

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESIS DOCTORAL

**Papel de las nuevas herramientas moleculares
(plataformas de riesgo genómicas y biopsia líquida) en el
manejo clínico de las pacientes con cáncer de mama que
han recibido tratamiento neoadyuvante**

Nikaoly Ciriaco Cortés

Directores:

Dr. Vicente Peg Cámara
Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Tutor:

Dr. Vicente Peg Cámara

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas

Departamento de Ciencias Morfológicas

Universidad Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2024

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que me han acompañado en este largo viaje. Algunos han participado activamente, mientras que otros lo han hecho como espectadores, pero cada uno ha contribuido según sus posibilidades, con la esperanza de que llegara triunfante al final de este recorrido.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis. A Santiago, por todo el apoyo que me ha brindado y por la confianza que ha demostrado tener en mí, desde mis inicios en la anatomía patológica y a lo largo de todos estos años. A Vicente, porque ha sido mi guía y mi ejemplo a seguir desde que era R1; por contagiarme su pasión y entusiasmo por la patología mamaria; porque gracias a sus brillantes ideas este proyecto vio la luz y se pudo llevar a cabo; por siempre tener paciencia y palabras amables. ¡Gracias Vicente!

Agradezco también a todas las personas que conformaban el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, durante los años que estuve trabajando allí: administrativos, técnicos, residentes y patólogos. Sin ustedes, no sería la profesional que soy hoy en día.

A mis compañeros de residencia: Adriana y Armando. ¡Qué suerte la mía! No pude tener mejor compañía en esos años tan importantes. Gracias, porque realmente ustedes fueron los que me empujaron a empezar una tesis doctoral.

A mis amigos que siempre han estado en las buenas y en las no tan buenas. En especial a Mildred y a Martha, mis amigas desde los inicios de la carrera de medicina, que me han demostrado apoyo incondicional a través del tiempo. Son más que amigas, las siento como familia.

Quiero expresar mi gratitud a todas las instituciones y organizaciones que financiaron y apoyaron mi investigación. Su contribución fue crucial para el desarrollo y la finalización de esta tesis. Asimismo, a los co-autores del artículo que me han permitido utilizarlo.

Y el agradecimiento más importante: a mi familia. A mi padre, Valentín, porque a él le debo el haber llegado hasta aquí. Gracias papi por ser mi mayor pilar y refugio toda la vida. A mi madre, Mirtha, por siempre estar y querer lo mejor para mí. A Sirku, por darme alas y permiso para volar. A mis hermanos, Niilo, Stiven, Eduard y Alex, por empujarme a ser mejor persona y profesional, para servirles de ejemplo. A mis abuelas Doña Sarah y Senaida, y a mi madrina Sonia, por cuidar, amar y proteger a la niña; y ahora desde el cielo celebrar a la mujer. A mis suegros, Marta y Edgar, por cuidar a mis mayores tesoros como si fueran suyos, y así darme la tranquilidad que necesitaba para culminar este proyecto. A mi esposo, Mario, mi eterno compañero, quien hace que el paso por esta vida sea más sencillo y feliz. Gracias por tu entereza y determinación. Este logro te lo debo a ti y tu soporte. A mis hijos, Alejandro y Alberto, mi mayor inspiración, por y para ustedes todo.

LISTADO DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

CITNE: Carcinoma infiltrante de tipo no especial

RE: Receptores de estrógenos

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés, *human epidermal growth factor receptor 2*)

IHQ: Inmunohistoquímica

RP: Receptores de progesterona

pCR: Respuesta patológica completa (del inglés, *pathological complete response*)

AJCC: American Joint Committee on Cancer

UICC: Union for International Cancer Control

NAC: Quimioterapia neoadyuvante (del inglés, *neoadjuvant chemotherapy*)

NSABP: Proyecto Nacional de Cirugía Adyuvante de Mama e Intestino (del inglés, *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*)

EORTC: Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (del inglés, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*)

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

RCB: Carga de cáncer residual (del inglés, *residual cancer burden*)

CPS-EG: Clinical-pathologic scoring system incorporating ER status and nuclear grade

ADN: Ácido desoxirribonucleico

FFPE: Fijado en formalina e incrustado en parafina (del inglés, *formalin-fixed paraffin-embedded*)

CMI: Cáncer de mama en estadio inicial

GL: Ganglio linfático

EMA: Agencia Europea de Medicamentos (del inglés, *European Medicines Agency*)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, *Food and Drug Administration*)

RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*)

RS: Recurrence score

ctDNA: ADN tumoral circulante (del inglés, *circulating tumor DNA*)

CTCs: Células tumorales circulantes (del inglés, *circulating tumor cells*)

cfDNA: ADN libre de células (del inglés, *cell-free DNA*)

NGS: Secuenciación de nueva generación (del inglés, *next generation sequencing*)

MRD: Enfermedad residual mínima (del inglés, *minimal residual disease*)

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, *quantitative polymerase chain reaction*)

UIDs: Identificadores únicos (del inglés, *unique identifiers*)

cCR: Respuesta clínica completa (del inglés, *clinical complete response*)

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

MD: Mutación detectada

NMD: No se detectó mutación (del inglés, *no mutation detected*)

DM: Metástasis a distancia (del inglés, *distant metastasis*)

OR: Odd ratio

IQR: Rango intercuartílico

Mi: Micrometástasis

N: Número de pacientes

DE: Desviación estándar

GLN: Ganglios linfáticos negativos

RMN: Resonancia magnética nuclear

PET: Tomografía por emisión de positrones (del inglés, *positron emission tomography*)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de casos y muertes para los 10 cánceres más comunes en el año 2020 en ambos sexos (Sung H et al., 2021) ¹	23
Figura 2. Fluidos donde se pueden encontrar marcadores tumorales circulantes (Freitas AJA et al., 2022) ⁵⁸	36
Figura 3. Esquema de trabajo. <i>Figura original</i>	52
Figura 4. Metodología Plasma-Safe-Sequencing. La generación de familias de identificadores únicos (UID) seguida de NGS estándar permite discriminar entre mutantes reales y errores aleatorios. Los códigos de barras UID se agregan durante una primera amplificación por PCR. Las familias UID se generan en una segunda PCR (Begona Jimenez Rodriguez et al) ⁸⁷	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones sustitutas de subtipos intrínsecos del cáncer de mama (adaptada de Goldhirsch A et al., 2013) ¹⁰	26
Tabla 2. Plataformas genómicas utilizadas para la toma de decisiones sobre quimioterapia en cáncer de mama positivo para RE y HER2 negativo (adaptada de WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2) ⁵	34
Tabla 3. Características basales clínicas y del tumor y estatus del ctDNA.....	64
Tabla 4. Respuesta a la NAC y resultados del análisis de ctDNA realizado a mitad del tratamiento y después del mismo.....	66
Tabla 5. Eficacia de la combinación de la eliminación de ctDNA y el alcance de una cCR en la predicción de pCR después de la NAC.....	68
Tabla 6. Resultados del seguimiento mediante biopsia líquida de las 15 pacientes con cáncer de mama que lograron cCR después de la NAC.....	69
Tabla 7. Características basales en el momento del diagnóstico y post-NAC, en el total de pacientes y en pacientes con y sin metástasis a distancia.....	71
Tabla 8. Test Oncotype DX Breast Recurrence Score® antes y después de la NAC basado en la presencia de metástasis a distancia.....	73
Tabla 9. Cambios en el test Oncotype DX Breast Recurrence Score® pre- y post-NAC...	75
Tabla 10. Características del tumor pre- y post-NAC, globales y según la presencia o no de metástasis a distancia.....	76
Tabla 11. Modelo de riesgos proporcionales de Cox para metástasis a distancia y SG, pacientes censurados a los 10 años (univariable).....	77
Tabla 12. Modelo de riesgos proporcionales de Cox para metástasis a distancia y SG, pacientes censurados a los 10 años (multivariable).....	78

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Gráficas representativas del seguimiento longitudinal del ctDNA. Dos pacientes (pacientes 5 [1A] y 17 [1B]) mostraron una eliminación completa de las mutaciones *TP53* en el plasma antes de la cirugía, lo cual se asoció con una cCR a la NAC.....66

Gráfica 2. Resultados de supervivencia a 10 años basados en los resultados del Oncotype DX Breast Recurrence Score®. 2A) Supervivencia libre de metástasis a distancia y 2B) Supervivencia global a los 10 años en pacientes con RS > 25 (rojo) vs RS ≤ 25 (azul).....78

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	17
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. Cáncer de mama.....	23
1.1.1. Epidemiología.....	23
1.1.2. Histopatología.....	24
1.1.3. Clasificación molecular.....	25
1.1.3.1. Subtipo luminal.....	27
1.1.3.2. Subtipo enriquecido en HER2.....	27
1.1.3.3. Subtipo basal.....	28
1.1.3.4. Cáncer de mama triple negativo.....	28
1.1.4. Estadíaaje.....	29
1.2. Neoadyuvancia en el cáncer de mama.....	30
1.2.1. Respuesta al tratamiento neoadyuvante.....	31
1.3. Papel de las técnicas moleculares en el cáncer de mama.....	33
1.3.1. Plataformas genómicas.....	33
1.3.1.1. El test Oncotype DX Breast Recurrence Score®.....	33
1.3.2. Biopsia líquida.....	36
1.3.2.1. Aplicaciones del ctDNA en el cáncer de mama.....	38
2. HIPÓTESIS.....	41
2.1. Hipótesis.....	43
2.2. Justificación del estudio.....	43
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. Objetivo primario.....	47
3.2. Objetivos secundarios.....	47
4. METODOLOGÍA.....	49
4.1. Primer estudio: Análisis del ctDNA durante y después de la NAC.....	51
4.1.1. Diseño del estudio y población.....	51
4.1.1.1. Consideraciones éticas.....	53

4.1.2. Análisis de la secuenciación dirigida del tejido y del ADN plasmático	53
4.1.2.1. Examen de muestras del tejido tumoral.....	53
4.1.2.2. Procedimientos de Biopsia Líquida.....	53
4.1.2.3. Diseño de ensayos personalizados.....	54
4.1.2.4. Cuantificación y control de calidad del ADN.....	54
4.1.2.5. Procedimiento de PCR y purificación.....	54
4.1.3. Análisis estadístico.....	55
4.1.3.1 Análisis de datos de secuenciación.....	56
4.2. Segundo estudio: Valor pronóstico de Oncotype DX después de la NAC....	57
4.2.1. Diseño del estudio y población.....	57
4.2.1.1. Consideraciones éticas.....	58
4.2.2. Prueba genómica para el análisis de riesgo biológico.....	58
4.2.3. Análisis estadístico.....	59
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Primer estudio: Análisis del ctDNA durante y después de la NAC.....	63
5.1.1. Características de las pacientes y del tumor.....	63
5.1.2. Respuesta a la QNA.....	65
5.1.3. Precisión del estado prequirúrgico del ctDNA + cCR para la determinación de pCR.....	67
5.1.4. Estado del ctDNA posquirúrgico y recurrencia.....	68
5.2. Segundo estudio: Valor pronóstico de Oncotype DX después de la NAC....	70
5.2.1. Características de las pacientes y del tumor.....	70
5.2.2. Resultados del análisis de Oncotype Dx RS en muestras pre y post-NAC.....	70
5.2.2.1. Resultados pre-NAC.....	72
5.2.2.2. Resultados post-NAC.....	72
5.2.2.3. Análisis de muestras emparejadas pre- y post-NAC.....	73
5.2.2.4. Cambios en el RS Pre y Post-NAC.....	73

6. DISCUSIÓN.....	81
6.1. Limitaciones.....	91
7. CONCLUSIONES.....	93
8. LÍNEAS DE FUTURO.....	97
9. BIBLIOGRAFÍA.....	101
10. ANEXO.....	125

RESUMEN

El uso de quimioterapia neoadyuvante (NAC, del inglés) en el cáncer de mama es cada vez mayor debido a sus numerosas ventajas. Los tumores HER2 positivos y los triples negativos suelen tener tasas altas de respuestas patológicas completas (pCR, del inglés) tras este tratamiento, mientras que en los tumores luminales-HER2 negativos, las respuestas completas son infrecuentes. En este proyecto realizamos dos estudios que tienen como finalidad la optimización del manejo post-NAC en pacientes con cáncer de mama, explorando la utilidad de nuevas herramientas de diagnóstico molecular para ofrecer un tratamiento más personalizado.

En el primer estudio valoramos el potencial del ADN tumoral circulante (ctDNA, del inglés) para predecir la pCR en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo y triple negativo post-NAC. Los resultados sugieren que en pacientes que logran una respuesta clínica completa (cCR, del inglés), la desaparición de mutaciones específicas del tumor en el ctDNA después de la NAC se correlaciona con una alta probabilidad de pCR. Esto plantea la posibilidad futura de omitir la cirugía en pacientes que cumplan estos criterios.

El segundo estudio evalúa el valor pronóstico del Oncotype DX Breast Recurrence Score® post-NAC en pacientes con cáncer de mama luminal HER2 negativo que no lograron una pCR, para identificar aquellas de alto riesgo que podrían beneficiarse de tratamientos adicionales. Los hallazgos demuestran que el recurrence score (RS) post-NAC es un predictor independiente de metástasis a distancia y supervivencia global, y que la NAC reduce significativamente el RS, lo que podría tener implicaciones pronósticas positivas.

Ambas investigaciones destacan la importancia de los estudios moleculares en la personalización del tratamiento post-NAC para el cáncer de mama, aunque con enfoques diferentes. El ctDNA podría ser una herramienta prometedora para identificar a las pacientes que pueden evitar la cirugía después de la NAC, mientras que el RS post-NAC podría ayudar a estratificar el riesgo y guiar las decisiones terapéuticas en pacientes con enfermedad residual después de la NAC.

ABSTRACT

The use of neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer is increasing due to its numerous advantages. HER2-positive and triple-negative tumors often have high rates of pathological complete responses (pCR) following this treatment, whereas luminal-HER2-negative tumors infrequently achieve complete responses. In this project, we conducted two studies aimed at optimizing post-NAC management in breast cancer patients by exploring the utility of new molecular diagnostic tools to offer more personalized treatment.

In the first study, we assessed the potential of circulating tumor DNA (ctDNA) to predict pCR in HER2-positive and triple-negative breast cancer patients post-NAC. The results suggest that in patients who achieve a clinical complete response (cCR), the clearance of specific tumor mutations in ctDNA after NAC correlates with a high probability of pCR. This raises the future possibility of omitting surgery in patients who meet these criteria.

The second study evaluates the prognostic value of the Oncotype DX Breast Recurrence Score® post-NAC in patients with luminal HER2-negative breast cancer who did not achieve a pCR, to identify those at high-risk who might benefit from additional treatments. The findings demonstrate that post-NAC recurrence score (RS) is an independent predictor of distant metastasis and overall survival, and that NAC significantly reduces RS, which could have positive prognostic implications.

Both studies highlight the importance of molecular studies in personalizing post-NAC treatment for breast cancer, with different approaches. ctDNA could be a promising tool for identifying patients who may avoid surgery after NAC, while post-NAC RS could help stratify risk and guide therapeutic decisions in patients with residual disease after NAC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER DE MAMA

1.1.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado en mujeres a nivel mundial (uno de cada cuatro casos de cáncer) y el de mayor mortalidad en este género (una de cada seis muertes por cáncer). En el año 2020 se diagnosticaron 2,3 millones de casos nuevos, lo que representa el 11,7% de todos los casos de cáncer (ver **figura 1**). Es la quinta causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo, con 685.000 muertes (6,9%)¹.

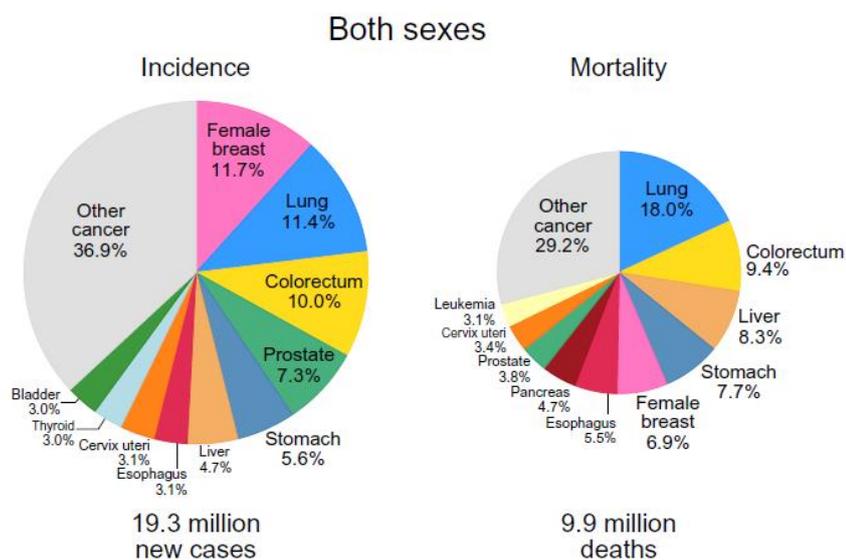


Figura 1. Distribución de casos y muertes para los 10 cánceres más comunes en el año 2020 en ambos sexos (Sung H et al., 2021)¹.

La tasa de incidencia del cáncer de mama femenino ha ido aumentando lentamente desde la década de 2000 (aproximadamente 0,5% por año)². En los países desarrollados esta tasa es un 88% más alta que en los países en vía de desarrollo (55,9 y 29,7 por 100.000, respectivamente), debido a factores de riesgo reproductivos, hormonales y del estilo de vida, así como una mayor detección mediante cribados mamográficos³. Sin embargo, las mujeres que viven en países en vía de desarrollo tienen una mortalidad un 17% mayor¹.

Se estima que, en el 2040, la carga del cáncer de mama aumentará a más de 3 millones de casos nuevos y 1 millón de muertes por año, como resultado del crecimiento y el envejecimiento de la población⁴.

1.1.2. Histopatología

En la clasificación actual de tumores de mama de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de mama infiltrante se divide en diferentes subtipos histológicos basándose en la arquitectura del tumor, las características citológicas del núcleo y los hallazgos en el estroma. Los tumores que presentan un determinado patrón histológico que abarca más del 90% de la lesión, son catalogados como subtipos especiales, entre los que encontramos los carcinomas lobulillares, mucinosos, tubulares, entre otros. La gran mayoría de tumores (40-75%) no presenta una morfología de tipo especial tan extensa (<90%) y estos constituyen el amplio grupo de carcinomas infiltrantes de tipo no especial (CITNE)⁵.

Otro parámetro histológico que es imprescindible valorar a la hora de diagnosticar un carcinoma de mama infiltrante es el grado de diferenciación tumoral, es decir, en qué medida se parecen las células del tumor a las células epiteliales del tejido mamario. El método recomendado en la actualidad, por la OMS, para realizar esta gradación es el sistema de Nottingham, descrito en 1991 por Elston y Ellis, quienes demostraron que proporcionaba una información pronóstica importante y que si se aplicaba consistentemente se podían obtener resultados reproducibles⁶. Para valorar el grado histológico se evalúan tres características: la formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y el índice mitótico. Cada una de ellas se puntúa independientemente, con valores numéricos del 1 al 3. Estos valores se suman y se obtiene un puntaje de 3 a 9, al cual se le asignan diferentes grados de la siguiente manera: de 3 a 5 puntos obtenidos es un tumor grado 1 (bien diferenciado); de 6 a 7 puntos es un grado 2 (moderadamente diferenciado) y de 8 a 9 puntos es un grado 3 (pobremente diferenciado)⁵.

En países donde el acceso a técnicas moleculares no está disponible o es limitado y solo cuentan con la evaluación histopatológica de rutina, las diversas características clínico-patológicas del tumor, en especial la valoración del grado histológico, representan un papel determinante para predecir el pronóstico de estas pacientes. Las técnicas moleculares ayudan a complementar el diagnóstico, pero las variables patológicas tradicionales siguen siendo fundamentales para el mismo⁷.

1.1.3. Clasificación molecular

El uso de análisis transcriptómico en cáncer de mama ha permitido realizar una clasificación molecular de esta entidad, caracterizando diferentes perfiles de expresión génica, con la finalidad de buscar nuevas dianas terapéuticas y valorar tanto la respuesta al tratamiento como el pronóstico⁸.

En el año 2000 Perou y cols estudiaron los patrones de expresión de los genes de 65 tumores de mama utilizando microarrays de ADN y demostraron que, según la expresión o ausencia de receptores de estrógenos (RE), los tumores se podían clasificar en dos grupos principales. Los tumores positivos para RE presentaban genes característicos de las células epiteliales luminales, por lo tanto, lo denominaron subtipo luminal. El otro grupo estaba constituido por tumores negativos para RE, y en este se identificaron tres subtipos diferentes: uno con expresión de genes característicos de las células basales; otro con sobre-expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y un último grupo que presentaba un perfil genético similar al encontrado en el tejido mamario normal. Así quedaron constituidos los subtipos intrínsecos principales del cáncer de mama: tumores luminales, tumores enriquecidos en HER2, tumores de tipo basal y tumores similares a la mama normal⁹.

Debido a que las pruebas moleculares todavía no están disponibles como una técnica de diagnóstico validada, resultan inaccesibles para la mayoría de las pacientes, por lo cual se ha desarrollado una clasificación sustituta patológica, basada en la evaluación inmunohistoquímica (IHQ) de los siguientes biomarcadores: RE, receptores de progesterona (RP), HER2 y el índice de proliferación celular estimado mediante Ki67 (ver **tabla 1**)¹⁰.

DEFINICIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA SUSTITUTA

SUBTIPO INTRÍNSECO

LUMINAL A	<p>“Tipo Luminal-A”</p> <p><i>Todos:</i></p> <p>RE y RP positivos</p> <p>HER2 negativo</p> <p>Ki67 “bajo” (<20%)</p> <p>Riesgo de recurrencia “bajo” basado en plataformas genómicas (si se disponen)</p>
LUMINAL B	<p>“Tipo Luminal-B (HER2 negativo)”</p> <p>RE positivos</p> <p>HER2 negativo</p> <p><i>y al menos uno de estos:</i></p> <p>Ki67 “alto” (≥20%)</p> <p>RP “negativos o bajos” (<20%)</p> <p>Riesgo de recurrencia “bajo” basado en plataformas genómicas (si se disponen)</p> <p>“Tipo Luminal-B (HER2 positivo)”</p> <p>RE positivos</p> <p>HER2 sobreexpresado o amplificado</p> <p>Cualquier Ki67</p> <p>Cualquier estado de RP</p>
SOBREEXPRESIÓN DE HER2	<p>“HER2 positivo (no luminal)”</p> <p>HER2 sobreexpresado o amplificado</p> <p>Ausencia de expresión de RE y RP</p>
“DE TIPO BASAL”	<p>“Triple negativo (ductal)”</p> <p>Ausencia de expresión de RE y RP</p> <p>HER2 negativo</p>

Tabla 1. Definiciones sustitutas de subtipos intrínsecos del cáncer de mama (adaptada de Goldhirsch A et al., 2013)¹⁰.

1.1.3.1 Subtipo luminal

El subtipo luminal es el más común. Está constituido por tumores heterogéneos tanto a nivel histológico como genético, por lo tanto, dentro de esta categoría encontramos tumores que presentan distintas evoluciones y respuestas al tratamiento¹¹. Estas diferencias han permitido distinguir dos subgrupos: luminal A y luminal B¹².

Los tumores de tipo luminal A presentan positividad de RE y RP (>20%), son negativos para HER2 y tienen un índice de proliferación celular (Ki67) bajo (<20%). Presentan una alta prevalencia de mutaciones de *PIK3CA* (49%)⁵. Usualmente son CITNE de bajo grado o carcinomas de tipo especial. A nivel clínico, son tumores indolentes, que responden a la terapia hormonal y suelen tener buen pronóstico.

