10];24(23):3726–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16720680/>
  149. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Jul 12 [cited 2020 Jul 10];379(2):111–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29860917/>
  150. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* [Internet]. 1999 [cited 2020 Jul 10];21(2):309–18. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10211534/>

151. Tinoco G, Warsch S, Glück S, Avancha K, Montero AJ. Treating breast cancer in the 21st century: Emerging biological therapies [Internet]. Vol. 4, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher; 2013 [cited 2020 Jul 10]. p. 117–32. Available from: </pmc/articles/PMC3563073/?report=abstract>
152. Munzone E. Anti-HER2 therapies in the adjuvant and advanced disease settings. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. Springer International Publishing; 2017. p. 577–91.
153. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Oct 20 [cited 2020 Jul 10];353(16):1659–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa052306>
154. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Oct 20 [cited 2020 Jul 10];353(16):1673–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16236738/>
155. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Oct 6 [cited 2020 Jul 10];365(14):1273–83. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa0910383>
156. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, De Azambuja E, Procter M, Suter TM, et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): An open-label, randomised controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2013 Sep 21 [cited 2020 Jul 10];382(9897):1021–8. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673613610946/fulltext>
157. Tarantino P, Morganti S, Curigliano G. Biologic therapy for advanced breast cancer: recent advances and future directions [Internet]. *Expert Opinion on Biological Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2020 [cited 2020 Jul 10]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14712598.2020.1752176>
158. Ishii K, Morii N, Yamashiro H. <p>Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in

therapy</p>. Core Evid [Internet]. 2019 Oct [cited 2020 Jul 11];Volume 14:51–70. Available from: /pmc/articles/PMC6827570/?report=abstract

159. Opdam FL, Guchelaar H, Beijnen JH, Schellens JHM. Lapatinib for Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2012 Apr [cited 2020 Jul 11];17(4):536–42. Available from: /pmc/articles/PMC3336826/?report=abstract
160. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2020 Jul 11];17(6):791–800. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204516001637/fulltext>
161. Carey LA, Berry DA, Cirrincione CT, Barry WT, Pitcher BN, Harris LN, et al. Molecular heterogeneity and response to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2 targeting in CALGB 40601, a randomized phase III trial of paclitaxel plus trastuzumab with or without lapatinib. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Feb 20 [cited 2020 Jul 11];34(6):542–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527775/>
162. Robidoux A, Tang G, Rastogi P, Geyer CE, Azar CA, Atkins JN, et al. Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): An open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2020 Jul 11];14(12):1183–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147020451370411X>
163. Piccart-Gebhart M, Holmes E, Baselga J, De Azambuja E, Dueck AC, Viale G, et al. Adjuvant lapatinib and trastuzumab for early human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: Results From the randomized phase III adjuvant lapatinib and/or trastuzumab treatment optimization trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Jul 11];34(10):1034–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26598744/>
164. von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 Feb 14 [cited 2020 Jul 11];380(7):617–28. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1814017>

165. Akiki M, Haddad FG, Kourie HR, Khaddage A, Smayra VT. PD-L1: An unavoidable biomarker in advanced triple-negative breast cancer [Internet]. Vol. 13, Biomarkers in Medicine. Future Medicine Ltd.; 2019 [cited 2020 Jul 11]. p. 1539–41. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/bmm-2019-0344>
166. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 Jul 11];21(1):44–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31786121/>
167. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investig en Educ Médica* [Internet]. 2013;2(8):217–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2007-5057\(13\)72715-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2007-5057(13)72715-7)
168. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2010 Jul [cited 2018 Dec 11];134(7):e48-72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20586616>
169. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2018 Aug 16];31(31):3997–4013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101045>
170. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jun;139(2):539–52.
171. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175–86.

172. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2007 Jan 17 [cited 2020 Feb 13];99(2):167–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17228000>
173. Mitchison TJ. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy [Internet]. Vol. 23, *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology; 2012 [cited 2020 Sep 4]. p. 1–6. Available from: </pmc/articles/PMC3248889/?report=abstract>
174. Cabrera-Galeana P, Muñoz-Montaña W, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, Pérez-Sánchez V, Villarreal-Garza C, et al. Ki67 Changes Identify Worse Outcomes in Residual Breast Cancer Tumors After Neoadjuvant Chemotherapy. *Oncologist*. 2018 Jun;23(6):670–8.
175. Von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Müller BM, Blohmer JU, Sinn B V., et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Aug 15 [cited 2020 Sep 4];19(16):4521–31. Available from: [www.aacrjournals.org](http://www.aacrjournals.org)
176. Wu Q, Ma G, Deng Y, Luo W, Zhao Y, Li W, et al. Prognostic value of ki-67 in patients with resected triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Front Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 5];9(OCT):1068. Available from: </pmc/articles/PMC6811517/?report=abstract>
177. Liang Q, Ma D, Gao RF, Yu K Da. Effect of Ki-67 Expression Levels and Histological Grade on Breast Cancer Early Relapse in Patients with Different Immunohistochemical-based Subtypes. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.
178. Rakha EA, Reis-filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(207):1–12.
179. Sasanpour P, Sandoughdaran S, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh M. Predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in Iranian breast cancer patients. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2020 Sep 5];19(9):2423–7. Available from: </pmc/articles/PMC6249452/?report=abstract>
180. Penault-Llorca F, Radosevich-Robin N. Biomarkers of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet].

2016;13(8):487–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.1>

181. Jin G, Han Y, Liu C, Chen L, Ding B, Xuan S, et al. Evaluation of biomarker changes after administration of various neoadjuvant chemotherapies in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):914–21.
182. Lim SK, Lee MH, Park IH, You JY, Nam B-H, Kim BN, et al. Impact of Molecular Subtype Conversion of Breast Cancers after Neoadjuvant Chemotherapy on Clinical Outcome. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2020 Feb 13];48(1):133–41. Available from: <http://e-crt.org/journal/view.php?doi=10.4143/crt.2014.262>
183. Zong Y, Zhu L, Wu J, Chen X, Huang O, Fei X, et al. Progesterone receptor status and Ki-67 index may predict early relapse in luminal B/HER2 negative breast cancer patients: A retrospective study. *PLoS One*. 2014 Aug 29;9(8).
184. Karlsson E, Sandelin K, Appelgren J, Zhou W, Jirström K, Bergh J, et al. Clonal alteration of breast cancer receptors between primary ductal carcinoma in situ (DCIS) and corresponding local events. *Eur J Cancer*. 2014 Feb 1;50(3):517–24.
185. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Mar 8 [cited 2020 Sep 9];366(10):883–92. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1113205>
186. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2020;(November 2019):0–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.016>
187. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Feb 19 [cited 2020 Sep 6];372(8):724–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25693012/>
188. Ignatov T, Gorbunow F, Eggemann H, Ortmann O, Ignatov A. Loss of HER2 after HER2-targeted treatment. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2019 Jun 15 [cited 2020 Feb 11];175(2):401–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30806922>

189. Niikura N, Tomotaki A, Miyata H, Iwamoto T, Kawai M, Anan K, 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. *Ann Oncol*. 2016;27(3):480–7.
190. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2009 Dec 1 [cited 2020 Sep 6];15(23):7381–8. Available from: [/pmc/articles/PMC2788123/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19411233/)
191. Hughes JB, Rødland MS, Hasmann M, Madshus IH, Stang E. Pertuzumab increases 17-AAG-induced degradation of ErbB2, and this effect is further increased by combining pertuzumab with trastuzumab. *Pharmaceuticals*. 2012 Jul 28;5(7):674–89.
192. Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, et al. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (Herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res*. 2001;61(12):4892–900.
193. Adams AL, Eltoum I, Krontiras H, Wang W, Chhieng DC. The Effect of Neoadjuvant Chemotherapy on Histologic Grade, Hormone Receptor Status, and Her2/neu Status in Breast Carcinoma. *Breast J [Internet]*. 2008 Mar 1 [cited 2020 Sep 6];14(2):141–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-4741.2007.00544.x>
194. D.S. Dede, B. Gumuskaya, G. Guler, D.Onat3, K. Altundag YO. Evaluation of changes of biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 in breast cancer with administration of neoadjuvant dose- dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel. *J BUON*. 2013;18(1):57–63.
195. Gonzalez-Angulo AM, Iwamoto T, Liu S, Chen H, Do K-A, Hortobagyi GN, et al. Clinical Gene Expression, Molecular Class Changes, and Pathway Analysis after Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2012;18(4). Available from: [www.ingenuity.com/](http://www.ingenuity.com/)
196. Branco FP, Machado D, Silva FF, André S, Catarino A, Madureira R, et al. Loss of HER2 and disease prognosis after neoadjuvant treatment of HER2+ breast cancer [Internet]. Vol. 11, *Am J Transl Res*. 2019. Available from: [www.ajtr.org](http://www.ajtr.org)

197. Schettini F, Buono G, Cardalesi C, Desideri I, De Placido S, Del Mastro L. Hormone Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive breast cancer: Where we are now and where we are going. Vol. 46, *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2016. p. 20–6.
198. Dieci M V., Barbieri E, Piacentini F, Ficarra G, Bettelli S, Dominici M, et al. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: A single-institution analysis. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2020 Sep 6];24(1):101–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23002281/>
199. Nikolai BC, Lanz RB, York B, Dasgupta S, Mitsiades N, Creighton CJ, et al. HER2 signaling drives DNA anabolism and proliferation through SRC-3 phosphorylation and E2F1-regulated genes. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2020 Sep 18];76(6):1463–75. Available from: [/pmc/articles/PMC4794399/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26444444/)
200. Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Virchows Arch*. 2005;446(5):489–96.
201. Ramón y Cajal S, Sesé M, Capdevila C, Aasen T, De Mattos-Arruda L, Diaz-Cano SJ, et al. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J Mol Med*. 2020;98(2):161–77.
202. Romero Q, Bendahl P-O, Klintman M, Loman N, Ingvar C, Rydén L, et al. Ki67 proliferation in core biopsies versus surgical samples-a model for neo-adjuvant breast cancer studies. *BMC Cancer* [Internet]. 2011 [cited 2020 Feb 25];11(341). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/341>
203. Li P, Liu T, Wang Y, Shao S, Zhang W, Lv Y, et al. Influence of Neoadjuvant Chemotherapy on HER2/neu Status in Invasive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2013;13(1):53–60.
204. Joseph C, Papadaki A, Althobiti M, Alsaleem M, Aleskandarany MA, Rakha EA. Breast cancer intratumour heterogeneity: current status and clinical implications. *Histopathology*. 2018;73(5):717–31.
205. Jamal-Hanjani M, Hackshaw A, Ngai Y, Shaw J, Dive C, Quezada S, et al. Tracking Genomic Cancer Evolution for Precision Medicine: The Lung TRACERx Study. *PLoS*

Biol [Internet]. 2014;12(7):e1001906. Available from: [www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org)

206. Turashvili G, Brogi E. Tumor heterogeneity in breast cancer [Internet]. Vol. 4, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2020 Sep 8]. p. 227. Available from: [/pmc/articles/PMC5727049/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
207. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* [Internet]. 2018 Jan 11 [cited 2020 Aug 19];172(1–2):373-386.e10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224780/>

## **12. ANEXOS**

### **ANEXO 1. Effect of neoadjuvant therapy on breast cancer biomarker profile**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Effect of neoadjuvant therapy on breast cancer biomarker profile



Laura Rey-Vargas<sup>1,2</sup>, Juan Carlos Mejía-Henao<sup>3</sup>, María Carolina Sanabria-Salas<sup>4</sup> and Silvia J. Serrano-Gomez<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Breast cancer clinical management requires the assessment of hormone receptors (estrogen (ER) and progesterone receptor (PR)), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and cellular proliferation index Ki67, by immunohistochemistry (IHC), in order to choose and guide therapy according to tumor biology. Many studies have reported contradictory results regarding changes in the biomarker profile after neoadjuvant therapy (NAT). Given its clinical implications for the disease management, we aimed to analyze changes in ER, PR, HER2, and Ki67 expression in paired core-needle biopsies and surgical samples in breast cancer patients that had either been treated or not with NAT.

**Methods:** We included 139 patients with confirmed diagnosis of invasive ductal breast carcinoma from the Colombian National Cancer Institute. Variation in biomarker profile were assessed according to NAT administration (NAT and no-NAT treated cases) and NAT scheme (hormonal, cytotoxic, cytotoxic + trastuzumab, combined). Chi-squared and Wilcoxon signed-rank test were used to identify changes in biomarker status and percentage expression, respectively, in the corresponding groups.

**Results:** We did not find any significant variations in biomarker status or expression values in the no-NAT group. In cases previously treated with NAT, we did find a statistically significant decrease in Ki67 ( $p < 0.001$ ) and PR ( $p = 0.02605$ ) expression. When changes were evaluated according to NAT scheme, we found a significant decrease in both Ki67 status ( $p = 0.02977$ ) and its expression values ( $p < 0.001$ ) in cases that received the cytotoxic treatment.

**Conclusions:** Our results suggest that PR and Ki67 expression can be altered by NAT administration, whereas cases not previously treated with NAT do not present IHC biomarker profile variations. The re-evaluation of these two biomarkers after NAT could provide valuable information regarding treatment response and prognosis for breast cancer patients.