Los de tipo luminal B se subdividen en luminal B-HER2 negativo, los cuales son positivos para RE, presentan un índice de proliferación celular alto (>20%) y/o son negativos para RP o tienen una positividad baja (<20%); y luminal B-HER2 positivo, que son tumores positivos para RE y HER2, independientemente del estatus de RP o del índice de proliferación. Estos tumores pueden tener mutaciones que afecten tanto a *PIK3CA* como a *TP53*. Son más agresivos y resistentes al tratamiento hormonal, por lo que a la mayoría se les añade tratamiento citotóxico^{10,13}.

1.1.3.2. Subtipo enriquecido en HER2

La amplificación de HER2 con la consecuente sobreexpresión de esta proteína se observa entre el 11 y el 30% de los tumores malignos de mama¹⁴. HER2 pertenece a una familia de receptores de factores de crecimiento que regulan la proliferación, el desarrollo, la motilidad y la supervivencia celular. La sobreexpresión de esta proteína se traduce en un aumento de la proliferación de células cancerígenas y de la angiogénesis, dando lugar a tumores con un fenotipo más agresivo y peor pronóstico⁵. Actualmente existen agentes terapéuticos biológicos dirigidos a HER2 (el anticuerpo monoclonal trastuzumab y otros agentes relacionados) que, administrados junto a la quimioterapia, han demostrado ser eficaces para aumentar la supervivencia de estas pacientes^{15,16}.

La positividad de HER2 se puede evaluar mediante IHQ (tinción de membrana intensa y uniforme [3+] en >10% de las células tumorales) y/o valorando la amplificación del gen mediante técnicas de hibridación in situ (los casos positivos tienen frecuentemente una ratio HER2/CEP17 >2,0 y un promedio >4,0 señales HER2/célula tumoral)¹⁷. Se suele realizar primero la técnica IHQ y si el resultado es equívoco (tinción 2+) se solicita la hibridación in situ.

1.1.3.3. Subtipo basal

El subtipo basal constituye alrededor del 15% de las neoplasias malignas de mama. Habitualmente, estos tumores suelen confundirse con los triples negativos, cuando en realidad se ha demostrado que son dos grupos diferentes, ya que no todos los triples negativos presentan un perfil de expresión genética de tipo basal (solo el 75%), y no todos los tumores basales carecen de expresión de RE, RP y HER2, mediante técnicas inmunohistoquímicas^{18,19}.

A nivel transcripcional es el subtipo más homogéneo, observándose una elevada expresión de genes relacionados con la proliferación y queratinas basales, y un gran número de mutaciones, principalmente en *TP53* (80%). El cáncer de mama con mutación de *BRCA1* se asocia a este subtipo. No existe terapia dirigida para este grupo y aunque suelen responder bien a la quimioterapia, presentan mal pronóstico^{20,21}.

1.1.3.4. Cáncer de mama triple negativo

Entre el 10 y el 20% de los cánceres de mama presentan un perfil inmunohistoquímico (IHQ) triple negativo. Como se ha descrito en el apartado anterior, esto significa la ausencia de expresión de RE, RP y HER2, lo que limita la posibilidad de tratamiento con terapias dirigidas. Estos tumores a menudo se diagnostican a una edad más temprana, son más prevalentes en mujeres afroamericanas y tienen una mayor tasa de recurrencia y mortalidad²². Histológicamente, la mayoría son de alto grado, con patrón de crecimiento sólido, necrosis geográfica e índice mitótico elevado (con una proliferación a menudo mayor al 80%)⁵.

Desde el punto de vista molecular son tumores heterogéneos. Se han identificado distintos subtipos mediante el estudio de perfiles de expresión génica. Lehmann y cols.

demonstraron la existencia de seis grupos diferentes dentro de esta entidad: basal-like 1, basal-like 2, inmunoenriquecido, mesenquimal, mesenquimal stem-like y el receptor de andrógenos luminal. Años más tarde, estos mismos autores afirmaron que las características transcriptómicas inicialmente observadas en los subtipos reconocidos como inmunoenriquecido y mesenquimal stem-like, procedían en el primer caso de los abundantes linfocitos infiltrantes de tumor y en el segundo grupo de las células mesenquimales asociadas al tumor, por lo cual la clasificación se reducía a los 4 grupos restantes^{23,24}.

Esta clasificación aún no está clínicamente establecida y, por lo tanto, todavía no se han aprobado regímenes de tratamiento específico para cada subtipo, por lo que la quimioterapia sigue siendo el tratamiento de elección para las pacientes afectadas por esta entidad. Aproximadamente entre el 30 y el 40% de las pacientes tratadas con terapia neoadyuvante presentan una respuesta patológica completa (pCR, del inglés), cuya definición es la ausencia de enfermedad infiltrante residual tanto en la mama como en la axila tras la cirugía²⁵, lo cual se traduce en tasas de supervivencia más altas. Los casos en los que histológicamente se objetiva enfermedad residual tienen más probabilidades de recurrencia y de desarrollar una enfermedad metastásica²⁶.

1.1.4. Estadíaie

El sistema TNM es el método de clasificación más empleado internacionalmente para determinar el estadio del cáncer de mama y es publicado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC). Este sistema recoge la información sobre el tamaño del tumor primario (T= tumor), los ganglios linfáticos regionales (N= nódulos linfáticos) y la afectación metastásica a distancia (M= metástasis). Todos estos datos se combinan para crear 5 estadios clínicos (0, I, II, III y IV) que resumen la extensión de la enfermedad regional (tamaño tumoral, extensión a piel o pared torácica, afectación ganglionar) y las metástasis a distancia. Esta información es crucial tanto para tomar de decisiones sobre el tratamiento local como para evaluar la necesidad de terapias sistémicas. Asimismo, es útil para comparar a los pacientes en el ámbito de la investigación⁵.

1.2. NEOADYUVANCIA EN EL CÁNCER DE MAMA

La quimioterapia neoadyuvante (NAC, del inglés) es aquella que se administra como primera opción terapéutica, con la intención de disminuir el tamaño tumoral y de esta manera facilitar una posterior intervención quirúrgica (tanto en la mama como a nivel axilar).

El inicio de su uso en cáncer de mama se remonta a la década de 1980, cuando se observó que los efectos secundarios de dicha terapia eran comparables a los observados en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante convencional, suponiendo una reducción más efectiva de la carga tumoral²⁷.

En 1988, se inició uno de los primeros y más largos ensayos aleatorizados, para comparar el uso de NAC o adyuvante en pacientes con cáncer de mama operable: el protocolo B-18 del Proyecto Nacional de Cirugía Adyuvante de Mama e Intestino (NSABP, del inglés). En este estudio, 1523 pacientes fueron aleatorizadas a 4 ciclos de doxorubicina y ciclofosfamida (AC) antes (n = 747) o después de la cirugía (n = 759), y se demostró que no había diferencias significativas, entre una modalidad de tratamiento u otra, en términos de supervivencia global (SG) o supervivencia libre de enfermedad (SLE). Asimismo, con la NAC se lograba reducir el tamaño del tumor primario, por lo que permitía realizar cirugías conservadoras (tumorectomías) y a la vez valorar de manera individual la respuesta tumoral al tratamiento. Además, se observó que las pacientes con una pCR presentaban mejor pronóstico en comparación con las que tenían enfermedad residual^{28,29}.

En el ensayo 10902 de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC, del inglés) se obtuvieron resultados similares en cuanto a supervivencia, al compararse la administración neoadyuvante y adyuvante de 4 ciclos de quimioterapia, en este caso con fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida, en 698 pacientes con cáncer de mama operables; y también se demostró una asociación entre los pacientes que alcanzaron una pCR con un mejor pronóstico a largo plazo³⁰.

Debido a las altas tasas de regresión tumoral evidenciadas, el uso de NAC se afianzó, convirtiéndose en una parte fundamental del tratamiento en pacientes con cáncer de

mama localmente avanzado e inflamatorio, buscando la posibilidad de poder realizar la extirpación de lesiones que antes eran irreseccables³¹.

1.2.1. Respuesta al tratamiento neoadyuvante

Una de las principales ventajas de la NAC es que posibilita una evaluación objetiva de la efectividad de los medicamentos utilizados, ofreciendo información pronóstica según la respuesta al tratamiento. Por esta razón en las décadas siguientes su objetivo principal ha sido optimizar la combinación de fármacos para conseguir una mayor tasa de respuestas patológicas completas y comprender la biología del tumor a través de pruebas de capacidad de respuesta en modelos vivos³². Según se observó en un amplio metanálisis de 11695 pacientes, el porcentaje de pacientes que alcanzan una pCR tras NAC varía en función de los subtipos moleculares, lográndose tasas de un 8,3% en tumores Luminales, 18,7% en tumores Luminales-HER2 positivos, 31,1% en Triple Negativos y 38,9% en HER2 positivos (no Luminales)³³.

Tras los avances en los tratamientos de quimioterapia y terapias específicas adaptadas al tipo de tumor y la afectación ganglionar, las tasas de pCR han experimentado una mejora significativa, especialmente en el cáncer de mama triple negativo (83%) y HER2-positivo (65%)^{32, 34-37}. Sin embargo, incluso con las mejores técnicas de imagen disponibles en la actualidad, no se cuenta con la sensibilidad y especificidad suficientes para detectarlas y poder evitar cirugías de mama donde ya no queda enfermedad residual. Por ese motivo se siguen realizando exéresis quirúrgicas del lecho tumoral para su examen anatomopatológico.

Este estudio requiere muestrear toda la zona del lecho tumoral o el área marcada con los clips, así como el tejido adyacente. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés) recomienda tomar por lo menos un bloque de parafina por cada centímetro de tumor pre-tratamiento para su estudio histológico. En él se debe buscar e informar de la presencia de componente infiltrante e in situ y la extensión de ambos, así como de invasión linfovascular y presencia de cambios regresivos (fibrosis).

Aunque se ha comprobado que lograr una pCR está relacionado con una mayor SG y SLE, y que en estos casos la administración de tratamiento adyuvante no aporta

beneficios adicionales³⁸, el hecho de que persista la enfermedad después del tratamiento con NAC sugiere una resistencia parcial del tumor a la terapia y está vinculado a un pronóstico desfavorable. En este último contexto, en la actualidad, las pacientes generalmente no suelen beneficiarse de tratamientos adyuvantes más allá de la hormonoterapia o la radioterapia. Se han llevado a cabo ensayos clínicos para determinar el uso de quimioterapia o terapias dirigidas tras NAC en pacientes con enfermedad residual (PENELOPE-B³⁹, KATHERINE⁴⁰, OLYMPIA⁴¹, entre otros), y en algunos se ha evidenciado un beneficio notable de diversas estrategias. Estas alternativas resaltan la importancia de identificar a aquellas con mayor riesgo de recidiva y que pudieran beneficiarse de un tratamiento adicional.

La enfermedad residual tras NAC se suele evaluar utilizando un sistema de cuantificación de la carga de cáncer residual (RCB, del inglés). Este índice se calcula combinando una serie de variables que se obtienen luego de evaluar microscópicamente la pieza de resección y los ganglios linfáticos extraídos tras la NAC. Estas variables incluyen el tamaño del lecho tumoral (medido en dos dimensiones); el porcentaje del área tumoral ocupado por celularidad residual; el porcentaje de carcinoma in situ; el número de ganglios linfáticos positivos y el diámetro de la lesión metastásica ganglionar más grande. Estos parámetros se combinan dando lugar a cuatro posibles categorías, que se correlacionan con la supervivencia a largo plazo: RCB 0 (pCR), RCB I (mínima enfermedad residual), RCB II (moderada enfermedad residual) y RCB-III (quimiorresistencia)⁴². Actualmente, no está recomendada la determinación de biomarcadores como los receptores hormonales, HER2 o índice proliferativo⁴³⁻⁴⁵, por lo que las características del tumor quedan menos definidas, ya que se carece de información sobre los posibles mecanismos implicados en la resistencia al tratamiento, así como de alteraciones en los patrones de expresión génica o mutaciones que podrían verse influenciados por la NAC⁴⁶.

Los nuevos ensayos clínicos diseñados para demostrar la eficacia de un tratamiento adicional en pacientes con enfermedad residual tras NAC intentan suplir estas carencias adoptando métodos como el índice CPS-EG (*clinical-pathologic scoring system incorporating ER status and nuclear grade*), aunque dicho índice dista mucho de aportar una información precisa de la biología y potencial comportamiento del

tumor⁴⁷. Además, hay que añadir que algunos de los factores que incluye (como la valoración de los receptores de estrógeno o el grado histológico) presentan cierta subjetividad y dependen de la experiencia del patólogo que los analiza.

1.3. PAPEL DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN EL CÁNCER DE MAMA

1.3.1. Plataformas genómicas

El estudio de perfiles de expresión génica ha impulsado el desarrollo de plataformas genómicas que identifican subgrupos de cáncer de mama con respuestas específicas a la terapia⁴⁸. A pesar de que en el cáncer de mama en estadio inicial con RE-positivos, tratado con terapia hormonal adyuvante (tamoxifeno) más quimioterapia, se ha demostrado una disminución del riesgo de recurrencia y mortalidad⁴⁹, el uso de quimioterapia adicional no siempre es beneficioso. Las plataformas genómicas se utilizan hoy en día en la práctica clínica para estratificar a las pacientes que tengan tumores con estas características y que sean HER2-negativo, en grupos pronósticos de bajo y alto riesgo. Las pacientes con bajo riesgo pueden ahorrarse con seguridad el uso de quimioterapia adyuvante, mientras que las pacientes en el grupo de alto riesgo deberían beneficiarse de este tratamiento⁵.

En la actualidad existen varias plataformas genómicas disponibles, entre las cuales están el Breast Cancer Index[®] de 7 genes, EndoPredict[®] de 12 genes, Prosigna[®] de 20 genes, Oncotype DX Breast Recurrence Score[®] de 21 genes y MammaPrint[®] de 70 genes (ver **tabla 2**). Estas dos últimas tienen el mismo nivel de evidencia (I) y grado de recomendación (A), para su uso en cuanto a toma de decisiones del tratamiento y se han incorporado en la octava edición del manual de estadificación del cáncer del AJCC para la clasificación del cáncer de mama^{5, 50}.

1.3.1.1. *El test Oncotype DX Breast Recurrence Score[®]*

Oncotype DX Breast Recurrence Score[®] es una prueba pronóstica y predictiva de 21 genes indicada en pacientes con cáncer de mama en estadio inicial RE-positivos, HER2-negativo y con ganglios linfáticos negativos o con hasta tres ganglios positivos⁵¹. Fue desarrollada para predecir el beneficio de la quimioterapia, para lo cual cuantifica la

	MammaPrint	Oncotype DX	Prosigna (PAM50)	EndoPredict	Breast Cancer Índex
Número de genes	70	21	50	11	7
Método	Microarray de ADN	RT-PCR	NanoString	RT-PCR	RT-PCR
Tipo de muestra tisular	Congelado/FFPE	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE
Localización	Central	Central	Local	Local	Central
Resultados de las pruebas	Riesgo alto o bajo + subtipo	Riesgo alto, intermedio o bajo	Riesgo alto, intermedio o bajo + subtipo	Riesgo alto o bajo	Riesgo alto o bajo, beneficio alto o bajo
Indicación clínica	Predecir el pronóstico y guiar la toma de decisiones con respecto a la quimioterapia para mujeres con CMI RE+/HER2-, GL- o GL+ (1-3)	Predecir el pronóstico y guiar la toma de decisiones con respecto a la quimioterapia para mujeres con CMI RE+/HER2-, GL- o GL+ (1-3)	Predecir el pronóstico y guiar la toma de decisiones con respecto a la quimioterapia para mujeres con CMI RE+/HER2-, GL- o GL+ (1-3)	Predecir el pronóstico y guiar la toma de decisiones con respecto a la quimioterapia para mujeres con CMI RE+/HER2-, GL- o GL+ (1-3)	Predecir el pronóstico y guiar la toma de decisiones con respecto a la quimioterapia para mujeres con CMI RE+/HER2-, GL-
Ensayo (s) de validación prospectiva	MINDACT	TAILORx y RxPONDER	OPTIMA	Ninguno	Ninguno
Aprobación regulatoria	EMA, FDA	EMA, FDA	EMA, FDA	EMA, FDA	No está aprobado

ADN, ácido desoxirribonucleico; FFPE, fijado en formalina e incrustado en parafina; CMI, cáncer de mama en estadio inicial; GL, ganglio linfático; EMA, Agencia Europea de Medicamentos.

Tabla 2. Plataformas genómicas utilizadas para la toma de decisiones sobre quimioterapia en cáncer de mama positivo para RE y HER2 negativo (adaptada de WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2)⁵.

expresión de 21 genes en tejido tumoral fijado e incluido en parafina, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa y alto rendimiento (RT-PCR). De estos 21 genes, 16 están relacionados con el cáncer de mama (*Ki67, STK15, survivina, ciclina B1, MYBL2, GRB7, HER2, ER, PGR, BCL2, SCUBE2, estromelina 3, catepsina L2, GSTM1, CD68 y BAG1*) y sus niveles de expresión se normalizaron con respecto a 5 genes de referencia (*Beta-actina, GAPDH, RPLPO, GUS y TFRC*)⁵².

En base a la expresión de estos genes se desarrolló un algoritmo que calcula el resultado Recurrence Score (RS) en la muestra de tejido tumoral de cada paciente. El RS es una variable continua que va de 0 a 100 (cuanto mayor es el puntaje, mayor es la probabilidad de recurrencia a distancia a los 9 años, cuando solo se administra terapia endocrina). Los puntos de corte pre-definidos para el RS fueron < 18 (RS bajo), 18–30 (RS intermedio) y ≥ 31 (RS alto), lo que equivale a tasas de recaída a 10 años del 7%, 14% y 30%. El RS también se correlaciona con la probabilidad de beneficio de la adición de quimioterapia al tratamiento con terapia hormonal, siendo actualmente la única plataforma genómica validada tanto para la predicción como para el pronóstico^{51,52}. Para minimizar el potencial de infra-tratamiento, en el ensayo TAILORx⁵³ se utilizaron puntos de corte diferentes para el RS: ≤ 10 , 11–25 y 26–100 definidos como RS bajo, intermedio y alto, respectivamente. A raíz de los resultados de este estudio, la clasificación del RS cambió y se consideraron que no se beneficiaban de quimioterapia asociada al tratamiento endocrino los tumores con RS<25 (con alguna excepción de acuerdo con el estado menopáusico). El estudio RxPONDER⁵⁴ confirmó el valor clínico del RS en pacientes con afectación axilar (1 a 3 ganglios).

Sin embargo, ni el Oncotype DX Breast Recurrence Score® ni ninguna otra plataforma genómica han sido validados después de la NAC para identificar pacientes en riesgo de recurrencia de su enfermedad, habiéndose enfocado únicamente en indicar o no un tratamiento de quimioterapia preoperatoria pero no en casos de enfermedad residual⁵⁵.

1.3.2. Biopsia líquida

Se conoce como biopsia líquida a un método utilizado para obtener materiales derivados del tumor, como el ADN tumoral circulante (ctDNA, del inglés), ARN, células tumorales circulantes (CTCs, del inglés) intactas, plaquetas o vesículas extracelulares, de fluidos corporales (sangre, orina, saliva, heces o incluso líquido cefalorraquídeo)⁵⁶ (ver **figura 2**). La mayoría de estos componentes son liberados al torrente sanguíneo como resultado de la apoptosis, necrosis o liberación activa de las células de un tumor primario⁵⁷.

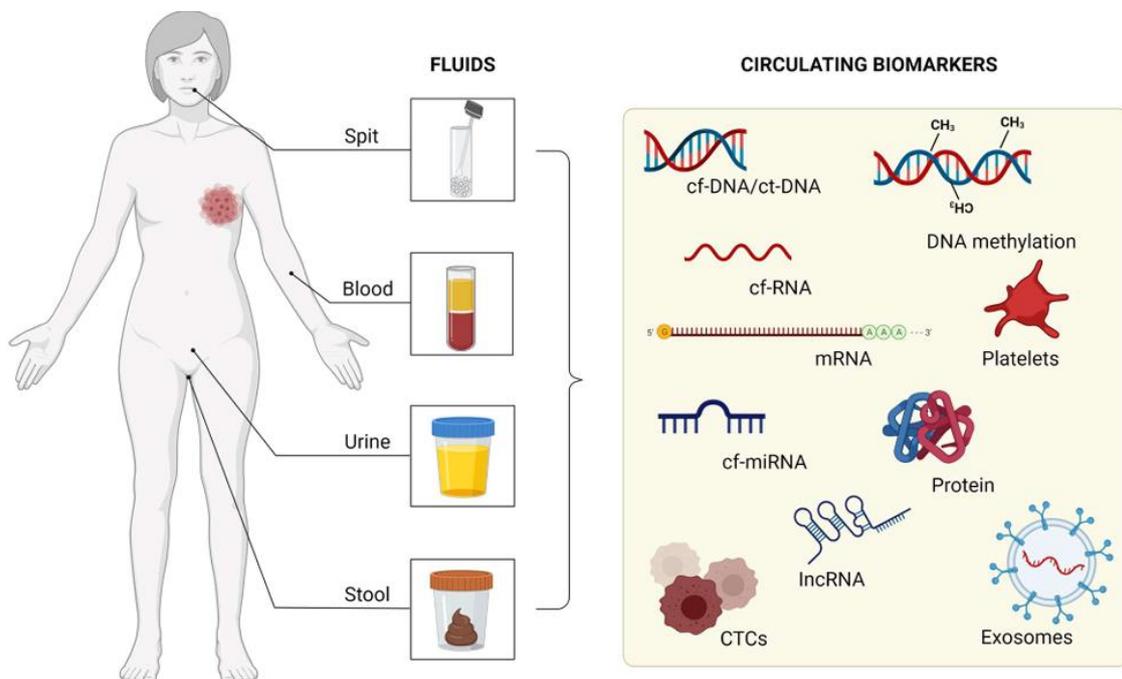


Figura 2. Fluidos donde se pueden encontrar marcadores tumorales circulantes (Freitas AJA et al., 2022)⁵⁸.

El concepto de biopsia líquida se originó en 1869 cuando Ashworth evidenció la presencia de células en la sangre de un paciente con cáncer metastásico, con una apariencia similar a las células tumorales en los tumores primarios (CTCs)⁵⁹. En 1948, Mandel y Métais publicaron el primer hallazgo de ADN libre de células (cfDNA, del inglés) en el torrente sanguíneo de personas sanas y enfermas⁶⁰, y 30 años más tarde se describió su presencia en el suero de pacientes con cáncer⁶¹. A principios de la década de los 90 se demostró en estos pacientes que este ADN provenía de tejidos

tumorales debido a la detección de mutaciones características del cáncer, encontrándose mutaciones oncogénicas de *N-ras* en el plasma de pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda⁶², y mutaciones de *K-ras* en el plasma de pacientes con adenocarcinoma pancreático⁶³.

La biopsia líquida destaca por ser una técnica no invasiva, y se ha convertido en una alternativa viable a la biopsia tumoral tradicional, que permite tener información de todo el panorama genómico de un tumor, a pesar del grado de heterogeneidad que pueda tener el mismo⁶⁴. Asimismo, se ha demostrado que puede proporcionar información importante en cuanto al pronóstico del paciente, la posible resistencia a fármacos y el tratamiento individualizado⁶⁵.