**Keywords:** Breast neoplasms, Immunohistochemistry, Neoadjuvant therapy, Biomarkers, Heterogeneity

## Background

Breast cancer is the malignancy with the highest incidence (46.3 per 100.000) and mortality rates (13.0 per 100.000) in women worldwide. According to the Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER), in 2018 breast cancer accounted for 15.3% of all new

cancer cases and 6.7% of all cancer deaths in the United States (US) [1, 2].

Neoadjuvant therapy (NAT) has become an important strategy to reduce tumor size in locally advanced breast cancer and facilitate breast conservative surgery, along with monitoring treatment response and eliminating possible micrometastasis [3–5]. In order to choose an appropriate NAT scheme according to tumor biology, a preoperative evaluation on core-needle biopsies from the primary tumor is performed, where histological type and grade are assessed. Additionally, immunohistochemistry

\* Correspondence: [sserrano@canccer.gov.co](mailto:sserrano@canccer.gov.co)

<sup>1</sup>Grupo de investigación en biología del cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1a #9-85, Bogotá D. C, Colombia  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(IHC) of biomarkers, such as: hormone receptors (estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR)), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and the cellular proliferation index (Ki67), is also analyzed to guide the therapy and predict survival [4, 6, 7].

These biomarkers have been used as surrogates for breast cancer classification into four main intrinsic subtypes: luminal A, luminal B, HER2-enriched and triple negative (TN) [8]. Both, luminal A and luminal B tumors express ER, therefore these patients are candidates for hormone therapy with ER modulators or aromatase inhibitors [8–11], whilst HER2-enriched and TN subtypes lack the expression of hormone receptors, therefore are mainly treated with biological therapy agents such as trastuzumab or pertuzumab, and cytotoxic chemotherapy, respectively [5, 11, 12].

Standard clinical recommendations indicate the assessment of ER, PR, HER2 and Ki67 by IHC in biopsy samples [13, 14]. Nevertheless, many retrospective studies have reported changes in biomarker expression in surgical specimens after NAT administration [15–21]. The main changes correspond to discordances in hormone receptors and HER2 status [22], along with decreases in the percentage of expression, especially for PR and Ki67 [23–26]. Most of these studies end up suggesting the need to re-evaluate its expression, justifying its importance not only to assess tumor response to treatment but to adjust therapy according to these changes [3, 27]. However, other studies show that these changes are not statistically significant [28] and suggest that the re-evaluation of biomarker expression after NAT might not be necessary, especially for health care institutions with limited resources, as it is the case for many hospitals in Latin-America, including Colombia [29].

Given the prognostic value of biomarkers expression and its important role for deciding treatment scheme, the aim of this study was to compare the IHC expression of ER, PR, HER2, and Ki67 in core-needle biopsies and surgical excision specimens in NAT-treated and non-treated breast cancer samples from patients diagnosed in the Colombian National Cancer Institute (NCI), in order to evaluate NAT effect on biomarker expression profile.

## Methods

### Clinical samples and data collection

This is a retrospective study that included 139 breast cancer patients diagnosed with invasive ductal carcinoma (IDC) at the Colombian NCI between 2013 and 2014. Patients were included if they met the following eligibility criteria: 1) histologically confirmed diagnosis of IDC, 2) availability of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks from mastectomies or breast-conserving surgeries that contained at least 10% of tumor content, 3) availability of IHC slides from core-

needle biopsies, and 4) paired IHC biomarker information on biopsy and surgical specimens. Patients with *in situ* breast carcinoma were excluded. A single pathologist confirmed the histological diagnosis and re-evaluated the expression of the IHC markers from each patient.

This study was approved by the Colombian NCI ethics committee, and according to the Colombian laws, it was considered that no informed consent was required.

Pathology reports were reviewed to obtain information regarding histopathological diagnosis, nodal status, surgical margins, invasion and histological grade. Treatment information was retrieved from clinical records. NAT-treated patients were categorized based on their neoadjuvant scheme in four groups: 1) hormonal, which includes letrozole and/or exemestane, 2) cytotoxic, which includes AC (doxorubicin and cyclophosphamide), taxanes and/or platinum, 3) cytotoxic + trastuzumab, which includes the same therapeutic agents from the cytotoxic scheme plus trastuzumab, and 4) combined, which includes both hormonal and cytotoxic therapeutic agents.

### Immunohistochemistry

IHC for ER, PR, HER2 and Ki67 expression was performed on 3  $\mu$ m-thick sections from a single FFPE with the highest tumor representation. Staining was carried out using the Roche Benchmark XT automated slide preparation system (Roche Ltd., Switzerland). Positive and negative controls were included and DAB (3,3'-diaminobenzidine) was used as chromogen.

A single pathologist analyzed biomarker expression from surgery blocks and re-evaluated the IHC slides from core-needle biopsies. Hormone receptors (ER and PR) and Ki67 expression values were calculated as the percentage of positive nuclear staining in the IHC slide evaluated. Status of hormone receptors was considered positive when they exceeded 1% of nuclear staining in tumor cells. HER2 was defined as: positive (3+) for complete and intense circumferential membrane staining within > 10% of tumor cells; ambiguous (2+) for incomplete and/or weak/moderate circumferential membrane staining within > 10% of tumor cells, or complete membrane staining but within  $\leq$ 10% of tumor cells; negative (1+) for incomplete faint membrane staining within > 10% of tumor cells; and negative (0+) for absence of staining, according to the recommendations of the American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) guideline [30]. For analysis purposes, Ki67 was categorized as high ( $\geq$ 20%) or low (< 20%) expression.

## Statistical analysis

We analyzed changes in biomarker status in paired samples from biopsy and surgical specimens, according to NAT administration, using Chi-squared test for categorical variables. Changes in biomarker expression, as continuous variables, were evaluated using the Wilcoxon signed-rank test for paired samples. All analyses were conducted using R software (version 1.2.5033). Differences were considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### Clinical-pathological characteristics

Clinical-pathological characteristics of patients included in this study are presented in Table 1. All tumors were classified as IDC, of which the majority presented a clinical stage of III (49.6%) and a Scarff-Bloom-Richardson score of II (59.7%). Sixty-four patients (46%) had positive invasion, from which 38 (45.2%) corresponded to lympho-vascular type. One hundred thirteen (81.3%) of the patients included had axillary lymph node dissection, from which 67 (59.3%) had lymph node involvement. Seventy-eight patients (56.1%) received NAT based mainly in cytotoxic chemotherapy (71.8%).