De los componentes de una biopsia líquida los más estudiados y utilizados como biomarcadores son las CTCs y el ctDNA. Las CTCs son células que se desprenden pasivamente de lesiones tumorales primarias o metastásicas y adquieren la capacidad de invadir el torrente sanguíneo, gracias a propiedades de transición epitelio-mesénquima⁶⁶. Desde el torrente circulatorio pueden viajar a órganos distantes e infiltrarlos y es por esto por lo que se ha asumido que son la base del desarrollo de metástasis⁶⁶⁻⁶⁷.

El ctDNA es una fracción del total de cfDNA presente en pacientes con cáncer⁶⁵. Es liberado directamente por las células tumorales, ya sea en el sitio del tumor o desde CTCs en la circulación⁶⁴. El cfDNA, en cambio, está también presente en individuos sanos y su liberación no se debe solo a la necrosis y apoptosis, sino que puede verse aumentada ante situaciones de inflamación, trauma o incluso en el ejercicio exhaustivo. La concentración de ctDNA puede ser menor al 0.01% del cfDNA⁶⁸ y puede variar según la etapa, la localización y la vascularización del tumor⁶⁹. A pesar de tener tan baja proporción de concentración en plasma, el desarrollo reciente de tecnologías más sensibles y específicas, como la secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés), ha facilitado su análisis⁶⁵.

Los análisis moleculares integrados han demostrado que *TP53* y *PIK3CA* son los genes más frecuentemente mutados en el cáncer de mama⁸. Como ya se ha explicado en apartados anteriores, el patrón de mutación varía según el subtipo intrínseco de

cáncer, lo cual influye en la respuesta al tratamiento y el pronóstico⁵. El ctDNA puede utilizarse como biomarcador para identificar estas mutaciones, ya que conserva las variantes genéticas y características epigenéticas del tumor primario, y monitorizarlas longitudinalmente^{70,71}.

1.3.2.1. Aplicaciones del ctDNA en el cáncer de mama

A pesar de que la biopsia tumoral sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento en cáncer de mama, los avances en la detección del ctDNA lo han convertido en una alternativa que refleja con precisión la heterogeneidad de esta enfermedad, desde su detección hasta fases avanzadas⁷².

En el cáncer de mama en estadio temprano los niveles globales de ctDNA son mucho más bajos que en pacientes con enfermedad metastásica, lo cual ha sido un impedimento para poder comprobar su efectividad como método de cribado⁷². Cohen et al.⁷³ utilizaron CancerSEEK, una prueba de sangre para identificar ocho tipos de cáncer, evaluando mutaciones en 16 genes y para el cáncer de mama consiguieron una sensibilidad del 33% y una especificidad del 99%. Por otro lado, Beaver et al.⁷⁴ evaluaron mutaciones de *PIK3CA* en el plasma de pacientes con cáncer de mama en estadio temprano, mostrando una sensibilidad del 93,3% y una especificidad del 100%. Esta variabilidad en las sensibilidades obtenidas en los diferentes ensayos, refleja la necesidad de estudios prospectivos más amplios para poder validar el uso de ctDNA como método de detección y que pueda implementarse en la práctica de rutina.

En el contexto neoadyuvante del cáncer de mama no metastásico, la monitorización de los niveles de ctDNA después de la NAC y la cirugía, puede ser una herramienta útil tanto para valorar la presencia de enfermedad residual mínima (MRD, del inglés), es decir, cualquier componente tumoral residual posterior a la cirugía de resección que pueda llevar a una recaída; así como para estimar la probabilidad de recurrencia, evaluar la respuesta al tratamiento y guiar las decisiones terapéuticas posteriores^{64,65}. García-Murillas et al. analizaron prospectivamente muestras de plasma de 55 pacientes con cáncer de mama en etapa temprana que recibieron NAC y demostraron que la detección de ctDNA en plasma después del tratamiento predijo la recaída metastásica

con alta precisión, y que el seguimiento de mutaciones en muestras seriadas aumentó la sensibilidad para la predicción de recaídas, con un tiempo promedio de anticipación de 7.9 meses sobre la recaída clínica⁷⁵. Asimismo, otros estudios han descrito que la eliminación de ctDNA tras la NAC se ha asociado a una pCR⁷⁶ y su persistencia a recurrencia y mala respuesta a la NAC⁷⁷. El papel del análisis de ctDNA en este contexto aún no está bien establecido y existe información contradictoria al respecto⁵⁸, ya que un metaanálisis reciente no encontró una asociación significativa entre la detección de ctDNA y la probabilidad de lograr una pCR⁷⁸.

El ctDNA es un biomarcador prometedor en el cáncer de mama metastásico, mostrando una mejor correlación con la carga tumoral y la respuesta al tratamiento que otros marcadores⁷⁹. Permite identificar mutaciones relevantes para el tratamiento, como *PIK3CA*, *ESR1*, *HER2*, *AKT1* y *PTEN*⁸⁰. Además, se está investigando su utilidad para evaluar mecanismos de resistencia a terapias específicas, como los inhibidores de CDK4/6⁸¹.

Las mutaciones en el gen *ESR1*, que codifica el receptor de estrógeno alfa, son más comunes en cánceres de mama metastásicos y se asocian con la resistencia a la terapia endocrina, especialmente con inhibidores de aromatasa^{82,83}. El ctDNA permite detectar de forma fiable estas mutaciones en pacientes con cáncer de mama metastásico RE-positivo, reflejando mejor el estado del tumor en tiempo real. El seguimiento seriado de ctDNA permite detectar estas mutaciones meses antes de la progresión clínica, lo cual puede guiar la toma de decisiones terapéuticas y mejorar el pronóstico de estas pacientes⁸⁴. Recientemente, la FDA ha aprobado la detección de mutaciones de *ESR1* por biopsia líquida como requisito para la prescripción de nuevos tratamientos endocrinos con un degradador selectivo del RE (elacestrant).

2. HIPÓTESIS

2.1. HIPÓTESIS

Esta tesis se plantea de acuerdo con la siguiente hipótesis: la caracterización de la enfermedad residual tras neoadyuvancia utilizando el análisis del ctDNA para valorar la MRD y/o plataformas genómicas, permitiría un mejor abordaje de las pacientes y un tratamiento más personalizado.

2.2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente, el uso de NAC en cáncer de mama se está extendiendo, debido a las ventajas que ofrece este régimen de tratamiento, especialmente la posibilidad de alcanzar una pCR. Sin embargo, no todos los tumores presentan el mismo tipo de respuesta a la terapia; esta dependerá principalmente del subtipo molecular del tumor que tenga la paciente.

En el caso de la enfermedad HER2 positiva o triple negativa, las tasas de respuesta completa son altas. A pesar de ello, se siguen realizando intervenciones quirúrgicas a las pacientes para confirmar histológicamente la desaparición de la celularidad tumoral, ya que las evaluaciones clínico-radiológicas no pueden determinar con exactitud la ausencia de enfermedad residual. En este sentido, nos planteamos si el empleo de técnicas muy sensibles y poco invasivas, como el análisis de ctDNA en sangre, permitiría confirmar la respuesta completa sospechada por técnicas de imagen e, hipotéticamente, evitar cirugías innecesarias.

Por otro lado, en los tumores Luminales-HER2 negativos la situación es opuesta, y las respuestas completas son muy infrecuentes. En este contexto tiene más sentido caracterizar mejor la enfermedad resistente, con el objetivo de categorizar su riesgo y personalizar el tratamiento. Para ello nos hemos planteado valorar el riesgo biológico con una plataforma genómica mundialmente validada para el tratamiento adyuvante de este tipo de tumores. De confirmarse la hipótesis del trabajo, podría plantearse diferenciar de rutina esta enfermedad residual con el fin de identificar a pacientes de alto riesgo que podrían beneficiarse, de inicio, de un tratamiento más dirigido.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRIMARIO:

- 1) El objetivo principal de este trabajo es valorar el papel clínico de la biopsia líquida y el recurrence score para mejorar la caracterización y el manejo de las pacientes con cáncer de mama tras NAC.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- 1) Evaluar si la eliminación de ctDNA durante la NAC podría correlacionarse con una pCR en pacientes con cáncer de mama HER2+ y triple negativo.
- 2) Comparar los niveles de ctDNA de estas pacientes a lo largo del tiempo para valorar la posible reaparición del ctDNA y comprobar si esta vigilancia continua podría identificar a las pacientes que recurrirían radiológicamente.
- 3) Validar el valor pronóstico del RS determinado por Oncotype DX Breast Recurrence Score® después de la NAC en pacientes con cáncer de mama luminal-HER2 negativo con enfermedad residual, para identificar los tumores residuales de alto riesgo biológico.
- 4) Contrastar los resultados de RS antes y después de la NAC y valorar el efecto del tratamiento en la biología tumoral, independientemente del tipo de respuesta al mismo.

4. METODOLOGÍA

Para comprobar nuestra hipótesis, diseñamos dos estudios en poblaciones distintas de pacientes con cáncer de mama. Estos estudios se basaron en la clasificación molecular del cáncer de mama, ya que como hemos explicado anteriormente el subtipo molecular es un factor determinante en la respuesta a la terapia neoadyuvante.

4.1. PRIMER ESTUDIO: ANÁLISIS DEL ctDNA DURANTE Y DESPUES DE LA NAC

4.1.1 Diseño del estudio y población

Este estudio adoptó un diseño prospectivo y observacional, con el objetivo de evaluar la eficacia del tratamiento neoadyuvante mediante el seguimiento de las mutaciones específicas de *PIK3CA* y/o *TP53* en pacientes con carcinoma de mama, mediante la realización de biopsias líquidas durante el tratamiento con NAC. La investigación se llevó a cabo en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, abarcando el período de 2018 a 2019.

Se reclutaron prospectivamente pacientes diagnosticadas con carcinoma de mama infiltrante HER2+ o triple negativo en estadio I-III. Las pacientes fueron seleccionadas tras la confirmación histológica de su diagnóstico y la determinación de su elegibilidad para recibir NAC. La confirmación del diagnóstico se realizó mediante biopsia y las muestras fueron evaluadas por patólogos expertos en el área de patología mamaria.

Posteriormente, la cohorte piloto se estratificó para incluir únicamente a aquellas pacientes que presentaban mutaciones específicas de *PIK3CA* y/o *TP53*, detectadas a través de una NGS en las muestras de tumor primario. Esta técnica avanzada permitió la identificación precisa de las mutaciones en el ADN tumoral, proporcionando un perfil genético detallado para cada paciente.

Las mutaciones identificadas en *PIK3CA* y/o *TP53* se utilizaron para desarrollar ensayos de biopsia líquida de ctDNA personalizados, utilizando la tecnología SafeSEQ. Estos ensayos "a medida" permitieron rastrear de manera específica y sensible la presencia o ausencia de estas mutaciones en muestras de plasma de cada paciente a lo largo del tratamiento (ver **figura 3**).

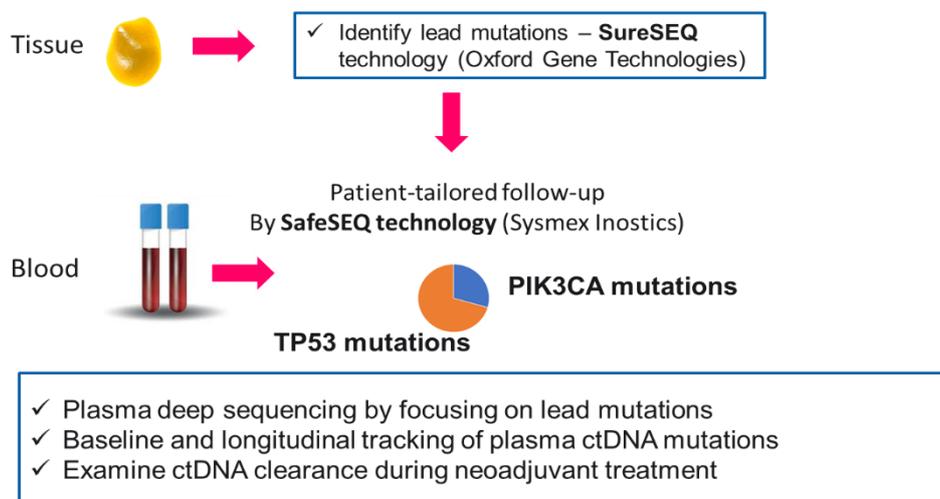


Figura 3. Esquema de trabajo. *Figura original.*

El seguimiento longitudinal del ctDNA se realizó en múltiples puntos temporales: al inicio del estudio antes de la NAC, a la mitad del tratamiento, después del tratamiento, inmediatamente antes de la cirugía y en tres momentos postquirúrgicos (10 semanas, 6 meses y 12 meses). Además, las pacientes se sometieron a evaluaciones radiológicas, incluyendo mamografía, ultrasonido y resonancia magnética nuclear (RMN), como parte de la práctica clínica de rutina. Estas evaluaciones permitieron monitorizar la respuesta tumoral y corroborar los hallazgos de las biopsias líquidas.

Los regímenes de NAC se administraron siguiendo el protocolo establecido por el hospital, basado en antraciclinas y taxanos. En el caso de pacientes con carcinoma de mama triple negativo, los regímenes de NAC también incluyeron agentes de platino. Para las pacientes con HER2+, se incorporaron terapias específicas con anticuerpos dirigidos contra la vía de señalización HER2, lo cual es fundamental para su tratamiento.

Todas las pacientes se sometieron a una intervención quirúrgica de escisión después de completar la NAC. La pCR se evaluó en las muestras quirúrgicas, siendo un indicador clave de la eficacia del tratamiento y la ausencia de enfermedad residual.

4.1.1.1. Consideraciones éticas

El estudio recibió la aprobación del comité de ética médica del Hospital Universitario Vall d'Hebron (PR(AG)204/2016) el 30 de septiembre de 2016. Se obtuvo el consentimiento informado oral y por escrito de todas las pacientes, garantizando su comprensión y aceptación voluntaria para la participación en el estudio y la toma de muestras con fines de investigación.

4.1.2. Análisis de la secuenciación dirigida del tejido y del ADN plasmático

4.1.2.1. Examen de muestras del tejido tumoral

Inicialmente, se examinaron muestras de tejido tumoral de todas las pacientes para detectar mutaciones en los genes *PIK3CA* y *TP53* utilizando la tecnología SureSeq basada en NGS proporcionada por Oxford Gene Technology. El ADN de las muestras tumorales se aisló utilizando los kits de tejido de ADN Qiasymphony (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Este proceso permitió una extracción eficiente y precisa del ADN, asegurando la calidad y cantidad adecuadas para el análisis posterior.

4.1.2.2. Procedimientos de Biopsia Líquida

Para los ensayos de biopsia líquida, se recogió sangre de las pacientes en tubos Streck® Cell-Free DNA BCT, que están diseñados específicamente para estabilizar el cfDNA en la sangre. La sangre se procesó para obtener plasma mediante un protocolo de doble centrifugación. Este proceso permitió obtener entre 8 a 9 ml de plasma por muestra, las cuales se almacenaron a -80 °C hasta el momento de la extracción de ADN.

El ADN circulante se extrajo del plasma utilizando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (Qiagen) con una lisis prolongada de 60 minutos para maximizar el rendimiento del ADN. Posteriormente, el ADN se analizó utilizando la tecnología Plasma SafeSEQ (Sysmex Inostics, Inc., Hamburgo, Alemania), la cual permite una detección altamente sensible de mutaciones específicas en el ADN circulante.

4.1.2.3. Diseño de Ensayos Personalizados

Los ensayos de biopsia líquida SafeSEQ personalizados se diseñaron a medida para cada paciente, basándose en las mutaciones tumorales identificadas previamente mediante el ensayo SureSeq NGS. Para examinar cada mutación en *PIK3CA* y *TP53* detectada en la muestra de tumor del paciente, se desarrollaron reacciones multiplex específicas en los laboratorios de investigación de Sysmex Inostics, Alemania⁸⁵. En algunos casos, se analizaron otras mutaciones específicas detectadas en las muestras tumorales junto con *PIK3CA* o *TP53*.

4.1.2.4. Cuantificación y Control de Calidad del ADN

Antes de la detección del ctDNA en las muestras de plasma, el ADN aislado del plasma se cuantificó utilizando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) LINE-1, siguiendo protocolos establecidos previamente⁸⁶. Se diseñó un ensayo multiplex personalizado para cada paciente y se controló la calidad en fragmentos de ADN genómico con un tamaño medio de aproximadamente 160 pares de bases, utilizando el instrumento Covaris M220 (Covaris LLC, Woburn, MA, EE. UU.).

El ruido de fondo se determinó para cada multiplex utilizando $2 \times 10,000$ equivalentes genómicos de ADN genómico de referencia (NIST, RM8398). Cada multiplex contenía cebadores unidos a identificadores únicos (UID), que servían como códigos de barras moleculares para la corrección de errores según el principio Safe-Seq⁸⁵.

4.1.2.5. Procedimiento de PCR y Purificación

La PCR con UID se realizó con 13 ciclos, seguidos de una purificación basada en perlas utilizando perlas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.). Los amplicones específicos del paciente se diluyeron antes de una segunda PCR en la que se adjuntaron secuencias de índice específicas de la muestra, generando familias de UID (ver **figura 4**). Los productos de PCR de índice se purificaron en un formato agrupado utilizando QIAquick (Qiagen) y una ronda adicional de purificación con perlas AMPure XP. Las muestras de ADN purificado se cuantificaron utilizando un Bioanalyzer (Agilent,

Santa Clara, CA, EE. UU.) y se secuenciaron en el instrumento NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

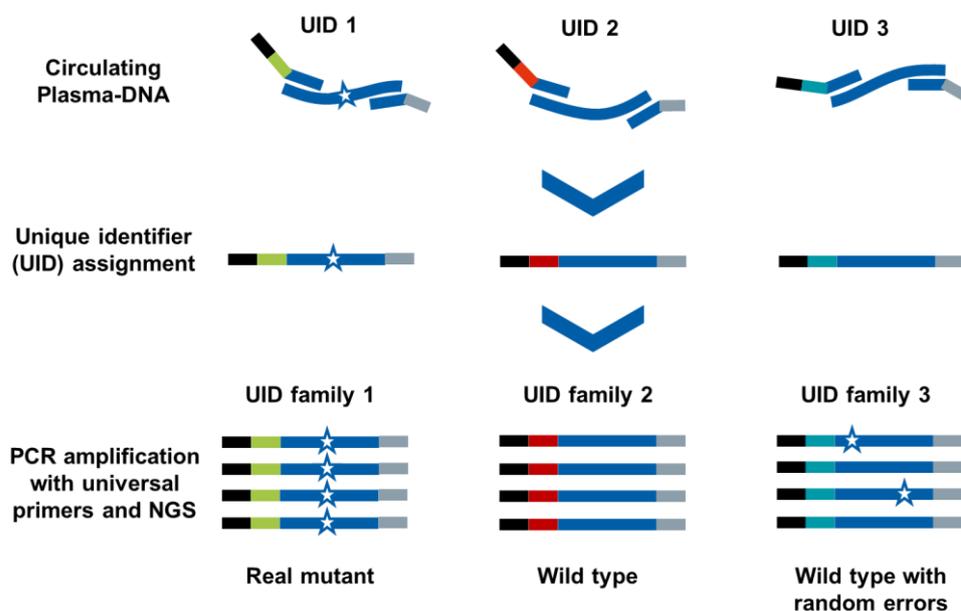


Figura 4. Metodología Plasma-Safe-Sequencing. La generación de familias de identificadores únicos (UID) seguida de NGS estándar permite discriminar entre mutantes reales y errores aleatorios. Los códigos de barras UID se agregan durante una primera amplificación por PCR. Las familias UID se generan en una segunda PCR (Begona Jimenez Rodriguez et al)⁸⁷.

4.1.3. Análisis estadístico

La medida de resultado primaria en este estudio fue la pCR, definida como la ausencia de enfermedad residual invasiva tanto en la mama como en los ganglios linfáticos axilares, después de la NAC. La evaluación de la pCR se llevó a cabo mediante el análisis histopatológico de las muestras quirúrgicas obtenidas tras la cirugía.

Los resultados de las mutaciones en el ctDNA se categorizaron como indetectables o detectables en las muestras de plasma de cada paciente. Se recogieron muestras de plasma al inicio del estudio, antes de la cirugía y después de la NAC. Estas muestras se compararon para evaluar los cambios en el perfil mutacional del ctDNA a lo largo del tratamiento. El análisis se centró en determinar la presencia o ausencia de las mutaciones específicas previamente identificadas en los genes *PIK3CA* y *TP53*.

La precisión de las pruebas de ctDNA se evaluó mediante el cálculo del valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para la combinación de resultados positivos de ctDNA y respuesta clínica completa (cCR, del inglés). Para este propósito, se utilizó la calculadora de evaluación de pruebas de diagnóstico de MedCalc Statistical Software Versión 20.027 (MedCalc Software bv, Ostend, Bélgica).

- **Valor Predictivo Positivo (VPP):** Se definió como la probabilidad de que una paciente con un resultado positivo en la prueba de ctDNA realmente tuviera una pCR.
- **Valor Predictivo Negativo (VPN):** Se definió como la probabilidad de que una paciente con un resultado negativo en la prueba de ctDNA realmente no tuviera una pCR.

Estos cálculos permitieron evaluar la eficacia del uso de ctDNA como biomarcador no invasivo para predecir la respuesta al tratamiento en pacientes con carcinoma de mama.

4.1.3.1. Análisis de Datos de Secuenciación

Los datos de secuenciación se analizaron utilizando paquetes de software propietarios desarrollados por Sysmex Inostics. El análisis de mutaciones y las llamadas de mutaciones individuales se realizaron con un criterio de mutación positiva (mutación detectada, MD) o mutación negativa (no se detectó mutación, NMD, del inglés) para cada punto de tiempo de la muestra del paciente. Las llamadas de mutación positiva se informaron en términos de moléculas mutantes por mililitro de plasma (MM/ml). Los umbrales de llamada positiva se establecieron individualmente como valores de moléculas mutantes a tres veces el valor de fondo para cada posición de mutación, con un mínimo de tres moléculas mutantes detectadas en la muestra de un paciente. Valores por debajo de estos umbrales no cumplieron con los criterios de mutación detectada y se designaron como NMD.

4.2. SEGUNDO ESTUDIO: VALOR PRONÓSTICO DE ONCOTYPE DX BREAST RECURRENCE SCORE® DESPUÉS DE LA NAC

4.2.1. Diseño del estudio y población

Este estudio piloto observacional, retrospectivo, de casos y controles se llevó a cabo en dos centros hospitalarios españoles: el Hospital Universitario Vall d'Hebron en Barcelona y el Hospital Universitario Virgen del Rocío en Sevilla. Este diseño permitió comparar retrospectivamente los resultados de pacientes con distintos desenlaces clínicos, proporcionando una visión comprensiva de la relación entre ciertos biomarcadores y la supervivencia a largo plazo en pacientes con carcinoma de mama luminal-HER2 negativo que habían recibido NAC.

Las pacientes incluidas en el estudio debían cumplir los siguientes criterios:

1. **Edad:** Mayores de 18 años.
2. **Diagnóstico:** Carcinoma de mama luminal-HER2 negativo.
3. **Tratamiento Previo:** Haber recibido NAC y no haber alcanzado una respuesta patológica completa (pCR).
4. **Seguimiento Clínico:**
 - **Grupo de Casos:** Pacientes que desarrollaron metástasis a distancia (DM, del inglés) durante el seguimiento.
 - **Grupo de Control:** Pacientes que no desarrollaron metástasis a distancia y tuvieron un seguimiento de al menos 5 años post-tratamiento.
5. **Tratamientos Adyuvantes:** Las pacientes solo podían haber recibido hormonoterapia y/o radioterapia como tratamientos adyuvantes, según indicación clínica.

El objetivo principal del estudio fue evaluar la relación entre la supervivencia a largo plazo y los resultados del RS obtenido mediante la prueba Oncotype DX Breast Recurrence Score®, realizada sobre la enfermedad residual después de la NAC. La prueba Oncotype DX Breast Recurrence Score® es una herramienta genómica que cuantifica el riesgo de recurrencia y ayuda a personalizar el tratamiento adyuvante en pacientes con carcinoma de mama.

Los registros médicos de las pacientes fueron revisados por patólogos en los centros participantes para identificar a las pacientes que cumplieran con los criterios del estudio. El período de reclutamiento de pacientes abarcó desde 2004 hasta 2015, y la recopilación de datos se realizó entre 2019 y 2022.

Datos Recopilados:

- **Características Demográficas**
- **Características Clínicas**
- **Características Patológicas:** Tipo de tumor, grado histológico, tamaño, focalidad, invasión linfovascular, estadificación pTNM (patológica) e ypTNM (post-neoadyuvante), estado de los receptores hormonales, HER2 e índice de proliferación Ki67 (antes y después del tratamiento).
- **Características Moleculares:** RS obtenido mediante la prueba Oncotype DX Breast Recurrence Score® antes y después de la NAC.
- **Puntuación y Clase de RCB:**
 - RCB-I: valores de RCB entre 0 y 1,36.
 - RCB-II: valores de RCB entre 1,37 y 3,28.
 - RCB-III: valores de RCB mayores de 3,28.

4.2.1.1. Consideraciones éticas

El estudio recibió la aprobación del comité de ética médica del Hospital Universitario Vall d'Hebron (PR(AG)161/2018) el 25 de mayo del 2018. Las pacientes dieron su consentimiento firmando la Hoja de Información al Paciente y el formulario de Consentimiento Informado. Se respetó la confidencialidad de los datos de cada paciente siguiendo la legislación vigente aplicable en materia de protección de datos personales.

4.2.2. Prueba genómica para el análisis de riesgo biológico

Se revisaron cuidadosamente las preparaciones histológicas y los bloques de parafina de las pacientes incluidas en el estudio. Este proceso se llevó a cabo para asegurar la calidad y representatividad de las muestras de tejido que serían sometidas a análisis.

Las muestras más representativas del tumor primario (biopsia, pre-NAC) y de la enfermedad residual (pieza quirúrgica, post-NAC) fueron seleccionadas para su análisis.

Posteriormente, se enviaron al laboratorio de referencia de Genomic Health en Redwood City, California, USA. Este laboratorio fue responsable de realizar el análisis genómico y estadístico de las muestras, garantizando la precisión y consistencia en la evaluación de los datos.

La prueba Oncotype DX Breast Recurrence Score® se realizó tanto antes como después de la NAC. Este enfoque permitió evaluar el cambio en el perfil genómico del tumor debido al tratamiento. El resultado de RS alto se definió como mayor a 25, indicando que el cáncer tiene un alto riesgo de recurrencia, según el estudio TAILORx⁵³. Por otro lado, los resultados de RS de 25 o menos se agruparon en dos grupos: uno de riesgo bajo (0-10) y otro de riesgo intermedio (11-25)⁸⁸.

4.2.3. Análisis estadístico

Este estudio se diseñó como un estudio de casos y controles con emparejamiento individual en una proporción de 1:5. Se incluyeron pacientes diagnosticadas con cáncer de mama luminal-HER2 negativo, las cuales se dividieron en dos grupos: pacientes con DM y pacientes sin DM.

Para determinar el tamaño muestral adecuado, se consideró un error alfa del 5 % (bilateral) y una potencia del 80 %. Basándose en estos parámetros, el número estimado de pacientes necesario fue de 280, distribuidos de la siguiente manera: 50 pacientes con DM (casos) y 230 pacientes sin DM (controles). Según la prueba Oncotype DX Breast Recurrence Score®, se clasificaron como pacientes de alto riesgo (expuestas) o de bajo riesgo (no expuestas).

Se utilizó la prueba de McNemar para realizar análisis estadísticos en datos pareados. Este análisis permitió evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas en las parejas de casos y controles. El análisis de datos pareados de Mantel-Haenszel

METODOLOGÍA

se aplicó para calcular los odds ratios (OR) pareados. Los hallazgos se consideraron positivos si los OR eran superiores a 1 y el valor p era $\leq 0,05$.

El análisis de sensibilidad se realizó utilizando regresión logística condicionada y métodos no condicionados. Este análisis ayudó a verificar la robustez de los resultados y a explorar posibles variaciones en los modelos estadísticos aplicados.

Se emplearon modelos de riesgos proporcionales de Cox, tanto univariados como multivariados, para analizar la asociación entre los RS y los desenlaces clínicos de interés, específicamente la metástasis a distancia y la SG.

La prueba de razón de verosimilitud se utilizó para evaluar la significancia estadística de los modelos de Cox, proporcionando una medida de la calidad del ajuste de los modelos y la fuerza de las asociaciones encontradas.

5. RESULTADOS

5.1. PRIMER ESTUDIO: ANÁLISIS DEL ctDNA DURANTE Y DESPUES DE LA NAC

5.1.1. Características de las pacientes y del tumor

En este estudio, se incluyeron prospectivamente un total de 29 pacientes con cáncer de mama HER2+ o triple negativo programadas para recibir NAC. Las muestras tumorales de estas pacientes fueron sometidas a un examen histológico detallado. Nueve pacientes fueron excluidas del análisis posterior debido a la ausencia de mutaciones en los genes *TP53* o *PIK3CA* en el tejido tumoral, según lo evaluado mediante NGS.

La cohorte final del estudio incluyó a 20 pacientes, todas las cuales presentaban al menos una mutación en *TP53*, y cinco de estas pacientes también tenían una mutación en *PIK3CA*. Se diseñaron ensayos SafeSEQ específicos para cada paciente, dirigidos a todas las mutaciones *TP53* y *PIK3CA* detectadas en el tejido tumoral, con el objetivo de monitorizar estas mutaciones en el plasma durante la NAC. Hubo tres pacientes (identificadas como 32, 33 y 34) que tenían una única mutación en *TP53* detectada en sus tumores, que además presentaban mutaciones adicionales en los siguientes genes: *NTRK1*, *NTRK3*, *HER2/ERBB2*, *GRM3*, *AKT3*, *FGF10* y *FANCF*. Para estas pacientes, se desarrollaron ensayos SafeSEQ específicos para detectar la presencia de estas mutaciones adicionales en el plasma.

Las características clínicas y patológicas de las pacientes, las mutaciones identificadas en el tumor y las mutaciones detectadas en las muestras de plasma de referencia antes del inicio del tratamiento con NAC se resumen en la **Tabla 3**.

La cohorte piloto estaba compuesta por 12 pacientes con cáncer de mama triple negativo y 8 pacientes con cáncer de mama HER2+. La mediana de edad de las pacientes fue de 57 años, con un rango de 38 a 88 años.

RESULTADOS

ID Paciente	Subtipo tumoral	Mutación tisular	Mutación plasmática
1	Triple negativo	<i>TP53</i> p.R273P	<i>TP53</i> p.R273P (351,8 MM; 58,6 MM/mL)
4	Triple negativo	<i>TP53</i> p.R110Pfs*39, <i>TP53</i> p.R290Pfs*55, <i>TP53</i> p.R175H and <i>PIK3CA</i> p.R310H	<i>TP53</i> p.R110Pfs*39 (70,9 MM; 12,9 MM/mL), <i>TP53</i> p.R290Pfs*55 (NMD), <i>TP53</i> p.R175H (11,2 MM; 2,0 MM/mL)
5	HER2+	<i>TP53</i> p.R290Pfs*55	<i>TP53</i> p.R290Pfs*55 (259,5 MM; 89,9 MM/mL)
6	Triple negativo	<i>TP53</i> p.Q144*	<i>TP53</i> p.Q144* (90,9 MM; 15,1 MM/mL)
7	Triple negativo	<i>TP53</i> p.R110P	<i>TP53</i> p.R110P (1850,1 MM; 308,4 MM/mL)
9	Triple negativo	<i>TP53</i> p.R273L	<i>TP53</i> p.R273L (112,7 MM; 18,8 MM/mL)
10	HER2+	<i>TP53</i> p.V173L and <i>PIK3CA</i> p.H1047R	<i>TP53</i> p.V173L (NMD) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (4,6 MM; 0,8 MM/mL)
11	Triple negativo	<i>TP53</i> p.R175H	<i>TP53</i> p.R175H (15,3 MM; 7,7 MM/mL)
12	HER2+	<i>TP53</i> p.M237I and <i>PIK3CA</i> p.E542K	<i>TP53</i> p.M237I (13,7 MM; 6,9 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.E542K (39,2 MM; 19,6 MM/mL)
14	Triple negativo	<i>TP53</i> p.C176F	<i>TP53</i> p.C176F (67,2 MM; 11,2 MM/mL)
17	Triple negativo	<i>TP53</i> p.N131Tfs*39	<i>TP53</i> p.N131Tfs*39 (1168,5 MM; 194,8 MM/mL)
19	Triple negativo	<i>TP53</i> p.Y163*	<i>TP53</i> p.Y163* (58,5 MM; 9,7 MM/mL)
26	HER2+	<i>TP53</i> p.D281V and <i>PIK3CA</i> p.H1047R	<i>TP53</i> p.D281V (39,4 MM; 8,8 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (47,7 MM; 10,6 MM/mL)
28	Triple negativo	<i>TP53</i> p.R273H	<i>TP53</i> p.R273H (31,7 MM; 8,1 MM/mL)
29	HER2+	<i>TP53</i> p.K139_V143del	<i>TP53</i> p.K139_V143del (1,0 MM; 0,2 MM/mL)
30	HER2+	<i>TP53</i> p.R213*, <i>TP53</i> p.N131Tfs*39 and <i>PIK3CA</i> p.H1047R	<i>TP53</i> p.R213* (9,9 MM; 1,7 MM/mL), <i>TP53</i> p.N131Tfs*39 (NMD) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (13,3 MM; 2,2 MM/mL)
31	Triple negativo	<i>TP53</i> p.S127F	<i>TP53</i> p.S127F (2157,4 MM; 365,7 MM/mL)
32	HER2+	<i>NTRK1</i> p.Ser433Cys, <i>AKT3</i> p.Leu262Val, <i>NTRK3</i> p.Glu474Lys, <i>TP53</i> p.Glu285Lys, <i>ERBB2</i> p.Ile989Met, <i>GRM3</i> p.Asp97His and <i>GRM3</i> p.Arg101Thr	<i>NTRK1</i> p.Ser433Cys (NMD), <i>AKT3</i> L262V (1,3 MM; 0,2 MM/mL), <i>NTRK3</i> E474K (1,5 MM; 0,3 MM/mL), <i>TP53</i> E285K (2,7 MM; 0,5 MM/mL), <i>GRM3</i> D97H (2,3 MM; 0,4 MM/mL) and <i>GRM3</i> D101T (2,3 MM; 0,4 MM/mL)
33	Triple negativo	<i>TP53</i> A74fs and <i>FGF10</i> F146fs	<i>TP53</i> A74fs (12,2 MM; 3,4 MM/mL) and <i>FGF10</i> F146fs (8,1 MM; 2,3 MM/mL)
34	HER2+*	<i>FANCF</i> p.Leu241Arg <i>TP53</i> c.375+1dupG	NMD

*La paciente 34 tenía positividad de receptores de estrógenos en el 90% de las células tumorales.

Tabla 3. Características basales clínicas y del tumor y estatus del ctDNA.

En términos de la detección de mutaciones en el plasma, 19 de las 20 pacientes (lo que corresponde a un porcentaje de concordancia general del 95 %) mostraron al menos una mutación específica del tumor detectada en su plasma (ctDNA positivo) al inicio del estudio. Esto resalta la eficacia de los ensayos SafeSEQ para la monitorización de mutaciones en el plasma durante el tratamiento con NAC.

5.1.2. Respuesta a la NAC

En el análisis de los resultados obtenidos, se observó que un total de 15 pacientes (75,0 %) lograron una pCR tras la NAC, según la evaluación histopatológica de las muestras quirúrgicas. En detalle, la pCR se logró en 10 de las 12 pacientes (83,3 %) con tumores triple negativo y en 5 de las 8 pacientes (62,5 %) con tumores HER2+ (ver **Tabla 4**). La evaluación clínica y por imágenes reveló que 15 pacientes (75,0 %) alcanzaron una cCR. La concordancia entre pCR y cCR fue alta, con 18 de 20 pacientes (90.0%) mostrando ambas respuestas.

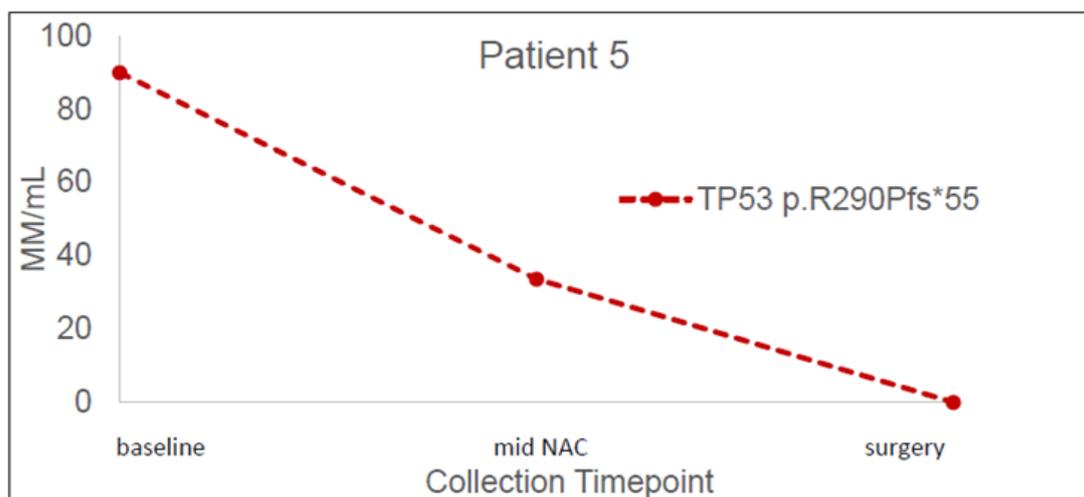
En cuanto a la detección de ctDNA en plasma, se encontró que, a mitad del tratamiento, 15 de las 20 muestras de plasma (75,0 %) no tenían ctDNA detectable. De estas 15 muestras, 12 correspondían a pacientes con cCR, mientras que 3 correspondían a pacientes sin cCR. Justo antes de la cirugía, 17 pacientes (85,0 %) no tenían ctDNA detectable en el plasma; de estas, 15 eran pacientes con cCR y 2 eran pacientes sin cCR. El análisis de los niveles de ctDNA mostró que las pacientes que respondieron bien a la NAC presentaron descensos significativos en los niveles de ctDNA a mitad del tratamiento. Ejemplos representativos de estos descensos se muestran en la **gráfica 1**, donde se ilustran los cambios en los niveles de ctDNA en pacientes con una buena respuesta a la NAC.

Estos resultados indican una fuerte correlación entre la reducción del ctDNA en el plasma y la respuesta clínica y patológica a la NAC, sugiriendo que la monitorización del ctDNA podría ser una herramienta útil para evaluar la eficacia del tratamiento en tiempo real.

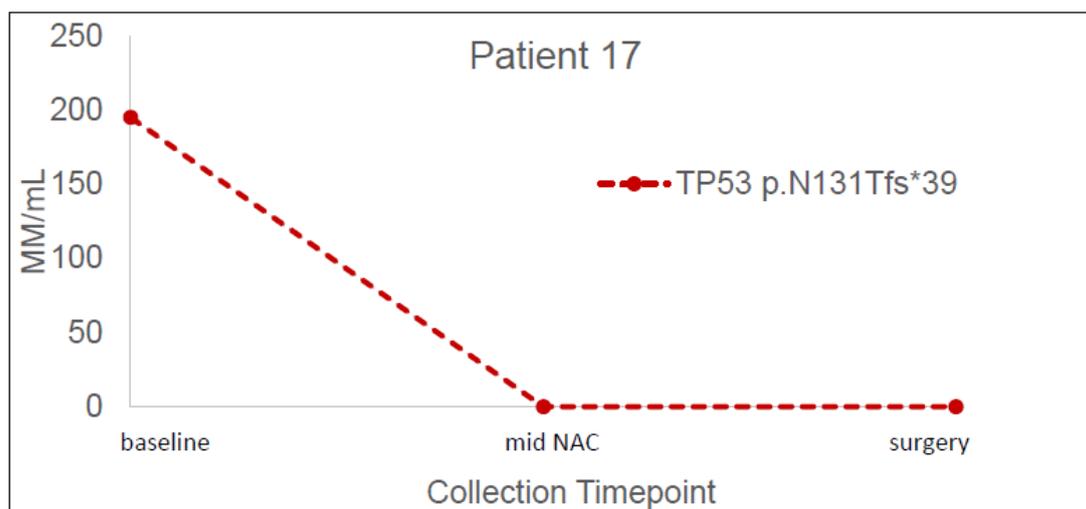
RESULTADOS

ID Paciente	cCR	Plasma a mitad de la NAC	Plasma antes de la cirugía	pCR
1	Sí	NMD	NMD	Sí
4	Sí	NMD	NMD	Sí
5	Sí	<i>TP53</i> p.R290Pfs*55 (201,9 MM; 33,6 MM/mL)	NMD	Sí
6	Sí	NMD	NMD	Sí
7	No	NMD	<i>TP53</i> p.R110P (1 MM; 0.2 MM/mL)	Sí
9	Sí	NMD	NMD	Sí
10	No	NMD	NMD	No
11	Sí	<i>TP53</i> p.R175H (43,7 MM; 7,3 MM/mL)	NMD	Sí
12	Sí	NMD	NMD	Sí
14	Sí	NMD	NMD	Sí
17	Sí	NMD	NMD	Sí
19	No	NMD	NMD	No
26	No	<i>TP53</i> p.D281V (17,7 MM; 3,0 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (19,3 MM; 3,2 MM/mL)	<i>TP53</i> p.D281V (1,2 MM; 0,2 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (0,6 MM; 0,1 MM/mL)	No
28	Sí	NMD	NMD	Sí
29	Sí	<i>TP53</i> p.K139_V143del (0,6 MM; 0,1 MM/mL)	NMD	Sí
30	Sí	NMD	NMD	Sí
31	No	<i>TP53</i> p.S127F (2,0 MM; 0,3 MM/mL)	<i>TP53</i> p.S127F (5,5 MM; 1,0 MM/mL)	No
32	Sí	NMD	NMD	No
33	Sí	NMD	NMD	Sí
34	Sí	NMD	NMD	Sí

Tabla 4. Respuesta a la NAC y resultados del análisis de ctDNA realizado a mitad del tratamiento y después del mismo.



Gráfica 1A



Gráfica 1B

Gráfica 1. Gráficas representativas del seguimiento longitudinal del ctDNA. Dos pacientes (pacientes 5 [1A] y 17 [1B]) mostraron una eliminación completa de las mutaciones *TP53* en el plasma antes de la cirugía, lo cual se asoció con una cCR a la NAC.

5.1.3. Precisión del estado prequirúrgico del ctDNA + cCR para la determinación de pCR

La **Tabla 5** resume la eficacia de la combinación de la eliminación de ctDNA y la obtención de una cCR en la predicción de una pCR después de la NAC. El análisis reveló que esta combinación identificó correctamente la pCR en 14 de 15 pacientes (93,3%), demostrando una alta sensibilidad.

Sin embargo, hubo un caso de falso positivo (paciente 7), donde la combinación de eliminación de ctDNA y cCR predijo pCR, pero la evaluación histopatológica no lo confirmó. También se registró un caso falso negativo (paciente 32), en el que la combinación no predijo pCR a pesar de que esta se alcanzó. Adicionalmente, se identificaron tres casos verdaderos negativos (pacientes 10, 26 y 31), en los que la ausencia de pCR se predijo correctamente.

Medida	
Precisión	89.5%
Tasa de falsos positivos	3.8%
VPP	93.3%
VPN	75.0%

Tabla 5. Eficacia de la combinación de la eliminación de ctDNA y el alcance de una cCR en la predicción de pCR después de la NAC.

Esto se traduce en una precisión del 89,5 %; una tasa de falsos positivos del 3,8 %, y un VPN del 75,0 %. Estos datos sugieren que la eliminación del ctDNA en combinación con una cCR, es una herramienta prometedora para predecir la pCR en pacientes sometidas a NAC, aunque se requiere validación en cohortes más amplias.

5.1.4. Estado del ctDNA posquirúrgico y recurrencia

Para evaluar la presencia de ctDNA durante el periodo de vigilancia después de la cirugía, en las 15 pacientes que lograron una cCR, se realizaron extracciones de sangre en tres momentos distintos, después de la cirugía: a las 4 semanas, a los 6 meses y a los 12 meses. Se utilizaron los mismos ensayos SafeSEQ específicos para cada paciente, basados en las mutaciones identificadas en el tejido tumoral, que se emplearon durante la NAC. En las 40 muestras de sangre recolectadas de estas 15 pacientes durante el seguimiento de 12 meses, ninguna mostró ctDNA detectable en ningún momento (ver **tabla 6**). Además, tras 24 meses de seguimiento, en 13 de las 15 pacientes (dos no estaban disponibles para la extracción de sangre) que lograron la cCR, no se detectó ctDNA, y ninguna de estas pacientes presentó recurrencia de la enfermedad.

De las 20 pacientes originales, solo dos experimentaron enfermedad recurrente después de un seguimiento clínico más prolongado. La paciente 7, que no logró la cCR y tuvo un resultado positivo de ctDNA después de la NAC, presentó recurrencia a los 22 meses. La paciente 10, que no logró ni la cCR ni la pCR y en la que no se detectaron mutaciones después de la NAC, presentó recurrencia a los 27 meses. Desafortunadamente, estas dos pacientes no estuvieron disponibles para la recolección de sangre durante el seguimiento postquirúrgico de 12 meses. Sin embargo, se obtuvieron muestras de sangre de ambas después de la recurrencia, y el

RESULTADOS

análisis del ctDNA reveló las mismas mutaciones que se habían detectado durante la NAC. Ambas pacientes mostraron un aumento significativo en los niveles de ctDNA. La paciente 7 presentó la mutación *TP53* p.R110P a 397,7 MM/ml, mientras que la paciente 10 mostró las mutaciones *TP53* p.V173L (8,4 MM y 1,5 MM/ml) y *PIK3CA* p.H1047R (6,9 MM y 1,2 MM/ml).

ID Paciente	10 semanas después de la cirugía	6 meses después de la cirugía	12 meses después de la cirugía
1	NMD	NMD	NMD
4	NMD	NMD	NMD
5	NMD	NMD	NMD
6	NMD	NMD	NMD
9	NMD	NMD	NMD
11	NMD	NMD	NMD
12	NMD	NMD	NMD
14	NMD	ND	NMD
17	NMD	ND	ND
28	NMD	NMD	NMD
29	NMD	NMD	NMD
30	NMD	NMD	NMD
32	NMD	NMD	NMD
33	NMD	NMD	ND
34	NMD	NMD	ND

ND: No disponible

- Todas las pacientes, excepto una (la paciente 32), también lograron pCR.

Tabla 6. Resultados del seguimiento mediante biopsia líquida de las 15 pacientes con cáncer de mama que lograron cCR después de la NAC.