### Biomarker status in core-needle biopsy and surgical excisional specimens

Results from biomarker status in core-needle biopsy showed that most cases were ER positive (80.6%), PR positive (73.4%), HER2 negative (77.0%) and had a high Ki67 proliferation index ( $\geq 20\%$ ) (66.2%). Biomarker status in surgical specimens presented a similar distribution, where most cases were also ER positive (79.1%), PR positive (71.2%), HER2 negative (71.9%) and had a high Ki67 proliferation index (53.3%). In order to assess the impact of NAT treatment in biomarker status and its expression values, we performed an analysis in paired samples stratified by NAT administration.

### Changes in biomarker status and expression in the no-NAT group

#### Biomarker status

We compared the biomarker status between core-needle biopsy and the surgical specimen in sixty-one cases (43.9%) that did not receive NAT. We neither find statistically significant changes for ER/PR status ( $p = 1$ ) nor for Ki67 ( $p = 0.5796$ ) (Table 2). Even though these are cases that did not receive any type of treatment before surgery that could have affected their tumor biology, interestingly, we observed two cases that changed from PR positive status in biopsy to negative in the surgical specimen; other two cases went from negative status in the biopsy to positive in the surgical specimen for the same biomarker. On the other hand, although not statistically significant, we also observed variations in Ki67

Table 1 Clinical-pathological characteristics of patients at diagnosis

	N (%)
Clinical stage	
I (I, Ia, Ib)	11 (7.9)
II (IIa, IIb)	57 (41.0)
III (IIIa, IIIb, IIIc)	69 (49.6)
IV	2 (1.4)
Scarff-Bloom Richardson	
I	10 (7.2)
II	83 (59.7)
III	46 (33.1)
Invasion	
Yes	64 (46.0)
No	55 (39.6)
Unknown	20 (14.4)
Type of invasion	
Lympho-vascular	38 (45.2)
Dermal	6 (7.1)
Lympho-vascular and perineural	9 (10.7)
Dermal lymphatic	5 (6.0)
Perineural	4 (4.8)
Dermal lymphatic and perineural	1 (1.2)
Dermal and perineural	1 (1.2)
Unknown	20 (23.8)
Axillary lymph node dissection	
Yes	113 (81.3)
No	26 (18.7)
Involvement of lymph nodes	
Yes	67 (59.3)
No	46 (40.7)
NAT administration	
Yes	78 (56.1)
No	61 (43.9)
Type of NAT scheme	
Hormonal	6 (7.7)
Cytotoxic	56 (71.8)
Cytotoxic + trastuzumab	11 (14.1)
Combined (hormonal+ cytotoxic)	5 (6.4)

#### NAT Neoadjuvant therapy

status. From thirty-seven cases with a high Ki67 expression ( $\geq 20\%$ ) in the biopsy, thirty-two remained in this category, while 4 cases changed its status from high to low Ki67 expression ( $< 20\%$ ) (See Supplementary Table 1, Additional file 1).

For HER2 status, we did not find statistically significant changes in paired samples ( $p = 0.416$ ). However, we

Table 2 Biomarker status in cases that did and did not receive NAT, in biopsy and surgical specimens

	Categories	No-NAT group (N = 61)			NAT group (N = 78)		
		Biopsy	Surgery	p value	Biopsy	Surgery	p value
Estrogen Receptor	Positive	46 (75.4)	46 (75.4)	1	66 (84.6)	64 (82.1)	0.8299
	Negative	15 (24.6)	15 (24.6)		12 (15.4)	14 (17.9)	
Progesterone Receptor	Positive	42 (68.9)	42 (68.9)	1	60 (76.9)	57 (73.1)	0.7115
	Negative	19 (31.1)	19 (31.1)		18 (23.1)	21 (26.9)	
HER2	Positive	9 (14.8)	11 (18.0)	0.4165	10 (12.8)	9 (11.5)	0.6616
	Negative	47 (77.0)	41 (67.2)		60 (76.9)	59 (75.6)	
	Ambiguous	5 (8.2)	9 (14.8)		7 (9.0)	10 (12.8)	
Ki67 status	Low (<20%)	21 (34.4)	23 (37.7)	0.5796	19 (24.4)	41 (52.6)	< 0.001
	High (≥20%)	37 (60.7)	37 (60.7)		55 (70.5)	37 (47.4)	
	Unknown	3 (4.9)	1 (1.6)		4 (5.1)	0 (0.0)	

NAT Neoadjuvant therapy

did observe a modification in the HER2 classification for some cases not previously treated with NAT. Even though an ambiguous status does not correspond to an actual HER2 classification, fluorescence in situ hybridization (FISH) confirmatory results were not available for all cases within this category. Among cases that presented a gain of positive HER2 status, two changed from negative to positive and one changed from ambiguous to positive. Additionally, five cases changed from negative to ambiguous status; from these cases, FISH confirmatory results were available for two of them, with negative result for HER2 amplification in the surgical specimen. The remaining three cases did not have FISH confirmatory results at the surgical sample.

On the other hand, among cases that presented loss of HER2 status, one case changed from positive to ambiguous and another changed from ambiguous to negative status. Both cases had HER2 negative amplification confirmatory results at the surgical sample (Table 3).

**Biomarker expression**

We also compared ER, PR and Ki67 expression values between paired specimens. Median values were 100, 70

and 27.5%, respectively, in core-needle biopsies. After surgery, expression values did not show statistically significant changes for any of the three biomarkers (100, 70 and 20%, respectively) (Fig. 1).

**Changes in biomarker status and expression in the NAT group**

**Biomarker status**

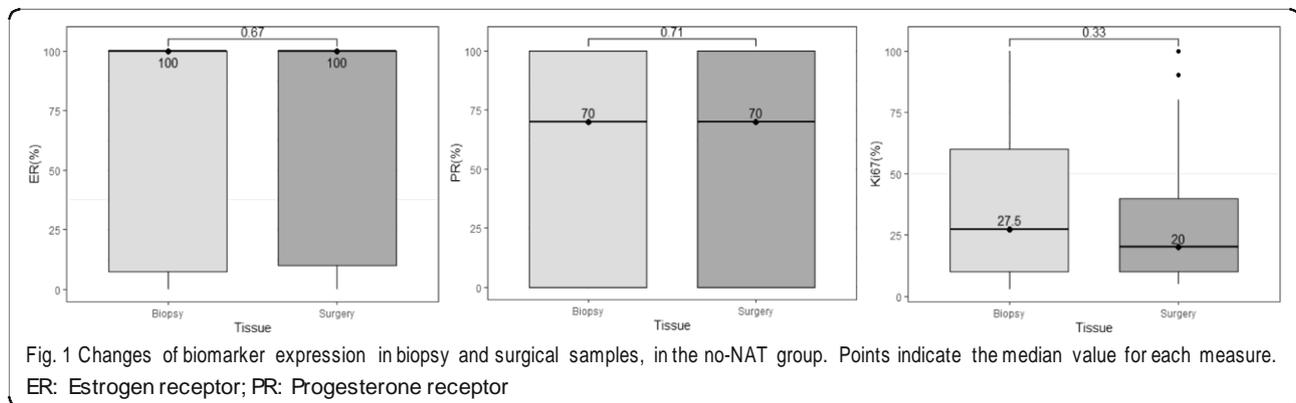
Seventy-eight cases (56.1%) received NAT. Tumor size measured before and after therapy were compared in these patients. The mean tumor size before NAT were 51.9 mm, and after treatment it significantly decreased to 29.3 mm ( $p < 0.01$ ).