Es lamentable que estas pacientes no estuvieran disponibles para la monitorización del ctDNA durante el periodo inmediatamente posterior a la cirugía, ya que la detección temprana de estas mutaciones podría haber proporcionado una señal temprana de enfermedad recurrente. Estos hallazgos subrayan la importancia de la monitorización continua del ctDNA como una herramienta potencial para la detección precoz de recurrencia en estas pacientes.

5.2. SEGUNDO ESTUDIO: VALOR PRONÓSTICO DE ONCOTYPE DX BREAST RECURRENCE SCORE® DESPUÉS DE LA NAC

5.2.1. Características de las pacientes y del tumor

Se recogieron muestras tumorales pre- y post-NAC de un total de 224 pacientes con cáncer de mama. La diferencia con respecto al número previsto inicialmente de 280 pacientes se atribuyó a la limitada disponibilidad de biopsias, resultando en 173 muestras pre-NAC y 224 muestras post-NAC, disponibles para el análisis.

Las características basales de las pacientes y de los tumores, tanto en el momento del diagnóstico como después de recibir la NAC, se presentan en la **Tabla 7**. Estos datos están estratificados por la presencia o ausencia de metástasis a distancia. La cohorte estuvo compuesta mayoritariamente por mujeres (99.1%), con solo dos hombres (0.9%). La mediana de edad fue de 50,3 años, con un rango intercuartílico (IQR) de 44,6 a 62,0 años.

La mayoría de las muestras se clasificaron histológicamente como CITNE (82,6%). En términos de estadificación clínica, el 42,4 % de los tumores eran cT2 y el 39,7 % eran cN1.

La clase II del RCB fue la más común en la población general (51%) y en pacientes sin metástasis a distancia (56,1%). En contraste, la clase III fue la más común en pacientes con metástasis a distancia (38,3%). Las puntuaciones del RCB post-NAC mostraron valores similares entre los grupos de RS alto y bajo. La mediana (IQR) de la puntuación RCB fue de 3,3 (2,3-4,1) en el grupo de RS alto y de 3,0 (2,0-3,4) en el grupo de RS bajo.

5.2.2. Resultados del análisis de Oncotype DX Breast Recurrence Score® en muestras pre- y post-NAC

Se obtuvieron resultados del Oncotype DX Breast Recurrence Score® de 173 muestras pre-NAC y 224 muestras post-NAC, desglosados en 46 pacientes con metástasis a distancia y 127 sin metástasis a distancia en muestras pre-NAC, y 60 pacientes con metástasis a distancia y 164 sin metástasis a distancia en muestras post-NAC.

RESULTADOS

Características	Total (N=224)	Pacientes con metástasis a distancia (N=60)	Pacientes sin metástasis a distancia (N=164)
Edad, años, mediana (IQR) (N)	50.3 (44.6 - 62.0) (223)	50.2 (44.3 - 61.8) (60)	50.4 (44.7 - 62.0) (163)
Género, N (%)			
Femenino	222 (99.1)	60 (100.0)	162 (98.8)
Masculino	2 (0.9)		2 (1.2)
Estatus de menopausia, N (%)			
Desconocido	78 (34.8)	7 (11.7)	71 (43.3)
NA	6 (2.7)	2 (3.3)	4 (2.4)
No	64 (28.6)	24 (40.0)	40 (24.4)
Sí	76 (33.9)	27 (45.0)	49 (29.9)
En el momento del diagnóstico:			
Histología, N (%)			
Lobulillar	26 (11.6)	4 (6.7)	22 (13.4)
De tipo no especial	185 (82.6)	52 (86.7)	133 (81.1)
Otros	13 (5.8)	4 (6.7)	9 (5.5)
cT, N (%)			
No disponible	22 (9.8)	10 (16.7)	12 (7.3)
cT1	13 (5.8)	4 (6.7)	9 (5.5)
cT2	95 (42.4)	15 (25.0)	80 (48.8)
cT2 y cT1	1 (0.4)		1 (0.6)
cT2 y cT3	1 (0.4)	1 (1.7)	
cT3	63 (28.1)	17 (28.3)	46 (28.0)
cT4	29 (12.9)	13 (21.7)	16 (9.8)
cN, N (%)			
No disponible	32 (14.3)	13 (21.7)	19 (11.6)
cN0	69 (30.8)	11 (18.3)	58 (35.4)
cN1	89 (39.7)	21 (35.0)	68 (41.5)
cN2	23 (10.3)	9 (15.0)	14 (8.5)
cN3	11 (4.9)	6 (10.0)	5 (3.0)
Post-NAC			
Tamaño tumoral, mm, mediana (IQR) (N)	19 (12 - 27.5) (216)	25 (16 - 45) (55)	18 (12 - 25) (161)
Focalidad, N (%)			
Multifocal	37 (16.5)	14 (23.3)	23 (14.0)
Unifocal	187 (83.5)	46 (76.7)	141 (86.0)
Histología, N (%)			
Lobulillar	26 (11.6)	3 (5.0)	23 (14.0)
De tipo no especial	185 (82.6)	54 (90.0)	131 (79.9)
Otros	13 (5.8)	3 (5.0)	10 (6.1)
Ganglios resecaados, N (%)			
No	3 (1.3)	1 (1.7)	2 (1.2)
Sí	220 (98.2)	58 (96.7)	162 (98.8)
Desconocido	1 (0.4)	1 (1.7)	-
pT, N (%)			
No disponible	2 (0.9)	1 (1.7)	1 (0.6)
ypT1	129 (57.6)	24 (40.0)	105 (64.0)
ypT2	74 (33.0)	26 (43.3%)	48 (29.3)
ypT2 e ypT1	1 (0.4)	1 (1.7)	-
ypT3	16 (7.1)	6 (10.0)	10 (6.1)
ypT4	2 (0.9)	2 (3.3)	-
pN, N (%)			
No disponible	2 (0.9)	1 (1.7)	1 (0.6)
ypN0	63 (28.1)	8 (13.3)	55 (33.5)
ypN1	78 (34.8)	17 (28.3)	61 (37.2)
ypN1mi	15 (6.7)	3 (5.0)	12 (7.3)
ypN2	44 (19.6)	16 (26.7)	28 (17.1)
ypN2 e ypN1	1 (0.4)	1 (1.7)	-
ypN3	21 (9.4)	14 (23.3)	7 (4.3)
Invasión linfovascular, N (%)			
No disponible	5 (2.2)	1 (1.7)	4 (2.4)

RESULTADOS

No	141 (62.9)	27 (45.0)	114 (69.5)
Sí	78 (34.8)	32 (53.3)	46 (28.0)
RCB score, mediana (IQR) (N)	3.105 (2.128 - 3.531) (184)	3.469 (2.823 - 3.824) (45)	2.91 (2.006 - 3.379) (139)
RCB Clase, N (%)			
I	6 (2.7)	1 (1.7)	5 (3.0)
II	114 (50.9)	22 (36.7)	92 (56.1)
II y I	1 (0.4)	1 (1.7)	-
III	67 (29.9)	23 (38.3)	44 (26.8)
No disponible	36 (16.1)	13 (21.7)	23 (14.0)

Mi: micrometástasis; N: número de pacientes

Tabla 7. Características basales en el momento del diagnóstico y post-NAC, en el total de pacientes y en pacientes con y sin metástasis a distancia.

5.2.2.1. Resultados pre-NAC

El RS medio (desviación estándar, DE) en las muestras pre-NAC fue de 26,5 (14,5). Los pacientes con metástasis a distancia presentaron un RS medio (DE) significativamente más alto (31 [15,5]) en comparación con aquellos no metastásicos (24,9 [13,8]). Se observó un RS alto pre-NAC (>25) en el 33,5 % de los pacientes (75/224), siendo esta proporción mayor en pacientes con metástasis (48,3 %) que en pacientes que no la presentaban (28,0 %).

5.2.2.2. Resultados post-NAC

Después del tratamiento con NAC, se observó una reducción tanto en el RS medio como en la proporción de pacientes con RS alto (>25). La puntuación media (DE) post-NAC fue de 21,1 (12,1) para toda la población. Los pacientes con metástasis a distancia continuaron mostrando una puntuación media (DE) más alta (23,9 [13,7]) que los pacientes que no la desarrollaron (20,1 [11,3]). La puntuación RS alta (>25) post-NAC se observó en 53 pacientes (23,7 %), con una mayor prevalencia en pacientes con metástasis a distancia (35,0 %) en comparación con los no metastásicos (19,5 %).

Además, hubo un incremento en la proporción de pacientes con RS bajo post-NAC (≤ 25) en comparación con el resultado pre-NAC, tanto en la población general (76,3 %

vs 43,8 %), como en pacientes metastásicos (65,0 % vs 28,3 %) y sin metástasis (80,5 % vs 49,4 %).

5.2.2.3. Análisis de muestras emparejadas pre- y post-NAC

En el análisis de las 173 muestras emparejadas pre y post-NAC, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en el RS medio (DE) tras la NAC (21.9 [11.9]) en comparación con el pre-NAC (26.5 [14.5]) (ver **tabla 8**). Esta reducción fue de -4.6 (11.9) puntos. Aunque los pacientes con metástasis a distancia seguían mostrando un RS medio (DE) más alto post-NAC (25.5 [13.3]) que los pacientes sin DM (20.7 [11.2]), la diferencia entre ambos grupos se redujo en comparación con las muestras pre-NAC. La reducción en el RS post-NAC fue estadísticamente significativa tanto en pacientes metastásicos (-5.5 [14.4] puntos) como en pacientes no metastásicos (-4.2 [10.9] puntos).

Variable / Estadística	Pre-NAC	Post-NAC	Diferencia	Valor-p ^a
Total (N =173)				<0,0001
Media (DE)	26,5 (14,5)	21,9 (11,9)	-4,6 (11,9)	
Pacientes con metástasis a distancia (N = 46)				0,0130
N	46	46		46
Media (DE)	31,0 (15,5)	25,5 (13,3)	-5,5 (14,4)	
Mediana	30	24	-5	
Min - Max	3 - 62	5 - 59	-34 - 39	
IQR	21 - 42	16 - 33	-14 - 4	
Pacientes sin metástasis a distancia (N = 127)				<0,0001
N	127	127		127
Media (DE)	24,9 (13,8)	20,7 (11,2)	-4,2 (10,9)	
Mediana	21	19	-3	
Min - Max	0 - 71	0 - 76	-49 - 26	
IQR	16 - 32	14 - 25	-9 - 3	

^a El valor-p se calculó utilizando la prueba t para muestras pareadas.

Table 8. Test Oncotype DX Breast Recurrence Score® antes y después de la NAC basado en la presencia de metástasis a distancia.

5.2.2.4. Cambios en el RS Pre y Post-NAC

Se evaluó el cambio en RS (bajo ≤ 25 vs. alto > 25) pre y post-NAC en la población general y en subgrupos específicos. En la población general, la mayoría de los pacientes con un RS bajo pre-NAC (≤ 25) permanecieron en el mismo grupo de riesgo

post-NAC (88,8 %). En contraste, aproximadamente la mitad de los pacientes con un RS alto pre-NAC (>25) mostraron una conversión a un RS bajo post-NAC (53,3 %) (ver **tabla 9**).

En los pacientes con un RS alto pre-NAC que desarrollaron metástasis a distancia, se observó un menor porcentaje de cambio de categoría (41,4 %) en comparación con la población general del estudio. Por el contrario, los pacientes con un RS alto pre-NAC que no desarrollaron metástasis a distancia mostraron un mayor porcentaje de conversión a RS bajo post-NAC (60,9 %).

Cuando se analizó la población según grupos de edad (≤ 50 años y > 50 años), la mayoría de los pacientes con un RS bajo pre-NAC (≤ 25) permanecieron en el mismo grupo de riesgo post-NAC en ambos grupos de edad (88,5 % y 88,9 %, respectivamente). Sin embargo, la conversión a RS bajo post-NAC fue más frecuente en pacientes ≤ 50 años con RS alto pre-NAC (57,6 %) que en aquellos > 50 años (50,0 %), con un porcentaje de diferencia de 7,6 %.

En los pacientes con un RS alto pre-NAC sin metástasis a distancia, se observó un mayor porcentaje de conversión a RS bajo (≤ 25) en pacientes ≤ 50 años en comparación con aquellos > 50 años (68,4 % y 55,6 %, respectivamente). No obstante, en pacientes con metástasis a distancia y RS alto pre-NAC, no se observaron diferencias significativas en la tasa de conversión entre los grupos de edad (42,9 % en ≤ 50 años y 40,0 % en > 50 años) (ver **tabla 9**).

El análisis del impacto de NAC en las características de los biomarcadores tumorales pre- y post-NAC mostró una reducción en la expresión de RE+, RP+, HER2- y el marcador de proliferación Ki67, tanto en la población general como en los subgrupos con y sin metástasis a distancia. Sin embargo, se observó un incremento en el grado del tumor post-NAC (ver **tabla 10**).

RESULTADOS

Variable / Estadístico o valor	RS bajo post-NAC (≤ 25)	RS alto post-NAC (> 25)
Total (N=224)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	40 (53.3%)	35 (46.7%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	87 (88.8%)	11 (11.2%)
Pre-NAC: RS no disponible	44 (86.3%)	7 (13.7%)
Pacientes con metástasis a distancia (N=60)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	12 (41.4%)	17 (58.6%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	15 (88.2%)	2 (11.8%)
Pre-NAC: RS no disponible	12 (85.7%)	2 (14.3%)
Pacientes sin metástasis a distancia (N=164)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	28 (60.9%)	18 (39.1%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	72 (88.9%)	9 (11.1%)
Pre-NAC: RS no disponible	32 (86.5%)	5 (13.5%)
Edad de los pacientes: ≤ 50 años		
Total (N=109)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	19 (57.6%)	14 (42.4%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	46 (88.5%)	6 (11.5%)
Pre-NAC: RS no disponible	23 (95.8%)	1 (4.2%)
Pacientes con metástasis a distancia (N=28)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	6 (42.9%)	8 (57.1%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	6 (85.7%)	1 (14.3%)
Pre-NAC: RS no disponible	7 (100.0%)	0 (0.0%)
Pacientes sin metástasis a distancia (N=81)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	13 (68.4%)	6 (31.6%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	40 (88.9%)	5 (11.1%)
Pre-NAC: RS no disponible	16 (94.1%)	1 (5.9%)
Edad de los pacientes: > 50 años		
Total (N=114)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	21 (50.0%)	21 (50.0%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	40 (88.9%)	5 (11.1%)
Pre-NAC: RS no disponible	21 (77.8%)	6 (22.2%)
Pacientes con metástasis a distancia (N=32)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	6 (40.0%)	9 (60.0%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	9 (90.0%)	1 (10.0%)
Pre-NAC: RS no disponible	5 (71.4%)	2 (28.6%)
Pacientes sin metástasis a distancia (N=82)		
Pre-NAC: RS alto (> 25)	15 (55.6%)	12 (44.4%)
Pre-NAC: RS bajo (≤ 25)	31 (88.6%)	4 (11.4%)
Pre-NAC: RS no disponible	16 (80.0%)	4 (20.0%)

Tabla 9. Cambios en el test Oncotype DX® Breast Recurrence Score® pre- y post-NAC.

RESULTADOS

Características	Total (n=224)		Pacientes con metástasis a distancia (n=60)		Pacientes sin metástasis a distancia (n=164)	
	Pre-NAC	Post-NAC	Pre-NAC	Post-NAC	Pre-NAC	Post-NAC
Grado, N (%)						
1	17 (7.6)	19 (8.5)	5 (8.3)	2 (3.3)	12 (7.3)	17 (10.4)
2	100 (44.6)	161 (71.9)	19 (31.7)	41 (68.3)	81 (49.4)	120 (73.2)
3	21 (9.4)	35 (15.6)	5 (8.3)	13 (21.7)	16 (9.8)	22 (13.4)
Desconocido	86 (38.4)	9 (4.0)	31 (51.7)	4 (6.7)	55 (33.5)	5 (3.0)
RE, N (%)						
Negativo	1 (0.4)	2 (0.9)		1 (1.7)	1 (0.6)	1 (0.6)
Positivo	220 (98.2)	113 (50.4)	58 (96.7)	22 (36.7)	162 (98.8)	91 (55.5)
Desconocido	3 (1.3)	109 (48.7)	2 (3.3)	37 (61.7)	1 (0.6)	72 (43.9)
RP, N (%)						
No disponible	3 (1.3)	109 (48.7)	2 (3.3)	37 (61.7)	1 (0.6)	72 (43.9)
Negativo	28 (12.5)	38 (17.0)	7 (11.7)	6 (10.0)	21 (12.8)	32 (19.5)
Positivo	193 (86.2)	77 (34.4)	51 (85.0)	17 (28.3)	142 (86.6)	60 (36.6)
HER2, N (%)						
No disponible	4 (1.8)	110 (49.1)	2 (3.3)	38 (63.3)	2 (1.2)	72 (43.9)
Negativo	220 (98.2)	114 (50.9)	58 (96.7)	22 (36.7)	162 (98.8)	92 (56.1)
Ki67, % mediana (IQR) (N)						
	24 (15 - 35) (214)	5 (2 - 15) (106)	25 (15 - 35) (55)	15 (5-25) (21)	23 (15-40) (159)	5 (1-15) (85)
RS, N (%)						
Alto (>25)	75 (33.5%)	53 (23.7%)	29 (48.3%)	21 (35.0%)	46 (28.0%)	32 (19.5%)
Bajo (≤25)	98 (43.8%)	171 (76.3%)	17 (28.3%)	39 (65.0%)	81 (49.4%)	132 (80.5%)
No disponible	51 (22.8%)		14 (23.3%)		37 (22.6%)	

Nota: Se incluyeron dos pacientes que tenían un estado HER2 "Negativo" según la evaluación IHQ, pero que resultaron ser HER2 "Positivo" en el test Oncotype DX. Se incluyeron cuatro pacientes que tenían un estado HER2 "Desconocido" por IHQ, que resultaron ser HER2 "Negativo" en el test Oncotype DX. Se excluyó a un paciente en el que no se conocía el estado HER2 ni por IHQ ni por el test Oncotype DX. Al inicio se incluyeron dos pacientes que tenían RE negativos.

Tabla 10. Características del tumor pre- y post-NAC, globales y según la presencia o no de metástasis a distancia.

Para identificar las variables predictoras de metástasis a distancia y SG, se realizaron análisis de modelos de riesgos proporcionales de Cox univariados y multivariados.

En el análisis univariable, las variables predictoras que se correlacionaron con la SG fueron el tamaño del tumor ($p=0.0345$), el cT al diagnóstico ($p=0.0259$), y el RS post-NAC (primeros 5 años >25 vs. ≤ 25), mostrando una asociación significativa ($p<0.0001$). El tamaño del tumor ($p=0.0094$), el cT al diagnóstico ($p=0.0227$), el RS post-NAC (primeros 5 años >25 vs. ≤ 25) ($p=0.0068$) y el cN al diagnóstico se asociaron significativamente con la presencia de metástasis a distancia ($p=0.0045$) (ver **tabla 11**).

Mediante el análisis multivariable, el RS post-NAC se asoció fuertemente (controlando por edad, tamaño del tumor y estado nodal) con el riesgo de metástasis a distancia [HR=2.41 (1.18, 4.76), $p=0.0162$] y SG durante los primeros 5 años [HR=4.96 (1.98, 12.95), $p=0.0007$] (ver **tabla 12**).

RESULTADOS

Parámetro	Categoría	Evento	Hazard Ratio	IC 95%	Valor-p ^a	
Edad al diagnóstico	>50 vs ≤50	DM	1,09	(0.61, 1.95)	0,7796	
		SG	1,17	(0.62, 2.18)	0,6256	
Tamaño tumoral	>2cm - ≤5cm vs ≤2cm	DM	2,05	(1.09, 3.87)	0,0094	
		SG	2,34	(1.22, 4.55)	0,0345	
	>5cm vs ≤2cm	DM	3,56	(1.39, 8.12)		
		SG	1,87	(0.44, 5.63)		
cN al diagnóstico	GLN vs cN0	DM	3,76	(1.47, 9.63)	0,0045	
		SG	2,79	(1.09, 7.16)	0,0927	
	cN1 vs cN0	DM	1,47	(0.66, 3.51)		
		SG	1,35	(0.58, 3.28)		
	cN2 vs cN0	DM	3,50	(1.31, 9.18)		
		SG	2,29	(0.70, 6.64)		
	cN3 vs cN0	DM	5,16	(1.58, 15.02)		
		SG	3,87	(1.04, 12.03)		
	cT al diagnóstico	GLN, cT2 and cT1 vs cT4	DM	1,25	(0.48, 3.17)	0,0227
			SG	0,97	(0.37, 2.45)	0,0259
cT1 vs cT4		DM	0,30	(0.02, 1.58)		
		SG	0,40	(0.02, 2.12)		
cT2 vs cT4		DM	0,33	(0.15, 0.78)		
		SG	0,30	(0.13, 0.72)		
cT3 vs cT4		DM	0,55	(0.24, 1.27)		
		SG	0,36	(0.15, 0.88)		
RS Post-NAC		Primeros 5 años (>25 vs ≤25)	DM	2,67	(1.33, 5.20)	0,0068
			SG	12,86	(6.30, 25.36)	<0,0001
	Después de 5 años (>25 vs ≤25)	DM	1,25	(0.19, 4.87)	0,7790	
		SG	0,24	(0.01, 1.13)	0,0762	

^a Usando la prueba de razón de verosimilitud.

^b Las pacientes incluidas en este análisis eran mujeres en las que no faltaban las variables de tamaño tumoral, estatus nodal y edad.

GLN: Ganglios linfáticos negativos

Tabla 11. Modelo de riesgos proporcionales de Cox para metástasis a distancia y SG, pacientes censurados a los 10 años (univariable)^b.

Los dos grupos de pacientes (RS ≤25 y RS >25) mostraron diferencias significativas en términos de supervivencia libre de metástasis a distancia (log rank p=0.0024) (ver **gráfica 2A**) y SG (log rank p=0.0007) (ver **gráfica 2B**). Los pacientes con un RS ≤25 mostraron una reducción absoluta del 19.6% y 16.8% en su riesgo de recurrencia a distancia a los 5 y 10 años, respectivamente. En términos de SG, la diferencia entre los grupos fue del 19.9% y 17.0% en los mismos periodos.

Estos análisis también se realizaron excluyendo a los pacientes masculinos. Los resultados fueron similares para la supervivencia libre de metástasis a distancia (diferencia entre ambos grupos del 19.4% y 16.6% a los 5 y 10 años, respectivamente) y SG (diferencia entre ambos grupos del 19.8% y 16.8% a los 5 y 10 años, respectivamente).

RESULTADOS

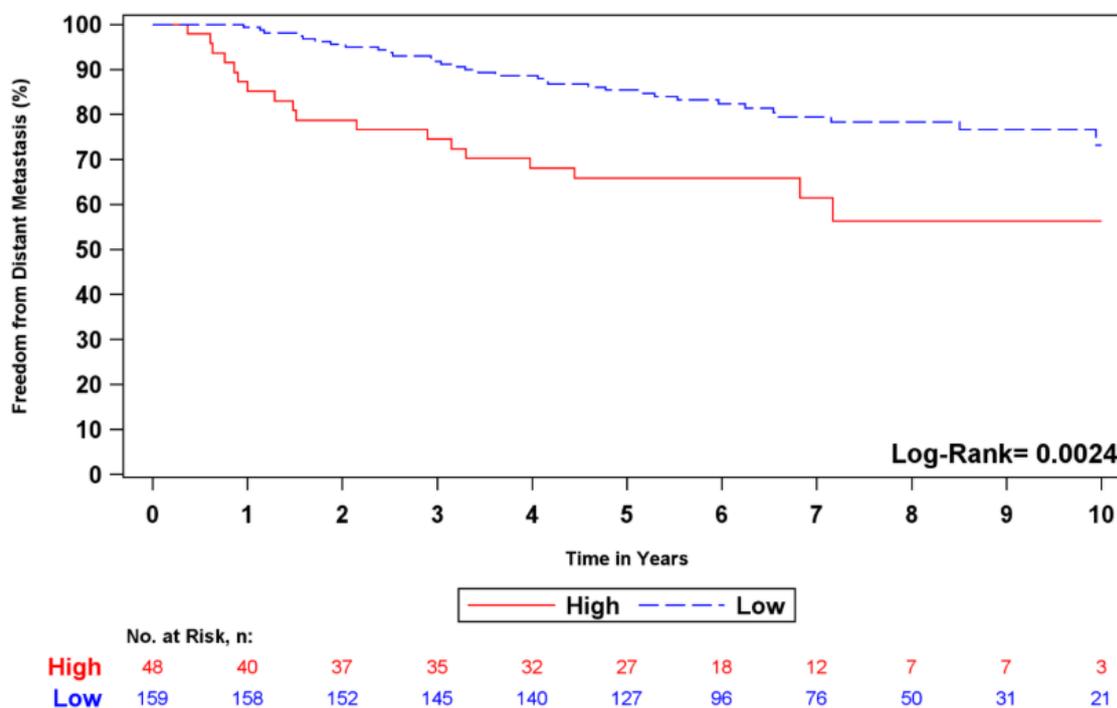
Parámetro	Categoría	Evento	Hazard Ratio	IC 95%	Valor-p ^a
Edad al diagnóstico	>50 vs ≤50	DM	0,96	(0,52, 1,75)	0,8826
		SG	1,11	(0,57, 2,16)	0,7533
Tamaño tumoral	>2cm - ≤5cm vs ≤2cm	DM	1,60	(0,82, 3,15)	0,1159
		SG	1,91	(0,94, 3,90)	0,1978
	>5cm vs ≤2cm	DM	2,56	(0,97, 6,08)	
		SG	1,32	(0,30, 4,12)	
cN al diagnóstico	GLN vs cN0	DM	2,83	(1,07, 7,51)	0,0166
		SG	1,99	(0,74, 5,32)	0,1811
	cN1 vs cN0	DM	1,30	(0,57, 3,12)	
		SG	1,29	(0,55, 3,15)	
	cN2 vs cN0	DM	2,91	(1,06, 7,82)	
		SG	1,97	(0,60, 5,84)	
	cN3 vs cN0	DM	5,18	(1,56, 15,35)	
		SG	4,58	(1,20, 14,80)	
RS Post-NAC	Primeros 5 años (>25 vs ≤25)	DM	2,41	(1,18, 4,76)	0,0162
		SG	4,96	(1,98, 12,95)	0,0007
	Después de 5 años (>25 vs ≤25)	DM	0,84	(0,13, 3,35)	0,8196
		SG	0,90	(0,25, 2,52)	0,8538

^a Usando la prueba de razón de verosimilitud.

^b Las pacientes incluidas en este análisis eran mujeres en las que no faltaban las variables de tamaño tumoral, estatus nodal y edad.

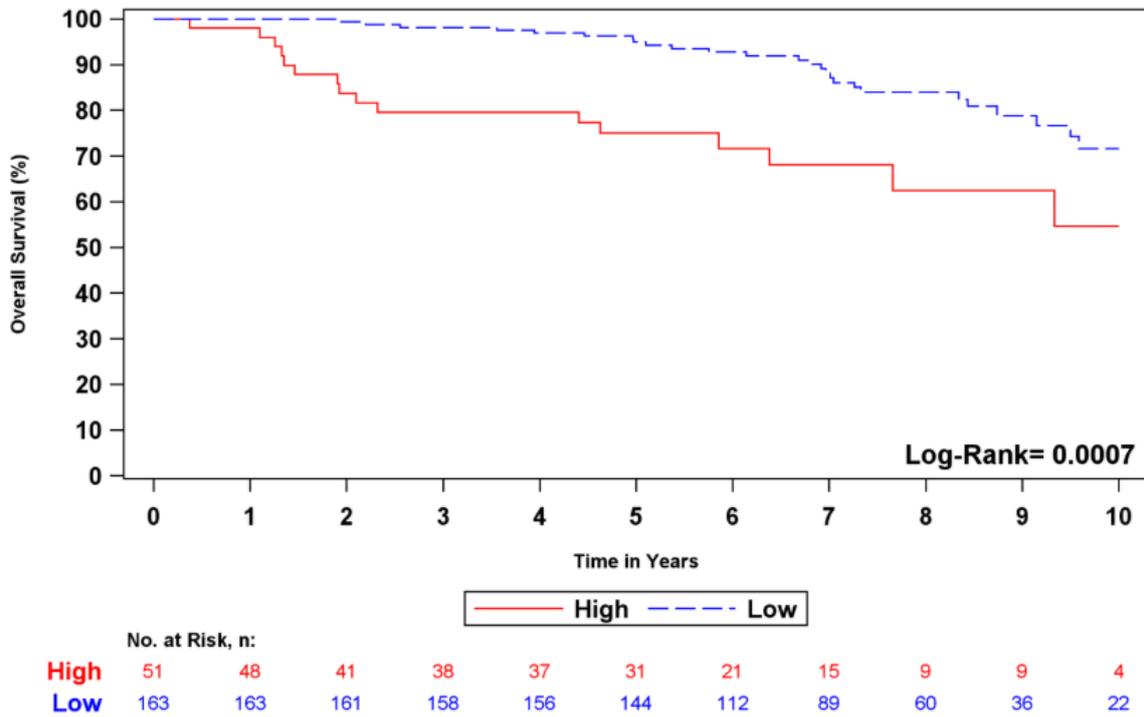
GLN: Ganglios linfáticos negativos

Tabla 12. Modelo de riesgos proporcionales de Cox para metástasis a distancia y SG, pacientes censurados a los 10 años (multivariable)^b.



Gráfica 2A

RESULTADOS



Gráfica 2B

Gráfica 2. Resultados de supervivencia a 10 años basados en los resultados del Oncotype DX Breast Recurrence Score®. 2A) Supervivencia libre de metástasis a distancia y 2B) Supervivencia global a los 10 años en pacientes con RS > 25 (rojo) vs RS ≤ 25 (azul).

6.DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El uso de NAC en el tratamiento del cáncer de mama se ha convertido en una parte fundamental del mismo, debido a las numerosas ventajas que conlleva, especialmente la posibilidad de alcanzar una pCR. El porcentaje de pacientes que presentan una pCR varía en función del subtipo molecular, observándose tasas más altas en los tumores HER2+ y triple negativo^{32,34-37}, que en los tumores luminales⁸⁹.

Actualmente, la cirugía sigue siendo el tratamiento de referencia para el cáncer de mama primario después de la NAC. Esta intervención tiene como objetivo la extirpación completa de la enfermedad residual en pacientes que no alcanzan una pCR o la confirmación diagnóstica de una pCR en aquellos casos donde se sospecha su presencia. No obstante, si fuera posible diagnosticar una pCR con la suficiente certeza a través de métodos no invasivos, como pruebas de imagen avanzadas o biomarcadores específicos, la realización de una cirugía podría resultar innecesaria, debido a los riesgos inherentes que conlleva y el impacto significativo en la calidad de vida de la paciente, tanto física como emocionalmente^{90,91}.

La mamografía y el estudio ecográfico son las técnicas más empleadas para estimar el tamaño tumoral en el momento del diagnóstico. Sin embargo, su capacidad para medir tanto el tumor residual como los cambios secundarios al tratamiento quimioterápico previo es variable⁹²⁻⁹⁴. La precisión de la RMN también varía en el contexto de la NAC, siendo mayor en los tumores con HER2+ y triple negativos y menor en los luminales^{33,95,96}. En cuanto al estudio con Tomografía por emisión de Positrones (PET), su sensibilidad gira en torno al 84% (rango: 78-88%) y su especificidad en torno al 66% (rango 62-70%), siendo también más preciso para tumores triple negativos y HER2+ y presentando problemas a la hora de detectar enfermedad residual mínima en la mama o afectación micrometastásica de los ganglios⁹⁷. De igual manera, un metanálisis que evaluó el rendimiento diagnóstico de las biopsias mínimamente invasivas guiadas por imágenes, concluyó que no son lo suficientemente precisas para predecir una pCR en cáncer de mama después de la NAC⁹⁸.

La biopsia líquida es una poderosa tecnología no invasiva que ofrece información importante para evaluar el pronóstico, la resistencia a los medicamentos y el tratamiento individualizado⁶⁵. Estudios prospectivos han demostrado que los niveles de

DISCUSIÓN

ctDNA y mutaciones específicas como *PIK3CA* y *TP53*, detectados durante la NAC y después de la cirugía, pueden identificar eficazmente a las pacientes con pCR y a las que presentan mínima enfermedad residual^{74-76,79,99}, prediciendo así la respuesta al tratamiento y el pronóstico en el cáncer de mama en estadio inicial¹⁰⁰⁻¹⁰².

En el primer estudio que realizamos, observamos que la eliminación de mutaciones detectables en el ctDNA se correlacionó con una pCR en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo y triple negativo sometidas a NAC. De manera notable, 14 de los 15 pacientes que no presentaron mutaciones detectables en el ctDNA y alcanzaron una cCR, evidenciada tanto por evaluación clínica como radiológica, también lograron una pCR confirmada histológicamente en la pieza quirúrgica (VPP = 93.3%)¹⁰³. Esta observación sugiere que estos pacientes podrían haber evitado de manera segura la cirugía de mama después de la NAC. La alta correlación entre la eliminación de mutaciones en ctDNA y la pCR respalda la hipótesis de que el ctDNA podría ser un biomarcador útil para identificar a aquellos pacientes que responden de manera óptima a la NAC, y para quienes la cirugía podría no ser necesaria.

Además, el paciente que logró cCR, pero no alcanzó una pCR (paciente 32), no presentó ctDNA detectable después de la NAC; no experimentó recurrencia durante el período de seguimiento y no mostró reaparición de la mutación tumoral en el plasma¹⁰³. Estas observaciones son consistentes con la conclusión de que la enfermedad residual en este paciente era mínima y no se había diseminado a otros órganos antes de la cirugía, o bien fue eliminada durante la NAC. El seguimiento prolongado es fundamental en este caso para evaluar la efectividad a largo plazo del tratamiento, incluyendo la monitorización seriada del ctDNA. La eventual reaparición de la mutación específica del paciente en el ctDNA plasmático podría indicar la presencia de enfermedad microscópica oculta antes de su detección mediante técnicas de imagen convencionales¹⁰⁴. Este aspecto subraya la importancia del ctDNA como un biomarcador sensible para la monitorización continua del estado de la enfermedad y la detección temprana de recurrencia.

En el futuro, si los resultados negativos en la biopsia líquida se validan como un indicador fiable de pCR, podrían tener un impacto significativo en la toma de

decisiones clínicas. Los pacientes con resultados negativos en la biopsia líquida podrían evitar la cirugía y someterse a un seguimiento intensivo, que incluiría vigilancia frecuente mediante técnicas de imagen y/o biopsia líquida. En caso de detectar enfermedad residual mínima, se podría considerar la radioterapia y/o el tratamiento adyuvante según las guías clínicas establecidas.

Por otro lado, los pacientes que no alcancen una cCR después de la NAC, deberían someterse a cirugía de mama, independientemente de los resultados de la biopsia líquida. En nuestro estudio, cinco pacientes no lograron cCR y, de ellos, tres presentaron mutaciones detectadas en el ctDNA antes de la cirugía¹⁰³, lo que se asoció con un peor pronóstico^{105,106}. De hecho, dos de estos pacientes experimentaron una recaída. Lamentablemente, estos pacientes no estuvieron disponibles para la monitorización del ctDNA durante el seguimiento a las 4 semanas, 6 meses y 12 meses post-cirugía, y ambos mostraron un aumento significativo en los niveles de ctDNA al momento de la recurrencia, 24 meses después de la cirugía¹⁰³.

Aunque la paciente 10 mostró una eliminación inicial de las mutaciones *TP53* y *PIK3CA* en el ctDNA, estas mutaciones reaparecieron tras la recurrencia a los 24 meses¹⁰³. De manera similar, el paciente 7 presentó una respuesta parcial a la NAC con enfermedad residual mínima, pero la mutación basal en el gen *TP53* reapareció al finalizar el tratamiento¹⁰³. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la persistencia o reaparición de ciertas mutaciones en el ctDNA pueda estar relacionada con mecanismos subyacentes de resistencia tumoral, ya sea a través de la selección de clones resistentes preexistentes o de la adquisición de nuevas mutaciones durante el tratamiento¹⁰⁷.

La detección de ctDNA en plasma, incluso en ausencia de cCR y pCR, en cinco casos de nuestro estudio¹⁰³, subraya la necesidad de establecer rigurosamente un umbral clínicamente relevante de ctDNA que permita identificar con alta sensibilidad la enfermedad residual molecular. Es probable que la determinación de este umbral clínico requiera algoritmos sofisticados que integren tanto las mutaciones específicas del paciente como la carga mutacional tumoral a nivel de muestra, a fin de obtener una evaluación más precisa del riesgo individual de recurrencia o curación en

respuesta al tratamiento. Nuestro estudio proporciona un marco para la evaluación longitudinal del ctDNA en una pequeña cohorte de pacientes con cáncer de mama, utilizando la tecnología SafeSEQ, con el objetivo de comenzar a establecer un punto de corte clínicamente relevante. Sin embargo, es importante reconocer que nuestro estudio tiene limitaciones inherentes a su tamaño muestral reducido. Se requieren estudios con cohortes más amplias para validar nuestros hallazgos. Además, es crucial determinar la frecuencia óptima de las pruebas de ctDNA y el tipo de resultado cualitativo que mejor se correlacione con la enfermedad residual molecular y el riesgo de recurrencia. La integración de la información del ctDNA con otros biomarcadores y datos clínicos podría mejorar aún más la precisión de la predicción de la enfermedad residual molecular y guiar la toma de decisiones terapéuticas personalizadas.

Al utilizar los resultados del ctDNA para guiar el manejo de los pacientes, será fundamental establecer tanto la durabilidad de la respuesta neoadyuvante mediante la evaluación de la persistencia de los resultados negativos en las pruebas de ctDNA, como el aumento del riesgo de recurrencia asociado a valores consecutivos y ascendentes de ctDNA en plasma. En nuestro estudio, el seguimiento seriado después de la cirugía resultó tranquilizador, ya que ninguno de los cinco pacientes mostró incrementos en los niveles de ctDNA durante el seguimiento¹⁰³. Sin embargo, es importante interpretar los resultados en niveles extremadamente bajos de detección de ctDNA con cautela, considerando que la tecnología SafeSEQ que utilizamos es altamente sensible y capaz de detectar incluso cantidades mínimas de ADN tumoral (tres mutantes en 20,000 moléculas de ADN total)⁸⁵.

En nuestro estudio, observamos una concordancia del 95% entre las mutaciones detectadas en el tejido tumoral y en el plasma¹⁰³, un resultado notablemente superior al reportado con otras técnicas de biopsia líquida^{108,109}, incluso en casos con niveles bajos de ctDNA, que suelen ser difíciles de detectar en estadios tempranos de la enfermedad¹¹⁰. Esta alta concordancia respalda la fiabilidad y sensibilidad de la tecnología SafeSEQ utilizada en nuestro estudio para la detección de mutaciones en el ctDNA. Sin embargo, es importante considerar que la presencia de niveles bajos de moléculas mutantes en el ctDNA no siempre indica la presencia de enfermedad

residual clínicamente relevante. En algunos casos, estos niveles bajos podrían ser atribuibles a la hematopoyesis clonal de potencial indeterminado, un fenómeno en el que se detectan mutaciones somáticas en genes como *TP53* en células sanguíneas de individuos sanos. Esta ha sido reportada como un hallazgo frecuente en personas mayores y se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades hematológicas y cáncer^{111,112}.

En nuestro segundo estudio, abordamos el papel de las plataformas genómicas en el manejo de la enfermedad neoadyuvante. Si bien el Test de Oncotype DX Breast Recurrence Score® ha demostrado su valor en la toma de decisiones terapéuticas en el contexto adyuvante, siendo respaldado por guías internacionales y ampliamente utilizado en la práctica clínica^{113,53}, su aplicación en el escenario post-neoadyuvante sigue siendo un área inexplorada. Actualmente, no existe un consenso sobre el uso de plataformas genómicas para evaluar el pronóstico tras la terapia neoadyuvante⁴³⁻⁴⁵. Esta falta de estandarización limita nuestra capacidad para caracterizar el tumor residual y comprender su biología, privándonos de información crucial para predecir su comportamiento futuro y guiar el tratamiento post-NAC⁴⁷. Un estudio reportó el uso del ensayo de 21 genes (test de Oncotype DX Breast Recurrence Score®) para la selección de tratamientos neoadyuvantes en cáncer de mama luminal, sugiriendo su utilidad para identificar pacientes candidatos para NAC¹¹⁴. Sin embargo, este test no se ha utilizado en el escenario post-NAC.

Este estudio representa la primera investigación que valida la aplicación de la plataforma genómica de 21 genes como un método estandarizado para evaluar el riesgo biológico en pacientes con cáncer de mama luminal-HER2 negativo que no alcanzan una pCR después de la NAC. El test permite estratificar el riesgo biológico en este subgrupo de pacientes, proporcionando información crucial para guiar la toma de decisiones terapéuticas personalizadas en el contexto post-neoadyuvante.

Nuestros hallazgos revelaron que el tamaño tumoral inicial, la administración de quimioterapia en el momento del diagnóstico y el RS post-NAC, dentro de los primeros 5 años, fueron predictores significativos de SG y metástasis a distancia en el análisis univariable, constituyendo este último el criterio principal de valoración.

DISCUSIÓN

La asociación entre el tamaño tumoral y el pronóstico del cáncer de mama está ampliamente documentada^{115,116}, incluso tras la administración de NAC¹¹⁴. Asimismo, la presencia y extensión de la enfermedad residual, reflejada en el RS post-NAC dentro de los primeros cinco años, se ha correlacionado con un mayor riesgo de recurrencias locorregionales y a distancia, así como con una disminución de la supervivencia global^{42,117}. Esta observación es consistente con la asociación establecida entre un RS elevado y una mayor tasa de recurrencia a distancia en el contexto adyuvante⁵².

Nuestro análisis multivariable confirmó la fuerte asociación entre el RS post-NAC y la aparición de metástasis a distancia y la SG durante los primeros 5 años. Además, la estratificación de pacientes en grupos según el RS (≤ 25 y > 25) reveló diferencias significativas en la supervivencia libre de recurrencia a distancia y la SG, siendo el grupo RS ≤ 25 el que presentó una menor tasa de recurrencia a distancia a los 5 y 10 años, así como una mejor SG. Estos resultados son consistentes con estudios previos en el contexto adyuvante, que han demostrado una asociación entre un RS bajo y una mejor SLE y SG a 5 años¹¹⁸. En consecuencia, nuestros hallazgos subrayan la importancia de considerar el RS post-NAC como un factor pronóstico clave en pacientes con cáncer de mama luminal HER2-negativo. La identificación de pacientes con RS elevado tras la NAC permite individualizar el tratamiento adyuvante, intensificando las estrategias terapéuticas en este subgrupo de alto riesgo con el objetivo de mejorar su pronóstico y supervivencia a largo plazo.

Asimismo, demostramos que la NAC es capaz de reducir significativamente el RS medio en aproximadamente 5 puntos y disminuir la proporción de pacientes con RS alto en un 10% de tumores luminales-HER2 negativo. Estos efectos beneficiosos de la NAC se observaron tanto en la población general como en los subgrupos con y sin metástasis a distancia, corroborando hallazgos previos^{28-30, 46, 119-123}.

Un hallazgo relevante es el cambio sustancial en el RS tras la NAC, especialmente en pacientes con RS alto (> 25) al inicio, independientemente de la edad, aunque esta disminución fue ligeramente más pronunciada en pacientes ≤ 50 años. En la población general, el 53% de los pacientes con RS alto inicial cambiaron a RS bajo tras la NAC, sugiriendo un impacto de la NAC en la biología de la enfermedad o al menos en el

DISCUSIÓN

comportamiento del tumor. No obstante, el 47% restante mantuvo un RS alto, indicando que la NAC podría no ser necesaria en estos casos, a pesar de cumplir criterios clínicos para su administración¹¹⁴.

Otro hallazgo destacable es que aproximadamente el 11% de los pacientes con RS bajo inicial aumentaron a RS alto tras la NAC, sugiriendo un posible efecto activador del tumor inducido por la terapia. Se ha descrito que ciertas características tumorales, como un grado tumoral alto, tipo histológico específico, baja expresión de RP y alto índice de proliferación (Ki67), pueden influir en los resultados del Oncotype DX Breast Recurrence Score^{®124}. Por tanto, es crucial evaluar estos parámetros en casos de aumento inesperado del RS para optimizar la toma de decisiones terapéuticas.

En el subgrupo de pacientes con metástasis a distancia, el 41.4% de aquellos con RS alto inicial cambiaron a RS bajo tras la NAC, mientras que esta reducción fue mayor en pacientes no metastásicos (60.9%). Estos datos son especialmente relevantes en pacientes con metástasis a distancia, ya que el RS post-NAC puede guiar las decisiones terapéuticas posteriores, ayudando a evitar el sobret ratamiento en aquellos cuyo RS ha disminuido, particularmente en casos con ganglios linfáticos positivos¹²⁵.

Otro resultado relevante de nuestro estudio es la notable reducción observada en los biomarcadores (RE+, RP+, HER2- y Ki67) y en el RS tras la NAC en todas las poblaciones analizadas. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas que han identificado una correlación significativa entre un RS alto y la negatividad de RP, entre otros factores, con valores más elevados de RS¹²⁶. Esta asociación se fundamenta en el hecho de que los biomarcadores RE, RP, HER2 y Ki67 son componentes integrales en el cálculo del RS.

Un estudio adicional demostró que todos los pacientes con RP alto y Ki67 bajo presentaban un RS de bajo a intermedio, sugiriendo que niveles elevados de Ki67 y la negatividad de RP son indicadores de alto riesgo y respaldan la inclusión de quimioterapia en la toma de decisiones clínicas¹²⁴. En nuestro estudio, aunque la negatividad de RP tendió a aumentar después de la NAC, el alto porcentaje de muestras no disponibles impidió extraer conclusiones definitivas al respecto.

DISCUSIÓN

En relación con el estado de HER2, nuestro estudio también observó una disminución en la proporción de pacientes HER2 negativos tras la NAC. Sería interesante determinar cuántos de estos pacientes eran HER2-low, ya que aproximadamente el 65% de los tumores luminales presentan baja expresión de HER2¹²⁷. Esta cuestión es relevante debido a la asociación estadística observada entre la baja expresión de HER2 y una mejora en la SG, la SLE y la supervivencia libre de enfermedad a distancia en pacientes de alto riesgo (RS > 25) con cáncer de mama luminal-HER2 negativo¹²⁸.

En conclusión, la comprensión de las dinámicas de los biomarcadores y su relación con el RS tras la NAC puede mejorar significativamente el proceso de toma de decisiones terapéuticas en pacientes con cáncer de mama.