We did not find any statistically significant changes in ER nor PR status in paired samples in the NAT group (Table 2). Nevertheless, as expected, we observed some cases that did present a modification in their hormone receptor status after NAT. We observed changes from positive to negative status for ER in two cases, one of which also showed loss of PR expression. Four additional cases also changed their PR status from positive to negative. On the other hand, we observed gain of PR status in two cases.

Table 3 HER2 classification changes in the NAT and no-NAT group from paired biopsy and surgical specimens

	Surgery Biopsy	Negative	Ambiguous	Positive	p value	No. cases with loss of HER2	No. cases with gain of HER2
No-NAT group (N=61)	Negative	40	5	2	0.4165	2	8
	Ambiguous	1	3	1			
	Positive	0	1	8			
NAT group (N = 78)	Negative	55	4	1	0.6616	4	5
	Ambiguous	2	5	0			
	Positive	2	0	8			
	Unknown	0	1	0			

NAT Neoadjuvant therapy



Evaluation of Ki67 status showed statistically significant changes between paired biopsy and surgical specimens ( $p < 0.001$ ) (Table 2). From fifty-five cases with a high Ki67 expression ( $\geq 20\%$ ) in the biopsy, thirty-five remained in this category, while twenty cases changed its status from high to low Ki67 expression ( $< 20\%$ ) (See Supplementary Table 1, Additional file 1).

Regarding HER2 status, no statistically significant changes between biopsy and surgical sample were observed ( $p = 0.662$ ), nonetheless, a small number of cases showed changes in HER2 status. Among positive HER2 tumors at biopsy, two cases changed to negative status, and similarly, among cases with ambiguous HER2 status at diagnosis, two cases changed to negative. Lastly, from 60 cases initially defined as HER2 negative in the biopsy, four turned to ambiguous and one case to positive status (Table 3).

Changes in biomarkers status according to NAT scheme was also analyzed. We only found statistically significant variations in Ki67 status between biopsy and surgical specimens in cases treated with the cytotoxic scheme ( $p = 0.02977$ ) (See Supplementary Table 2, Additional file 1). Other findings, although not statistically significant, include a trend for hormone receptors and Ki67 status loss after treatment with the cytotoxic (ER positive: 83.9% vs. 82.1%; PR positive: 76.8% vs. 73.2%) and cytotoxic + trastuzumab schemes (ER positive: 72.7% vs. 63.6%; PR positive: 72.7% vs. 54.5%, High Ki67: 81.8% vs. 54.5%). Interestingly, cases previously treated with cytotoxic therapy presented a trend for a gain of HER2 positive and ambiguous status (HER2 positive: 0% vs 1.8%; HER2 ambiguous: 8.9% vs. 12.5%), whereas in the cytotoxic + trastuzumab scheme group, HER2 showed a tendency for loss of positive status (HER2 positive: 90.9% vs 72.7%).

### Biomarker expression

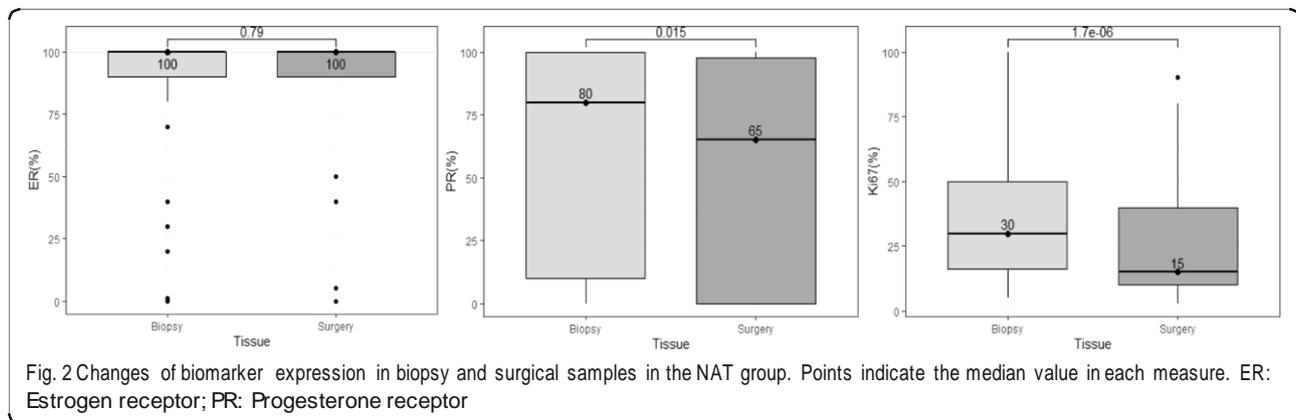
The ER, PR and Ki67 median expression values in core-needle biopsy were 100, 80 and 30%, respectively. After surgery, PR and Ki67 expression significantly decreased

to 65% ( $p = 0.01466$ ) and 15% ( $p < 0.001$ ), respectively, whilst ER showed no statistically significant variation (Fig. 2). Additionally, we analyzed changes of biomarker expression according to the NAT scheme, and only found a statistically significant decrease for Ki67 expression in cases that received cytotoxic treatment ( $p < 0.001$ ). Even though not statistically significant, we still could observe a trend for a lower PR expression values in surgical samples for all treatment schemes groups (Hormonal: 100% vs. 80%, Cytotoxic: 80% vs. 70%, Cytotoxic + trastuzumab: 40% vs. 20%, Combined: 90% vs. 20%) (See Supplementary Table 3, Additional file 1).

### Discussion

In the current study, we aimed to analyze changes in IHC biomarker status and expression in paired biopsy and surgical samples in breast cancer cases treated and non-treated with NAT, given that changes in biomarker expression may have several clinical implications for disease outcome in breast cancer patients [31–33]. It may also affect adjuvant therapy regimen, as variation in breast cancer intrinsic subtype after NAT could lead to the addition or discontinuation of therapy schemes [16, 34].