6.1. Limitaciones

Una limitación significativa del primer estudio es el tamaño reducido de la muestra, aunque esta cohorte de pacientes es bastante representativa de una población típica que recibe tratamiento neoadyuvante. Una segunda limitación es el seguimiento limitado a 12 meses post-cirugía, por lo que no se puede descartar la recurrencia a largo plazo, especialmente en cánceres HER2 y triple negativo, cuya ventana de recurrencia se extiende hasta 5 años, o incluso más en el caso de tumores luminales. Dadas estas limitaciones, no se pudo evaluar los niveles de ctDNA como un factor pronóstico para la recurrencia. Además, no se realizaron pruebas de sangre de seguimiento en todos los pacientes ni en todos los intervalos programados durante el seguimiento.

Respecto al estudio del RS en pacientes sometidas a tratamiento con NAC, la falta de material disponible en la biopsia diagnóstica hizo que se dispusiera de muchas menos muestras para analizar pre-tratamiento respecto a las post-tratamiento, por lo que las variaciones observadas podrían verse modificadas con una serie más amplia.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El estudio de ctDNA y del RS permiten caracterizar mejor las respuestas al tratamiento neoadyuvante y ofrecer un tratamiento más dirigido a pacientes con cáncer de mama.
- 2) La eliminación del ctDNA en plasma junto con una respuesta clínica completa tras la NAC se correlaciona con una pCR en pacientes con cáncer de mama HER2+ o triple negativo. La presencia de niveles claramente detectables de ctDNA en nuestra serie está asociada con la presencia de celularidad neoplásica residual y la progresión de la enfermedad.
- 3) El Oncotype DX Breast Recurrence Score® en el contexto neoadyuvante, permite identificar dos tipos de grupos de tumores según el riesgo biológico que presenten tras la administración de NAC, a partir de un punto de corte de 25, en pacientes con tumores luminales-HER2 negativos.
- 4) El uso de NAC redujo significativamente el RS del tumor inicial respecto a la enfermedad residual, confirmando la capacidad de este tipo de tratamientos de reducir el riesgo biológico de los tumores luminales-HER2 negativos.

8. LÍNEAS DE FUTURO

En el primer estudio los hallazgos descritos sugieren la necesidad de realizar investigaciones adicionales con cohortes de pacientes más grandes para confirmar el valor añadido del ctDNA en la predicción de la pCR. Esto ayudaría a determinar con mayor precisión qué pacientes podrían evitar la cirugía de manera segura después de la NAC.

Además, si se confirma que esta estrategia es clínicamente útil, podría implementarse un estudio prospectivo aleatorizado con un enfoque de "esperar y observar" en pacientes seleccionados con riesgo mínimo. Este enfoque incluiría pruebas de plasma en serie para monitorizar la presencia de ctDNA, permitiendo una vigilancia estrecha y una intervención temprana en caso de detección de enfermedad residual o recurrencia.

La implementación de este enfoque no solo podría mejorar la calidad de vida de los pacientes al evitar cirugías innecesarias, sino que también podría optimizar los recursos sanitarios y reducir los costos asociados a procedimientos quirúrgicos. Por lo tanto, futuras investigaciones deben centrarse en validar estos hallazgos en estudios clínicos aleatorizados y controlados, así como en desarrollar protocolos estandarizados para la monitorización del ctDNA en la práctica clínica.

En tumores luminales, la mejor caracterización de la enfermedad residual, y en concreto del riesgo biológico de la misma, podría plantear también estudios prospectivos para valorar el posible beneficio de un tratamiento más agresivo en los tumores de alto riesgo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Nov;72(6):524-541. doi: 10.3322/caac.21754. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36190501.
3. Brinton LA, Gaudet MM, Gierach GL. Breast cancer. In: Thun M, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. Oxford University Press; 2018:861-888)
4. Arnold M, Morgan E, Rumgay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast.* 2022 Dec;66:15-23. doi: 10.1016/j.breast.2022.08.010. Epub 2022 Sep 2. PMID: 36084384; PMCID: PMC9465273.
5. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2). <https://publications.iarc.fr/581>.
6. 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. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology.* 2002 Sep;41(3A):151-2, discussion 152-3. PMID: 12405945.
7. 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(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20804570; PMCID: PMC2949637.

BIBLIOGRAFÍA

8. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23000897; PMCID: PMC3465532.
9. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093. PMID: 10963602.
10. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303. Epub 2013 Aug 4. PMID: 23917950; PMCID: PMC3755334.
11. Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, Mastropasqua MG, Luini A, Veronesi P, et al. Outcome of special types of luminal breast cancer. *Ann Oncol*. 2012 Jun;23(6):1428-36. doi: 10.1093/annonc/mdr461. Epub 2011 Oct 29. PMID: 22039080.
12. 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 Sep 11;98(19):10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098. PMID: 11553815; PMCID: PMC58566.
13. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Sep;10(9):494-506. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.124. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23881035.
14. Cronin KA, Harlan LC, Dodd KW, Abrams JS, Ballard-Barbash R. Population-based estimate of the prevalence of HER-2 positive breast cancer tumors for early stage patients in the US. *Cancer Invest*. 2010;28(9):963-968. doi:10.3109/07357907.2010.496759 [PubMed: 20690807]

BIBLIOGRAFÍA

15. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2015 Nov;1(8):1154-61. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.2286. PMID: 26204261.
16. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE Jr, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol.* 2014 Nov 20;32(33):3744-52. doi: 10.1200/JCO.2014.55.5730. Epub 2014 Oct 20. PMID: 25332249; PMCID: PMC4226805.
17. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* 2018 Jul 10;36(20):2105-2122. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8738. Epub 2018 May 30. PMID: 29846122.
18. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer.* 2008 Jul 1;123(1):236-40. doi: 10.1002/ijc.23518. PMID: 18398844.
19. Aleix Prat, Barbara Adamo, Maggie C.U. Cheang, Carey K. Anders, Lisa A. Carey, Charles M. Perou, Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer, *The Oncologist*, Volume 18, Issue 2, February 2013, Pages 123–133, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0397>
20. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, Bradbury I, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012 May 20;30(15):1879-87. doi: 10.1200/JCO.2011.38.2010. Epub 2012 Mar 26. PMID: 22454417.
21. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015

- Nov;24 Suppl 2:S26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26253814.
22. 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.* 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045. PMID: 17671126.
23. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, PiTENpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2750-67. doi: 10.1172/JCI45014. PMID: 21633166; PMCID: PMC3127435.
24. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One.* 2016 Jun 16;11(6):e0157368. doi: 10.1371/journal.pone.0157368. PMID: 27310713; PMCID: PMC4911051.
25. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014 Jul 12;384(9938):164-72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8. Epub 2014 Feb 14. Erratum in: *Lancet.* 2019 Mar 9;393(10175):986. PMID: 24529560.
26. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 10;26(8):1275-81. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4147. Epub 2008 Feb 4. Corrected and republished in: *J Clin Oncol.* 2023 Apr 1;41(10):1809-1815. PMID: 18250347.
27. Ragaz J, Baird R, Rebbeck P, Goldie J, Coldman A, Spinelli J. Neoadjuvant (preoperative) chemotherapy for breast cancer. *Cancer.* 1985 Aug 15;56(4):719-

24. doi:10.1002/1097-0142(19850815)56:4<719::aid-cnrcr2820560403>3.0.co;2-w. PMID: 4016668.
28. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2672-85. doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2672.
29. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;(30):96-102. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003469. PMID: 11773300.
30. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol*. 2001 Nov 15;19(22):4224-37. doi: 10.1200/JCO.2001.19.22.4224. PMID: 11709566.
31. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J Clin Oncol*. 2003 Jul 1;21(13):2600-8. doi: 10.1200/JCO.2003.01.136. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2003 Dec 1;21(23):4469. PMID: 12829681.
32. Ataseven B, von Minckwitz G. The Impact of Neoadjuvant Treatment on Surgical Options and Outcomes. *Ann Surg Oncol*. 2016 Oct;23(10):3093-9. doi: 10.1245/s10434-016-5364-3. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27364505.
33. Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2012 Dec;48(18):3342-54. doi: 10.1016/j.ejca.2012.05.023. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22766518.

34. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jan;13(1):25-32. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70336-9. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22153890.
35. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmüller S, Lebeau A, Kreienberg R, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol.* 2011 Sep 1;29(25):3351-7. doi: 10.1200/JCO.2010.31.4930. Epub 2011 Jul 25. PMID: 21788566.
36. Chang HR, Glaspy J, Allison MA, Kass FC, Elashoff R, Chung DU, Gornbein J. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. *Cancer.* 2010 Sep 15;116(18):4227-37. doi: 10.1002/cncr.25309. PMID: 20549829.
37. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Mar 1;28(7):1145-53. doi: 10.1200/JCO.2009.22.4725. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100965; PMCID: PMC2834466.
38. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2020 Jun 15;26(12):2838-2848. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3492. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32046998; PMCID: PMC7299787.
39. Loibl S, Marmé F, Martin M, Untch M, Bonnefoi H, Kim SB, et al. Palbociclib for Residual High-Risk Invasive HR-Positive and HER2-Negative Early Breast Cancer-

- The Penelope-B Trial. *J Clin Oncol*. 2021 May 10;39(14):1518-1530. doi: 10.1200/JCO.20.03639. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33793299.
40. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al.; KATHERINE Investigators. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Feb 14;380(7):617-628. doi: 10.1056/NEJMoa1814017. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30516102.
41. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, et al; OlympiA Clinical Trial Steering Committee and Investigators. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021 Jun 24;384(25):2394-2405. doi: 10.1056/NEJMoa2105215. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34081848; PMCID: PMC9126186.
42. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 1;25(28):4414-22. doi: 10.1200/JCO.2007.10.6823. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785706.
43. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al; Residual Disease Characterization Working Group of the Breast International Group-North American Breast Cancer Group Collaboration. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol*. 2015 Sep;28(9):1185-201. doi: 10.1038/modpathol.2015.74. Epub 2015 Jul 24. PMID: 26205180.
44. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, Boughey JC, Coles C, Curigliano G, et al.; Breast International Group-North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) collaboration. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Ann Oncol*. 2015 Jul;26(7):1280-91. doi: 10.1093/annonc/mdv161. Epub 2015 May 27. PMID: 26019189; PMCID: PMC4804123.

45. Burgués O, López-García MÁ, Pérez-Mías B, Santiago P, Vieites B, García JF, Peg V. The ever-evolving role of pathologists in the management of breast cancer with neoadjuvant treatment: recommendations based on the Spanish clinical experience. *Clin Transl Oncol*. 2018 Mar;20(3):382-391. doi: 10.1007/s12094-017-1725-z. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28795336.
46. Caparica R, Lambertini M, Pondé N, Fumagalli D, de Azambuja E, Piccart M. Post-neoadjuvant treatment and the management of residual disease in breast cancer: state of the art and perspectives. *Ther Adv Med Oncol*. 2019 Feb 25;11:1758835919827714. doi: 10.1177/1758835919827714. PMID: 30833989; PMCID: PMC6393951.
47. Jeruss JS, Mittendorf EA, Tucker SL, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, et al. Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 10;26(2):246-52. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5352. Epub 2007 Dec 3. PMID: 18056680.
48. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6. doi: 10.1038/415530a. PMID: 11823860.
49. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0. PMID: 15894097.
50. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jul 8;67(4):290-303. doi: 10.3322/caac.21393. Epub 2017 Mar 14. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2017 Jul 8;67(4):345. PMID: 28294295.

51. Syed YY. Oncotype DX Breast Recurrence Score[®]: A Review of its Use in Early-Stage Breast Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2020 Oct;24(5):621-632. doi: 10.1007/s40291-020-00482-7. PMID: 32613290.
52. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817-26. doi: 10.1056/NEJMoa041588. Epub 2004 Dec 10. PMID: 15591335.
53. 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*. 2018 Jul 12;379(2):111-121. doi: 10.1056/NEJMoa1804710. Epub 2018 Jun 3. PMID: 29860917; PMCID: PMC6172658.
54. Kalinsky K, Barlow WE, Gralow JR, Meric-Bernstam F, Albain KS, Hayes DF, et al. 21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021 Dec 16;385(25):2336-2347. doi: 10.1056/NEJMoa2108873. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34914339; PMCID: PMC9096864.
55. Yamamoto Y, Iwata H, Masuda N, Fujisawa T, Toyama T, Kashiwaba M, et al. TransNEOS: Validation of the oncotype DX recurrence score (RS) testing core needle biopsy samples from NEOS as predictor of clinical response to neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal estrogen receptor positive (ER+), HER2 negative (HER2-) breast cancer patients [abstract]. In: *Proceedings of the 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium*; 2017 Dec 5-9; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2018;78(4 Suppl):Abstract nr PD5-03.
56. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*. 2002 Oct;28(5):255-71. doi: 10.1016/s0305-7372(02)00077-4. PMID: 12435372.
57. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for

BIBLIOGRAFÍA

- their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659-65. PMID: 11245480.
58. Freitas AJA, Causin RL, Varuzza MB, Calfa S, Hidalgo Filho CMT, Komoto TT, et al. Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 1;23(17):9952. doi: 10.3390/ijms23179952. PMID: 36077348; PMCID: PMC9456236.
59. Ashworth, T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australas. Med. J.* 14, 146–149 (1869).
60. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb;142(3-4):241-3. French. PMID: 18875018.
61. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar;37(3):646-50. PMID: 837366.
62. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Apr;86(4):774-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x. PMID: 7918071.
63. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Jan-Feb;3(1):67-71. PMID: 8118388.
64. Tay TKY, Tan PH. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review. *Arch Pathol Lab Med.* 2021 Jun 1;145(6):678-686. doi: 10.5858/arpa.2019-0559-RA. PMID: 32045277.

BIBLIOGRAFÍA

65. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet.* 2019 Jun;95(6):643-660. doi: 10.1111/cge.13514. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30671931.
66. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Nov 22;6(1):404. doi: 10.1038/s41392-021-00817-8. PMID: 34803167; PMCID: PMC8606574.
67. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009 Apr;9(4):274-84. doi: 10.1038/nrc2622. PMID: 19308067.
68. Chen D, Xu T, Wang S, Chang H, Yu T, Zhu Y, Chen J. Liquid Biopsy Applications in the Clinic. *Mol Diagn Ther.* 2020 Apr;24(2):125-132. doi: 10.1007/s40291-019-00444-8. Erratum in: *Mol Diagn Ther.* 2020 Feb 17;; PMID: 31919754.
69. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019 Jul;16(7):409-424. doi: 10.1038/s41571-019-0187-3. PMID: 30796368.
70. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med.* 2018 Nov 1;379(18):1754-1765. doi: 10.1056/NEJMra1706174. PMID: 30380390.
71. Zhang X, Ju S, Wang X, Cong H. Advances in liquid biopsy using circulating tumor cells and circulating cell-free tumor DNA for detection and monitoring of breast cancer. *Clin Exp Med.* 2019 Aug;19(3):271-279. doi: 10.1007/s10238-019-00563-w. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31190187.
72. Sant M, Bernat-Peguera A, Felip E, Margelí M. Role of ctDNA in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 9;14(2):310. doi: 10.3390/cancers14020310. PMID: 35053474; PMCID: PMC8773730.

BIBLIOGRAFÍA

73. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018 Feb 23;359(6378):926-930. doi: 10.1126/science.aar3247. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29348365; PMCID: PMC6080308.
74. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran R, Croessmann S, Zabransky DJ, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 May 15;20(10):2643-2650. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2933. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24504125; PMCID: PMC4024333.
75. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015 Aug 26;7(302):302ra133. doi: 10.1126/scitranslmed.aab0021. PMID: 26311728.
76. McDonald BR, Contente-Cuomo T, Sammut SJ, Odenheimer-Bergman A, Ernst B, Perdignes N, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis to detect residual disease after neoadjuvant therapy in breast cancer. *Sci Transl Med*. 2019 Aug 7;11(504):eaax7392. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7392. PMID: 31391323; PMCID: PMC7236617.
77. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, Hirst GL, Yau C, Wolf DM, et al. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Ann Oncol*. 2021 Feb;32(2):229-239. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.007. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33232761; PMCID: PMC9348585.
78. Papakonstantinou A, Gonzalez NS, Pimentel I, Suñol A, Zamora E, Ortiz C, et al. Prognostic value of ctDNA detection in patients with early breast cancer undergoing neoadjuvant therapy: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2022 Mar;104:102362. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102362. Epub 2022 Feb 18. PMID: 35219090.

79. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1199-209. doi: 10.1056/NEJMoa1213261. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23484797.
80. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, Kernaghan S, Wardley AM, Macpherson IR, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *Lancet Oncol*. 2020 Oct;21(10):1296-1308. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30444-7. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32919527; PMCID: PMC7599319.
81. Migliaccio I, Leo A, Galardi F, Guarducci C, Fusco GM, Benelli M, et al. Circulating Biomarkers of CDK4/6 Inhibitors Response in Hormone Receptor Positive and HER2 Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 May 27;13(11):2640. doi: 10.3390/cancers13112640. PMID: 34072070; PMCID: PMC8199335.
82. Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R, Lucas PC, Hartmaier RJ, Watters RJ, et al. Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2016 Mar 1;22(5):1130-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1534. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26500237; PMCID: PMC4775406.
83. Beije N, Sieuwerts AM, Kraan J, Van NM, Onstenk W, Vitale SR, et al. Estrogen receptor mutations and splice variants determined in liquid biopsies from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol*. 2018 Jan;12(1):48-57. doi: 10.1002/1878-0261.12147. Epub 2017 Nov 17. PMID: 29063679; PMCID: PMC5748489.
84. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol*. 2016 Mar;10(3):464-74. doi: 10.1016/j.molonc.2015.12.001. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26776681; PMCID: PMC5528975.

BIBLIOGRAFÍA

85. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.
86. Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N, et al. Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9364-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0605. PMID: 17909045.
87. Begona Jimenez Rodriguez, Gema Diaz Córdoba, Alicia Garrido Aranda, Luis Vicioso, M Rosario Chica Parrado, Vanessa de Luque, et al. Plasma sequencing of ctDNA in early stage breast cancer as part of the screening process. *Journal of Clinical Oncology* 2018 36:15_suppl, 12073-12073.
88. Cheng R, Kong X, Wang X, Fang Y, Wang J. Oncotype DX Breast Recurrence Score Distribution and Chemotherapy Benefit Among Women of Different Age Groups With HR-Positive, HER2-Negative, Node-Negative Breast Cancer in the SEER Database. *Front Oncol*. 2020 Oct 30;10:1583. doi: 10.3389/fonc.2020.01583. PMID: 33194568; PMCID: PMC7663955.
89. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 1;10(19):6622-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0380. PMID: 15475452.
90. Mamounas EP. Omitting Surgery in Complete Responders After Neoadjuvant Chemotherapy: The Quest Continues. *Ann Surg Oncol*. 2018 Oct;25(11):3119-3122. doi: 10.1245/s10434-018-6678-0. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30062473.
91. Heil J, Kuerer HM, Pfob A, Rauch G, Sinn HP, Golatta M, et al. Eliminating the breast cancer surgery paradigm after neoadjuvant systemic therapy: current

BIBLIOGRAFÍA

- evidence and future challenges. *Ann Oncol.* 2020 Jan;31(1):61-71. doi: 10.1016/j.annonc.2019.10.012. PMID: 31912797.
92. Keune JD, Jeffe DB, Schootman M, Hoffman A, Gillanders WE, Aft RL. Accuracy of ultrasonography and mammography in predicting pathologic response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Am J Surg.* 2010 Apr;199(4):477-84. doi: 10.1016/j.amjsurg.2009.03.012. PMID: 20359567; PMCID: PMC3252889.
93. Peintinger F, Kuerer HM, Anderson K, Boughey JC, Meric-Bernstam F, Singletary SE, et al. Accuracy of the combination of mammography and sonography in predicting tumor response in breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2006 Nov;13(11):1443-9. doi: 10.1245/s10434-006-9086-9. Epub 2006 Sep 21. PMID: 17028770.
94. Schott AF, Roubidoux MA, Helvie MA, Hayes DF, Kleer CG, Newman LA, et al. Clinical and radiologic assessments to predict breast cancer pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Aug;92(3):231-8. doi: 10.1007/s10549-005-2510-1. PMID: 16155794.
95. Croshaw R, Shapiro-Wright H, Svensson E, Erb K, Julian T. Accuracy of clinical examination, digital mammogram, ultrasound, and MRI in determining postneoadjuvant pathologic tumor response in operable breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2011 Oct;18(11):3160-3. doi: 10.1245/s10434-011-1919-5. Epub 2011 Sep 27. PMID: 21947594.
96. Loo CE, Straver ME, Rodenhuis S, Muller SH, Wesseling J, Vrancken Peeters MJ, Gilhuijs KG. Magnetic resonance imaging response monitoring of breast cancer during neoadjuvant chemotherapy: relevance of breast cancer subtype. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 20;29(6):660-6. doi: 10.1200/JCO.2010.31.1258. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220595.
97. Wang Y, Zhang C, Liu J, Huang G. Is 18F-FDG PET accurate to predict neoadjuvant therapy response in breast cancer? A meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2012

BIBLIOGRAFÍA

- Jan;131(2):357-69. doi: 10.1007/s10549-011-1780-z. Epub 2011 Sep 30. PMID: 21960111.
98. Li Y, Zhou Y, Mao F, Lin Y, Zhang X, Shen S, Sun Q. The Diagnostic Performance of Minimally Invasive Biopsy in Predicting Breast Pathological Complete Response After Neoadjuvant Systemic Therapy in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2020 Jun 26;10:933. doi: 10.3389/fonc.2020.00933. PMID: 32676452; PMCID: PMC7333530.
99. Moss J, Zick A, Grinshpun A, Carmon E, Maoz M, Ochana BL, et al. Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer. *Ann Oncol.* 2020 Mar;31(3):395-403. doi: 10.1016/j.annonc.2019.11.014. Epub 2019 Dec 11. PMID: 32067681.
100. Li S, Lai H, Liu J, Liu Y, Jin L, Li Y, et al. Circulating Tumor DNA Predicts the Response and Prognosis in Patients With Early Breast Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *JCO Precis Oncol.* 2020 Mar 27;4:PO.19.00292. doi: 10.1200/PO.19.00292. PMID: 32923909; PMCID: PMC7450928.
101. Radovich M, Jiang G, Hancock BA, Chitambar C, Nanda R, Falkson C, et al. Association of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells After Neoadjuvant Chemotherapy With Disease Recurrence in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: Preplanned Secondary Analysis of the BRE12-158 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020 Sep 1;6(9):1410-1415. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2295. PMID: 32644110; PMCID: PMC7349081.
102. Rodriguez BJ, Córdoba GD, Aranda AG, Álvarez M, Vicioso L, Pérez CL, et al. Detection of *TP53* and *PIK3CA* Mutations in Circulating Tumor DNA Using Next-Generation Sequencing in the Screening Process for Early Breast Cancer Diagnosis. *J Clin Med.* 2019 Aug 7;8(8):1183. doi: 10.3390/jcm8081183. PMID: 31394872; PMCID: PMC6723048.