It has been well described that NAT treatment affects Ki67 index, as it targets mainly cycling cells and major cell proliferation pathways [35]. We observed a significant decrease in tumor size and in Ki67 expression values only in the NAT-treated group. Despite the fact that we did not analyze differences in outcome according to these changes, a decrease in Ki67 expression after NAT has been associated with a good clinical-pathological response, better disease-free survival and overall survival [36, 37], whereas no reduction in Ki67 expression after NAT have been associated with a significantly higher risk of breast cancer recurrence and death [38]. Interesting results reported by Dowsett et al. [35] show that Ki67 expression values after 2 weeks of NAT were more useful as prognostic markers for prediction of recurrence-free survival than baseline Ki67



expression before NAT. Our results showing a significant decrease in Ki67 expression after NAT, along with previously reported results, highlight the utility of assessing this biomarker in the surgical specimen after NAT, for prognosis and patients' clinical outcomes evaluation.

It has been well reported that chemotherapy may have several effects on tumor biology, which could potentially alter biomarker expression [3, 39]. We found a statistically significant decrease in PR expression values between biopsy and surgical specimens after NAT, which is consistent with other reports where the PR, along with the Ki67 index, are the most commonly altered biomarkers after NAT administration [7, 15, 16, 31]. Contrary to what has been reported for Ki67, PR expression loss has been associated with worse tumor characteristics [15] and poor clinical outcomes [23, 32, 40]. It has also been shown that loss of PR expression may be an indicator of a decrease of hormone sensitivity in tumor cells, activation of alternate proliferation pathways such as PI3K/AKT/mTOR [41, 42], and also, the induction of a non-functional ER state which could lead to a diminished response to endocrine therapy, specifically in ER-positive/PR-negative tumors [18, 43].

Loss of ER expression has also been associated with bad clinical outcomes as it affects tumor response to endocrine therapy [44]. Nevertheless, as we reported here, variation in ER expression after NAT is much less frequent than for PR. We did not observe statistically significant changes in ER status nor its expression in neither of the NAT treated or not-treated cases, although we did observe two cases with status loss in the NAT-treated group. These results suggest that analyzing ER after NAT administration may not be as useful as a prognostic marker, as it could be PR and Ki67 status evaluation.

On the other hand, gain of hormone receptor expression after NAT is associated with significantly better outcomes, compared with patients with unchanged hormone receptor expression [45, 46]. It has even been

shown that the improvement on survival rates for patients with ER and PR expression gain is dependent on the magnitude of change [47], however, gain of hormone receptor expression is much less frequently reported [22, 31, 32]. In our study, no gain in ER status was observed in neither of the NAT-treated nor non-treated cases, whilst for PR, we observed gain of status in only two cases from the NAT-treated group. Overall, these results suggest that the gain of hormone receptor may not be frequent enough for its implementation to assess treatment response and disease outcomes.

HER2 status variation between biopsy and surgical samples are reported to be less frequent than for hormone receptors and Ki67 index [32, 48]. We did not find statistically significant changes in HER2 biomarker status neither in the NAT-treated nor non-treated cases. Some reports have found important changes in HER2 expression, which seem to be driven not just by NAT, but by specific types of therapeutic agents [33, 40, 49]. Ignatov et al. [25] reported that trastuzumab administration was associated with a decrease in HER2 expression in 47.3% of cases, and interestingly, when pertuzumab was added to the trastuzumab-NAT scheme, the decrease in HER2 expression rise to 63.2%. In our data, when we assessed HER2 variations according to type of NAT regimen, no statistically significant changes were found in neither of the NAT-schemes groups, including the cytotoxic + trastuzumab group. Despite our results not being statistically significant, we did observe some cases in the cytotoxic + trastuzumab scheme group with a decrease in HER2 status. Hypotheses regarding HER2 downregulation after treatment includes the internalization in endosomal compartments and lysosomal degradation of HER2 receptor induced by anti-HER2 agents (pertuzumab, trastuzumab) [50]. Nonetheless, as have been shown, *ERBB2* amplification when evaluated by FISH remains stable after NAT treatment [51].

Undoubtedly, cancer treatments may alter in some degree tumor gene expression [52], leading to possible

modification of the IHC biomarker profile. However, tumor heterogeneity is also an important factor to take into account when considering changes in biomarker expression between tumor samples, especially when changes are observed in non-previously NAT treated cases [53], as we reported here. Tumor heterogeneity in breast cancer has been observed in multiple studies [17, 54–56]. Rye et al. [56] evaluated tumor heterogeneity of ER and HER2 expression within individual breast tumors at different time points, and reported the presence of tumor cells within the same sample with both HER2+/ER+ and HER2+/ER- expression profile, revealing a high rate of cell-to-cell variation. Tumor heterogeneity may have several clinical implications for patient's outcome. For example, a heterogeneous expression of HER2 copy number in tumors have been reported to be associated with higher risks of relapse and breast cancer death [56]. Such findings are expected given that this kind of intra-tumoral heterogeneity is often the result of clonal evolution, which is highly correlated with metastatic events [57, 58].

External factors different from tumor heterogeneity may also account for changes in biomarkers expression between biopsy and surgical samples in cases not previously treated with NAT [17, 51, 54]. Among these are technical preparation of the IHC stain, fixation times, and inter- and intra-observer variability [17]. It has also been reported that this variability could be a result of the so-called dilution effect, which refers to a decrease of biomarker expression with increasing number of available tumor cells to evaluate at the surgical sample [59]. As have been shown before, larger tumors from surgical excision procedures are more likely to present variations of biomarkers expression between biopsy and surgical samples [15, 55]. This may indicate that at the initial biopsy only a small portion of a tumor is sampled for its evaluation, therefore large tumors could end up being poorly represented and present with IHC profile variations.

Our study certainly had limitations, mainly regarding the small sample size, which limited the statistical power of the analyses, especially when NAT-treated cases were grouped according to the therapy scheme. Small sample size in the hormonal, cytotoxic + trastuzumab and combined NAT-scheme groups may not have allowed us to observe statistically significant expression changes between biopsy and surgical samples. Additionally, all cases were recruited from a single institution and only pathological, but not clinical information was collected. However, our results regarding changes of biomarker expression in NAT-treated and non-treated cases are mostly consistent with what has been reported previously in other studies [17, 51, 54]. On the other hand, we did not have FISH confirmatory amplification results

for some cases with HER2 ambiguous result by IHC, which did not allow us to give a more precise classification of these cases. Additionally, it is important to highlight that, unlike most studies evaluating changes of IHC biomarker expression after NAT treatment, we included a group of cases not previously treated with NAT in our analysis, which allowed us to determine if NAT administration could in fact induce changes in the IHC biomarker profile.

## Conclusions

Overall, our results confirmed that NAT administration may cause changes in IHC biomarker profile, mainly in Ki67 and PR expression, and that patients not previously treated with NAT do not present significant changes in biomarker expression. Since it is not cost-effective for the health care system to reassess the expression of each biomarker, for every patient after NAT, we suggest that only PR and Ki67 biomarkers should be reassessed after NAT treatment, as it has been shown that changes in these two may have prognosis implications for breast cancer patients. The implementation of the PR and Ki67 biomarkers as prognosis tools, along with other clinical variables such as tumor stage and nodal status [60, 61], could provide enough information about treatment response and it could be used by physicians to readjust therapy.

## Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07179-4>.

Additional file 1: Table S1. Ki67 classification changes in the NAT and no-NAT group from paired biopsy and surgical specimens. Table S2. Biomarker status in biopsy and surgical specimens according to NAT scheme. Table S3. Median biomarker expression in biopsy and surgical specimens according to NAT scheme.

## Abbreviations

NAT: Neoadjuvant therapy; IHC: Immunohistochemistry; ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; TN: Triple negative; NCI: National Cancer Institute; IDC: Invasive ductal carcinoma; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; FISH: Fluorescence in situ hybridization.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Authors' contributions

The concept of the study was conceived by SJSJG and LRV. SJSJG, MCSS and LRV have contributed to the background check and design of the study. JCMH and LRV have contributed to data collection. JCMH performed the pathology and histology evaluations. LRV has written the manuscript in collaboration with SJSJG and MCSS. SJSJG and LRV have contributed to the statistical analysis. The authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This study was funded by the Colombian NCI, project number: C1901030–411.

**Availability of data and materials**

The dataset analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Ethics approval and consent to participate**

This study was approved by the Colombian NCI research and ethics committee. In accordance with Colombian resolution 8430 of 1993, this study was considered without risk, given that no intervention was performed in any patient, therefore, no informed consent was required. We also acquired administrative permission from the pathology department to access patients' clinical information.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Grupo de investigación en biología del cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1a #9-85, Bogotá D. C, Colombia. <sup>2</sup>Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. <sup>3</sup>Grupo de patología oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia. <sup>4</sup>Subdirección de Investigaciones -Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, Bogotá, Colombia.

Received: 7 April 2020 Accepted: 13 July 2020

Published online: 18 July 2020

**References**

- Globocan. Breast: Cancer incidence and mortality statistics worldwide and by region. 2018 [cited 2018 Oct 29]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>.
- SEER. Surveillance E and ERP. Female Breast Cancer -Cancer Stat Facts. 2018 [cited 2019 Jan 28]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
- Penault-Llorca F, Radošević-Robin N. Biomarkers of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(8):487–503.
- Untch M, Konecny GE, Paepke S, Von Minckwitz G. Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast*. 2014;23:526–37.
- Liu SV, Melstrom L, Yao K, Russell CA, Sener SF. Neoadjuvant therapy for breast cancer. *J Surg Oncol*. 2010;101(4):283–91.
- National Institute for Health and Care Excellence. Early and locally advanced breast cancer: diagnosis and management, NICE guideline. 2018.
- Lee HC, Ko H, Seol H, Noh DY, Han W, Kim TY, et al. Expression of immunohistochemical markers before and after neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma, and their use as predictors of response. *J Breast Cancer*. 2013;16(4):395–403.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5(1):5–23.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869–74.
- Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(6):698–707.
- Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929–43.
- Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer Elsevier Ltd*. 2017;75:284–98.
- Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol*. 2015;28:1185–201.
- Zhou X, Zhang J, Yun H, Shi R, Wang Y, Wang W. Alterations of biomarker profiles after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: tumor heterogeneity should be taken into consideration. *Oncotarget*. 2015;6(34):36894–902.
- Xian Z, Quinones AK, Tozbikian G, Zynger DL. Breast cancer biomarkers before and after neoadjuvant chemotherapy: does repeat testing impact therapeutic management? *Hum Pathol*. 2017;62:215–21.
- Yang YF, Liao YY, Li LQ, Xie SR, Xie YF, Peng NF. Changes in ER, PR and HER2 receptors status after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2013;209(12):797–802.
- Neubauer H, Gall C, Vogel U, Homung R, Wallwiener D, Solomayer E, et al. Changes in tumour biological markers during primary systemic chemotherapy (PST). *Anticancer Res*. 2008;28(3 B):1797–804.
- Gahlaut R, Bennett A, Fatayer H, Dall BJ, Shama N, Velikova G, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on breast cancer phenotype, ER/PR and HER2 expression -implications for the practising oncologist. *Eur J Cancer*. 2016;60(January 2014):40–8.
- Jin G, Han Y, Liu C, Chen L, Ding B, Xuan S, et al. Evaluation of biomarker changes after administration of various neoadjuvant chemotherapies in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):914–21.
- Dede DS, Gumuskaya B, Guler G, Onat D, Altundag K, Ozsik Y. Evaluation of changes of biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 in breast cancer with administration of neoadjuvant dose- dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel. *J BUON*. 2013;18(1):57–63.
- Peng J, Zhang X, Song J, Ran L, Luo R, Wang Y. Neoadjuvant chemotherapy reduces the expression rates of ER, PR, HER2, Ki67, and P53 of invasive ductal carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(2):1–8.
- Tural D, Karaca M, Zirtiloglu A, M Hadoglu B, Sendur MA, Ozet A. Receptor discordances after neoadjuvant chemotherapy and their effects on survival. *J BUON*. 2019;24(1):20–5.
- Jin X, Jiang YZ, Chen S, Da Yu K, Shao ZM, Di GH. Prognostic value of receptor conversion after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: a prospective observational study. *Oncotarget*. 2015;6(11):9600–11.
- Ignatov T, Gorbunow F, Eggemann H, Ortmann O, Ignatov A. Loss of HER2 after HER2-targeted treatment. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;175(2):401–8.
- Wu YT, Li X, Lu LJ, Gan L, Dai W, Shi YL, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on the expression of hormone receptors and Ki67 in Chinese breast cancer patients: a retrospective study of 525 patients. *J Biomed Res*. 2018;32(3):191–7.
- Kang Y-J, Lee H-B, Kim YG, Han J, Kim Y, Yoo T-K, et al. Ki-67 expression is a significant prognostic factor only when progesterone receptor expression is low in estrogen receptor-positive and HER2-negative early breast Cancer. *J Oncol*. 2019;2019:8.
- Kinsella MD, Nassar A, Siddiqui MT, Cohen C. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: a single institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(6):530–6.
- Population NRC (US) C on P, Gribble JN, Preston SH. Health Policy Issues in Three Latin American Countries: Implications of The Epidemiological Transition. In: National Academies Press (US), editor. *The Epidemiological Transition: Policy and Planning Implications for Developing Countries: Workshop Proceedings*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1993.
- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997–4013.
- Yang L, Zhong X, Pu T, Qiu Y, Ye F, Bu H. Clinical significance and prognostic value of receptor conversion in hormone receptor positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2018;16(1):1–9.
- Ahn S, Kim HJ, Kim M, Chung YR, Kang E, Kim EK, et al. Negative conversion of progesterone receptor status after primary systemic therapy is associated with poor clinical outcome in patients with breast cancer. *Cancer Res Treat*. 2018;50(4):1418–32.
- Shuai Y, Ma L. Prognostic value of pathologic complete response and the alteration of breast cancer immunohistochemical biomarkers after neoadjuvant chemotherapy. *Pathol Res Pract*. 2019;215:29–33 Elsevier GmbH.
- De La Cruz LM, Harhay MO, Zhang P, Ugras S. Impact of Neoadjuvant Chemotherapy on Breast Cancer Subtype: Does Subtype Change and, if so, How?: IHC Profile and Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(12):3535–40.

35. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(2):167–70.
36. Enomoto Y, Morimoto T, Nishimukai A, Higuchi T, Yanai A, Miyagawa Y, et al. Impact of biomarker changes during neoadjuvant chemotherapy for clinical response in patients with residual breast cancers. *Int J Clin Oncol.* 2016;21(2):254–61.
37. Penault-Llorca F, Abrial C, Raoufils I, Chollet P, Cayre A, Mouret-Reynier M, et al. Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, Ki-67, Cyclin D1, and Cydo-oxygenase-2 in 710 operable breast Cancer patients treated with Neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist.* 2008;13(12):1235–45.
38. Cabrera-Galeana P, Muñoz-Montaño W, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, Pérez-Sánchez V, Villareal-Garza C, et al. Ki67 changes identify worse outcomes in residual breast Cancer tumors after Neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist.* 2018;23(6):670–8.
39. Schmitt MW, Loeb LA, Salk JJ. The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13:335–47 Nature Publishing Group.
40. Guarneri V, Dieci MV, Barbiere E, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, et al. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2013;24(12):2990–4.
41. Brodie A, Sabnis G. Adaptive changes result in activation of alternate signaling pathways and acquisition of resistance to aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4208–13 NIH Public Access.
42. Riggio M, Polo L, Blaustein M, Colman-Lerner A, Lü I, Lanari C, et al. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Cardiogenesis.* 2012;33(3):509–18.
43. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7721–35.
44. Li C, Fan H, Xiang Q, Xu L, Zhang Z, Liu Q, et al. Prognostic value of receptor status conversion following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treatment.* 2019;178:497–504 Springer New York LLC.
45. Lim SK, Lee MH, Park IH, You JY, Nam B-H, Kim BN, et al. Impact of molecular subtype conversion of breast cancers after Neoadjuvant chemotherapy on clinical outcome. *Cancer Res Treat.* 2016;48(1):133–41.
46. Tacca O, Penault-Llorca F, Abrial C, Mouret-Reynier M, Raoufils I, Durando X, et al. Changes in and prognostic value of hormone receptor status in a series of operable breast Cancer patients treated with Neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist.* 2007;12(6):636–43.
47. Parinyanitikul N, Lei X, Chavez-Macgregor M, Liu S, Mittendorf EA, Litton JK, et al. Receptor status change from primary to residual breast cancer after neoadjuvant chemotherapy and analysis of survival outcomes. *Clin Breast Cancer.* 2015;15(2):153–60.
48. Niikura N, Tomotaki A, Miyata H, Iwamoto T, Kawai M, Anan K, 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. *Ann Oncol.* 2016;27(3):480–7.
49. Van de Ven S, Smit VTHBM, Dekker TJA, Nortier JMR, Kroep JR. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(6):422–30.
50. Hughes JB, Rødland MS, Hasmann M, Madshus IH, Stang E. Pertuzumab increases 17-AAG-induced degradation of ErbB2, and this effect is further increased by combining pertuzumab with trastuzumab. *Pharmaceuticals.* 2012;5(7):674–89.
51. Li P, Liu T, Wang Y, Shao S, Zhang W, Lv Y, et al. Influence of Neoadjuvant chemotherapy on HER2/neu status in invasive breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2013;13(1):53–60.
52. Lee SC, Xu X, Lim YW, Lau P, Sukri N, Lim SE, et al. Chemotherapy-induced tumor gene expression changes in human breast cancers. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(3):181–92.
53. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(7):381–94.
54. Mann GB, Fahey VD, Feleppa F, Buchanan MR. Reliance on hormone receptor assays of surgical specimens may compromise outcome in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):5148–54.
55. Cavaliere A, Sidoni A, Scheibel M, Bellezza G, Brachelente G, Vitali R, et al. Biopathologic profile of breast cancer core biopsy: is it always a valid method? *Cancer Lett.* 2005;218(1):117–21.
56. Rye IH, Trinh A, Sætersdal AB, Nebdal D, Lingjærde OC, Almendro V, et al. Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER2+ breast tumors. *Mol Oncol.* 2018;12(11):1838–55.
57. Krøijgård AB, Larsen MJ, Lærkholm AV, Knoop AS, Jensen JD, Bak M, et al. Clonal expansion and linear genome evolution through breast cancer progression from pre-invasive stages to asynchronous metastasis. *Oncotarget.* 2015;6(8):5634–49.
58. Bary P, Vatsiou A, Spiteri I, Nichol D, Cresswell GD, Acar A, et al. The spatiotemporal evolution of lymph node spread in early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(19):4763–70.
59. Romero Q, Bendahl P-O, Klintman M, Loman N, Ingvar C, Rydén L, et al. Ki67 proliferation in core biopsies versus surgical samples—a model for neoadjuvant breast cancer studies. *BMC Cancer.* 2011;11:341.
60. Hayashi N, Takahashi Y, Matsuda N, Tsunoda H, Yoshida A, Suzuki K, et al. The prognostic effect of changes in tumor stage and nodal status after Neoadjuvant chemotherapy in each primary breast Cancer subtype. *Clin Breast Cancer.* 2018;18(2):e219–29.
61. Knutsvik G, Stefansson IM, Aziz S, Ames J, Eide J, Collett K, et al. Evaluation of Ki67 expression across distinct categories of breast Cancer specimens: a Population-based study of matched surgical specimens, Core needle biopsies and tissue microarrays. *PLoS One.* 2014;9(11):e112121.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