BIBLIOGRAFÍA

103. Ciriaco N, Zamora E, Escrivá-de-Romaní S, Miranda Gómez I, Jiménez Flores J, Saura C, et al. Clearance of ctDNA in triple-negative and HER2-positive breast cancer patients during neoadjuvant treatment is correlated with pathologic complete response. *Ther Adv Med Oncol*. 2022 Nov 29;14:17588359221139601. doi: 10.1177/17588359221139601. PMID: 36479470; PMCID: PMC9720791.
104. Mesquita A, Costa JL, Schmitt F. Utility of Circulating Tumor DNA in Different Clinical Scenarios of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 16;12(12):3797. doi: 10.3390/cancers12123797. PMID: 33339259; PMCID: PMC7766337.
105. Chen YH, Hancock BA, Solzak JP, Brinza D, Scafe C, Miller KD, Radovich M. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy. *NPJ Breast Cancer*. 2017 Jul 3;3:24. doi: 10.1038/s41523-017-0028-4. PMID: 28685160; PMCID: PMC5495776.
106. Ortolan E, Appierto V, Silvestri M, Miceli R, Veneroni S, Folli S, et al. Blood-based genomics of triple-negative breast cancer progression in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *ESMO Open*. 2021 Apr;6(2):100086. doi: 10.1016/j.esmoop.2021.100086. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33743331; PMCID: PMC8010400.
107. Chen Z, Sun T, Yang Z, Zheng Y, Yu R, Wu X, et al. Monitoring treatment efficacy and resistance in breast cancer patients via circulating tumor DNA genomic profiling. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Feb;8(2):e1079. doi: 10.1002/mgg3.1079. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31867841; PMCID: PMC7005625.
108. Madic J, Kiialainen A, Bidard FC, Birzele F, Ramey G, Leroy Q, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2015 May 1;136(9):2158-65. doi: 10.1002/ijc.29265. Epub 2014 Oct 23. PMID: 25307450.

BIBLIOGRAFÍA

109. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Apr;150(2):299-307. doi: 10.1007/s10549-015-3322-6. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25736040.
110. Board RE, Wardley AM, Dixon JM, Armstrong AC, Howell S, Renshaw L, et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Apr;120(2):461-7. doi: 10.1007/s10549-010-0747-9. Epub 2010 Jan 28. PMID: 20107891.
111. Razavi P, Li BT, Brown DN, Jung B, Hubbell E, Shen R, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med.* 2019 Dec;25(12):1928-1937. doi: 10.1038/s41591-019-0652-7. Epub 2019 Nov 25. PMID: 31768066; PMCID: PMC7061455.
112. Ptashkin RN, Mandelker DL, Coombs CC, Bolton K, Yelskaya Z, Hyman DM, et al. Prevalence of Clonal Hematopoiesis Mutations in Tumor-Only Clinical Genomic Profiling of Solid Tumors. *JAMA Oncol.* 2018 Nov 1;4(11):1589-1593. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2297. Erratum in: *JAMA Oncol.* 2019 Jan 1;5(1):122. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.5678. PMID: 29872864; PMCID: PMC6224316.
113. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Nov 19;373(21):2005-14. doi: 10.1056/NEJMoa1510764. Epub 2015 Sep 27. PMID: 26412349; PMCID: PMC4701034.
114. Morales Murillo S, Gasol Cudos A, Veas Rodriguez J, Canosa Morales C, Melé Olivé J, Vilardell Villellas F, et al. Selection of neoadjuvant treatment based on the 21-GENE test results in luminal breast cancer. *Breast.* 2021 Apr;56:35-41. doi: 10.1016/j.breast.2021.01.001. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33601299; PMCID: PMC7900764.

BIBLIOGRAFÍA

115. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;22(3):207-19. doi: 10.1007/BF01840834. PMID: 1391987.
116. Phung MT, Tin Tin S, Elwood JM. Prognostic models for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer.* 2019 Mar 14;19(1):230. doi: 10.1186/s12885-019-5442-6. PMID: 30871490; PMCID: PMC6419427.
117. Peintinger F, Sinn B, Hatzis C, Albarracín C, Downs-Kelly E, Morkowski J, Gould R, Symmans WF. Reproducibility of residual cancer burden for prognostic assessment of breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol.* 2015 Jul;28(7):913-20. doi: 10.1038/modpathol.2015.53. Epub 2015 May 1. PMID: 25932963; PMCID: PMC4830087.
118. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, et al; Breast Cancer Intergroup of North America. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010 Jan;11(1):55-65. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70314-6. Epub 2009 Dec 10. PMID: 20005174; PMCID: PMC3058239.
119. Petrelli F, Ghidini A, Rea C, Parati MC, Borgonovo K, Ghidini M, et al. Platinum dose in neoadjuvant therapy for triple-negative breast cancer: A systematic review and network meta-analysis. *Curr Probl Cancer.* 2024 Jun;50:101096. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2024.101096. Epub 2024 Apr 11. PMID: 38608530.
120. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, et al; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 15;21(22):4165-74. doi: 10.1200/JCO.2003.12.005. Epub 2003 Oct 14. PMID: 14559892.

121. Tiezzi DG, Andrade JM, Marana HRC, Zola FE, Peria FM. Breast conserving surgery after neoadjuvant therapy for large primary breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2008 Aug;34(8):863-867. doi: 10.1016/j.ejso.2008.01.015. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18304777.
122. Esserman LJ, Berry DA, DeMichele A, Carey L, Davis SE, Buxton M, et al. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 10;30(26):3242-9. doi: 10.1200/JCO.2011.39.2779. Epub 2012 May 29. PMID: 22649152; PMCID: PMC3434983.
123. Matuschek C, Jazmati D, Bölke E, Tamaskovics B, Corradini S, Budach W, et al. Post-Neoadjuvant Treatment Strategies in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 28;14(5):1246. doi: 10.3390/cancers14051246. PMID: 35267554; PMCID: PMC8909560.
124. Lashen A, Toss MS, Fadhil W, Oni G, Madhusudan S, Rakha E. Evaluation oncoType DX[®] 21-gene recurrence score and clinicopathological parameters: a single institutional experience. *Histopathology*. 2023 Apr;82(5):755-766. doi: 10.1111/his.14863. Epub 2023 Feb 1. PMID: 36631400.
125. Sestak I, Dowsett M, Zabaglo L, Lopez-Knowles E, Ferree S, Cowens JW, Cuzick J. Factors predicting late recurrence for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Oct 2;105(19):1504-11. doi: 10.1093/jnci/djt244. Epub 2013 Sep 12. PMID: 24029245; PMCID: PMC3787911.
126. Song R, Lee DE, Lee EG, Lee S, Kang HS, Han JH, et al. Clinicopathological Factors Associated with OncoType DX Risk Group in Patients with ER+/HER2- Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Sep 7;15(18):4451. doi: 10.3390/cancers15184451. PMID: 37760420; PMCID: PMC10527468.
127. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *NPJ*

BIBLIOGRAFÍA

Breast Cancer. 2021 Jan 4;7(1):1. doi: 10.1038/s41523-020-00208-2. Erratum in: NPI Breast Cancer. 2023 Apr 29;9(1):32. doi: 10.1038/s41523-023-00538-x. PMID: 33397968; PMCID: PMC7782714.

128. Mutai R, Barkan T, Moore A, Sarfaty M, Shochat T, Yerushalmi R, Stemmer SM, Goldvaser H. Prognostic impact of HER2-low expression in hormone receptor positive early breast cancer. *Breast*. 2021 Dec;60:62-69. doi: 10.1016/j.breast.2021.08.016. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34481367; PMCID: PMC8414540.

10. ANEXO

ANEXO

Los resultados obtenidos en el primer estudio de esta tesis doctoral han sido validados y publicados en la revista científica *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. El artículo completo, titulado "Clearance of ctDNA in triple-negative and HER2-positive breast cancer patients during neoadjuvant treatment is correlated with pathologic complete response", puede ser consultado en la revista científica mencionada o en la siguiente referencia bibliográfica:

Ciriaco N, Zamora E, Escrivá-de-Romaní S, Miranda Gómez I, Jiménez Flores J, Saura C, Sloane H, Starus A, Fredebohm J, Georgieva L, Speight G, Jones F, Ramón Y Cajal S, Espinosa-Bravo M, Peg V. Clearance of ctDNA in triple-negative and HER2-positive breast cancer patients during neoadjuvant treatment is correlated with pathologic complete response. *Ther Adv Med Oncol*. 2022 Nov 29;14:17588359221139601. doi: 10.1177/17588359221139601. PMID: 36479470; PMCID: PMC9720791.

Esta publicación constituye un reconocimiento al rigor y la relevancia del trabajo realizado durante esta investigación doctoral.

Adicionalmente, se adjunta una copia del artículo en formato PDF en este anexo para facilitar su consulta.

Clearance of ctDNA in triple-negative and HER2-positive breast cancer patients during neoadjuvant treatment is correlated with pathologic complete response

Nikaoly Ciriaco , Esther Zamora , Santiago Escrivá-de-Romaní , Ignacio Miranda Gómez, José Jiménez Flores , Cristina Saura, Hillary Sloane, Anna Starus, Johannes Fredebohm, Lucy Georgieva, Graham Speight, Frederick Jones, Santiago Ramón y Cajal, Martín Espinosa-Bravo and Vicente Peg 

Abstract

Background: Although the standard of care is to perform surgery of primary breast cancer (BC) after neoadjuvant chemotherapy (NAC), for certain patients achieving clinical complete response (cCR) and pathologic complete response (pCR), omission of surgical treatment may be an option. Levels of circulating tumor DNA (ctDNA) during and after therapy could identify patients achieving minimal residual disease. In this study, we evaluated whether ctDNA clearance during NAC could be a correlate to effective response in human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+) and triple-negative (TN) BC patients.

Methods: A prospective study was conducted to identify patient-specific *PIK3CA* and *TP53* mutations in tissue using next-generation sequencing, which could then be used to track the presence/absence of mutations prior to, during, and following NAC using Sysmex SafeSEQ technology. All patients underwent a surgical excision after NAC, and pCR was assessed.

Results: A total of 29 TN and HER2+ BC patients were examined and 20 that carried mutations in the *PIK3CA* and/or *TP53* genes were recruited. Overall, 19 of these 20 patients harbored at least one tumor-specific mutation in their plasma at baseline. After NAC, 15 patients (75.0%) achieved pCR according to the histopathologic evaluation of the surgical specimen, and 15 patients (75.0%) had a cCR; 18 of 20 patients (90.0%) had concordant pCR and cCR. The status of 'no mutation detected' (NMD) following NAC in cCR patients correctly identified the pCR in 14 of 15 patients (93.33%), as well as correctly ruled out pCR in three patients, with an accuracy of 89.47%. During the 12-month follow-up after surgery, 40 plasma samples collected from 15 patients all showed no detectable ctDNA (NMD), and no patient recurred.

Conclusion: These findings prompt further research of the value of ctDNA for non-invasive prediction of clinical/pathological response, raising the possibility of sparing surgery following NAC in selected BC patients.

Keywords: breast cancer, circulating tumor DNA, liquid biopsy, neoadjuvant therapy, pathologic complete response

Received: 13 May 2022; revised manuscript accepted: 31 October 2022.

Introduction

Breast cancer (BC) is the most commonly diagnosed malignancy in women worldwide and accounts for almost one out of four cancer cases.

It is also the second cause of cancer-related death in developed countries.¹ The use of neoadjuvant chemotherapy (NAC) has increased over the years, not only in locally advanced BC, but also in

Ther Adv Med Oncol

2022, Vol. 14: 1–12

DOI: 10.1177/

17588359221139601

© The Author(s), 2022.

Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Correspondence to:

Vicente Peg

Universidad Autónoma
de Barcelona, Barcelona,
Spain

Pathology Department,
Vall d'Hebron University
Hospital, Paseo Vall
d'Hebron 119-129,
Barcelona 08035, Spain

Spanish Biomedical
Research Network Centre
in Oncology (CIBERONC),
Madrid, Spain.

vicente.peg@vallhebron.
cat

Nikaoly Ciriaco

Pathology Department,
Hospital del Mar,
Barcelona, Spain

Universidad Autónoma
de Barcelona, Barcelona,
Spain

Esther Zamora

Universidad Autónoma
de Barcelona, Barcelona,
Spain

Breast Cancer Group,
Vall d'Hebron Institute
of Oncology (VHIO),
Barcelona, Spain

Medical Oncology
Department, Vall d'Hebron
University Hospital,
Barcelona, Spain

**Santiago Escrivá-
de-Romaní**

Breast Cancer Group,
Vall d'Hebron Institute
of Oncology (VHIO),
Barcelona, Spain

Medical Oncology
Department, Vall d'Hebron
University Hospital,
Barcelona, Spain

Ignacio Miranda Gómez

Radiology Department,
Vall d'Hebron University
Hospital, Barcelona, Spain

José Jiménez Flores

Molecular Oncology Lab,
Vall d'Hebron Institute
of Oncology (VHIO),
Barcelona, Spain



Cristina Saura
Medical Oncology
Department, Vall d'Hebron
University Hospital,
Barcelona, Spain

**Hillary Sloane
Anna Starus**
**Johannes Fredebohm
Frederick Jones**
Sismex Inostics, Inc.,
Baltimore, MD, USA

Sismex Inostics GmbH,
Hamburg, Germany

**Lucy Georgieva
Graham Speight**
Oxford Gene Technology,
Oxford, UK

Santiago Ramón y Cajal
Universidad Autónoma de
Barcelona, Barcelona, Spain

Pathology Department,
Vall d'Hebron University
Hospital, Barcelona, Spain

Spanish Biomedical
Research Network Centre
in Oncology (CIBERONC),
Madrid, Spain

Martín Espinosa-Bravo
Breast Cancer Unit, Vall
d'Hebron University
Hospital, Barcelona, Spain

early high-risk tumors. The availability of NAC in therapeutic modalities enables more immediate treatment of local and micrometastatic disease. Hence, a greater number of breast-conserving surgeries may be possible in the future by assessing the efficacy of effective NAC treatment by visualizing tumor shrinkage by imaging, as well as by other sensitive molecular techniques. In many cases, pathologic complete responses (pCR) can be achieved, both in the breast and axilla, which significantly improves disease-free and overall survival.^{2,3} The likelihood of achieving pCR after NAC depends on tumor molecular subtype. Triple-negative (TN) and human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+) BC patients present a higher rate of pCR (up to 60%) as compared to luminal BC patients after NAC.^{4,5}

Currently, the standard of care for primary BC after NAC is to perform surgery to completely remove any residual disease that may remain in non-pCR cases or to diagnose/confirm a pCR. However, if a pCR could be diagnosed with sufficient certainty using non-invasive procedures, a surgical intervention might hypothetically be without benefit and cause unnecessary harm for the patient.^{6,7} Breast imaging methods are not able to accurately estimate residual disease after NAC; hence, they cannot replace the pathologic diagnosis of the surgical excision specimen.^{8,9} A recent meta-analysis that assessed the diagnostic accuracy of image-guided minimally invasive biopsy techniques in predicting breast pCR after NAC concluded that they are not accurate enough to locally visualize residual disease pathology in the tissue.¹⁰

Liquid biopsy has been shown to be a very powerful non-invasive technology that provides valuable supplementary information in terms of prognosis assessment, drug resistance, and individualized treatment.¹¹ Circulating tumor DNA (ctDNA) is fragmented genomic DNA (fgDNA) resulting from apoptosis and necrosis of tumor cells that can be detected in blood by the presence of somatic mutations.¹² In BC, integrated molecular analyses revealed that *TP53* and *PIK3CA* are the most frequently mutated genes, each with a mutation frequency >35%.¹³ Moreover, several forward-looking studies have provided seminal clinical evidence that levels of ctDNA in general, as well as *PIK3CA* and *TP53* mutations in particular, detected during NAC and post-surgery can identify patients that exhibit effective responses *versus* those showing minimal residual disease^{14–18} and can be used to predict tumor response to NAC and prognosis in early BC.^{19–21}

Based on these results, our working hypothesis was that the detection and quantification of ctDNA from patients receiving NAC may be a complementary method to assess pCR along with current imaging techniques. This should allow for future identification of patients without infiltrating or residual disease that could eventually avoid surgery. Thus, we performed longitudinal tracking of plasma *TP53* and *PIK3CA* mutations in HER2+ and TN BC patients to examine ctDNA clearance during NAC as a correlate to effective response to treatment, as benchmarked by clinical complete response (cCR) and pCR. We also analyzed serial samples after surgery in a subset of patients to explore the possible re-emergence of ctDNA over time and whether continued ctDNA surveillance over time might also identify patients who would later recur radiologically.

Materials and methods

Study design and patients

We prospectively recruited patients diagnosed with BC and scheduled to receive NAC in a Spanish Hospital Cancer center from 2018 to 2019. Eligible patients were enrolled upon histologically confirmed stage I/III HER2+ or TN infiltrating breast carcinoma. The pilot cohort was subsequently stratified to select those patients having specific *PIK3CA* and/or *TP53* mutations detected in the biopsied tissue; this was determined by performing next-generation sequencing (NGS) of the patients' primary tumor sample. *TP53* and/or *PIK3CA* mutations identified in the tumor sample were used to generate 'bespoke' or tumor-informed ctDNA liquid biopsy assays customized for each patient using SafeSEQ technology, that were then used to track the presence/absence of these specific mutations in each patient's plasma samples for longitudinal tracking of ctDNA during NAC. Radiological assessment (mammography, ultrasound, and magnetic resonance imaging), as part of the routine clinical practice, and mutation detection in plasma samples were carried out at baseline prior to NAC, at treatment mid-point, and at post-treatment immediately prior to surgery, as well as at three time-points post-surgery (10 weeks, 6 months, and 12 months). The NAC regimens were administered according to the hospital's protocol, based on anthracyclines and taxanes. In some TN patients, the regimens also included platinum agents and, in HER2+ patients, treatments included was specific antibody therapies associated with HER2 signaling pathway

blockade. All patients underwent a surgical excision after NAC, and pCR was assessed. The study was approved by the medical ethical committee of the Hospital Universitario Vall d'Hebron (PR(AG)204/2016) on 30 September 2016. All patients provided oral and written informed consent for sample acquisition for research purposes.

Targeted sequencing analysis of tissue and plasma DNA

Tumor tissue samples from all patients were initially examined for mutations in both the *PIK3CA* and *TP53* genes using the NGS-based SureSeq technology (Oxford Gene Technology) after isolation of DNA using Qiasymphony DNA Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. For liquid biopsy assays, blood was collected in Streck® Cell-Free DNA BCT tubes and processed to plasma using a double-spin protocol in which the blood was centrifuged twice to obtain 8–9 ml of plasma; samples were then stored at -80°C until DNA extraction. DNA was extracted with the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) using extended lysis of 60 min and analyzed using the Plasma SafeSEQ technology (Sysmex Inostics, Inc., Hamburg, Germany). Personalized SafeSEQ liquid biopsy assays were designed custom to each patient based on the tumor mutations identified by the SureSeq NGS assay. To examine each mutation in *PIK3CA* and *TP53* that were found in the patient's tumor sample in liquid biopsy, patient sample specific multiplex reactions were designed at the research laboratories at Sysmex Inostics Germany to detect the specific mutations previously identified in tissue.²² For certain patients, other specific mutations detected in patients' tumor samples were also analyzed alongside of *PIK3CA* or *TP53*. Prior to detection of ctDNA in patient plasma samples, DNA was isolated from plasma and quantified using LINE-1 qPCR as described previously.²³ Patient-customized multiplexes assay was designed and QCed on fgDNA to a mean size of ~ 160 bp using the Covaris M220 instrument (Covaris LLC, Woburn (MA), USA). Background noise was determined for each multiplex using $2 \times 10,000$ genomic equivalents of genomic DNA (NIST, RM8398). Each multiplex contained primers attached to unique identifiers (UIDs), which served as molecular barcodes and used for error correction according to the Safe-SeqS principle.²² Specifically, UID PCR was performed with 13 cycles followed by bead-based purification of patient-specific amplicons using AMPure XP beads (Beckman

Coulter, Brea (CA), USA) and dilution. A second PCR in which sample-specific index sequences were attached served to generate and then discriminate UID families. Index PCR products were purified in a pooled format using QIAquick (Qiagen) followed by one round of AMPure XP bead purification (Beckman Coulter). DNA samples were then quantified using a Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara (CA), USA) and sequenced on NextSeq 550 instrument (Illumina, San Diego (CA), USA). Sequencing data were analyzed using proprietary software packages developed by Sysmex Inostics. Mutation analyses and individual mutation calls were performed with a positive mutation call [mutation detected, MD9 or negative mutation call (no mutation detected, NMD)] for each patient sample time point. Positive mutation calls for each tumor informed mutation that were reported in mutant molecules [i.e. copies/ml of plasma (MM/ml)]. The positive call thresholds (cutoffs) for each tumor-informed mutation detected in plasma were determined individually; these were set as mutant molecule values at $3 \times$ the value of the background established for each mutation position (Limit of Blank) and above a minimum threshold of 3 MM (copies) detected in a patient's sample. Any values falling below both mutations-specific and sample level calling thresholds failed 'Mutation Detected' call criteria by the software program and were thus designated as 'No Mutations Detected (NMD).

Statistical analysis

The primary outcome measure was pCR, as defined by the absence of invasive residual disease both in the breast and axillary lymph nodes following NAC. The ctDNA mutation results (undetectable; NMD/detectable; MD) from each patient's plasma sample obtained at the baseline/pre-surgery were then compared to the sample(s) obtained after NAC. The accuracy of the test as well as positive predictive value and negative predictive value (NPV) were calculated for the combination of ctDNA positive and cCR using the Diagnostic test evaluation calculator (MedCalc Statistical Software Version 20.027, MedCalc Software by, Ostend, Belgium).

Results

Patient and tumor characteristics

A total of 29 BC patients scheduled to receive NAC were prospectively enrolled and histologically examined; nine patients were excluded from

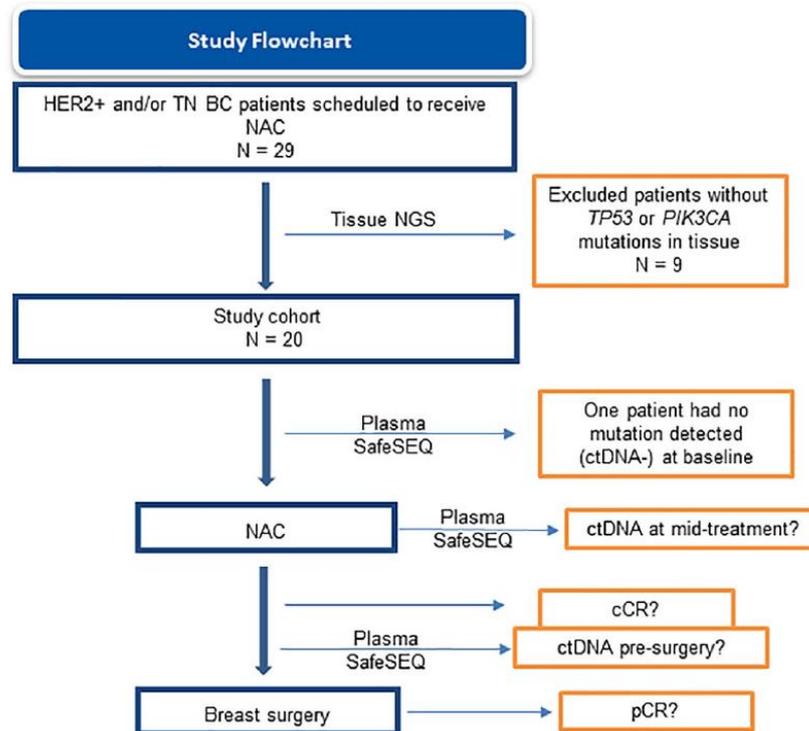


Figure 1. Study flowchart.

further study because of the absence of *TP53* or *PIK3CA* mutations in tissue, as assessed by NGS (Figure 1). Within the study cohort ($N=20$), all patients had at least one *TP53* mutation detected and five patients also had a *PIK3CA* mutation. Patient-specific SafeSEQ assays were generated for all of the *TP53* and *PIK3CA* mutations that were detected in tissue to detect these mutations in plasma during NAC. In addition, three patients (32, 33, and 34) – each having a single *TP53* mutation detected in their tumors – also had accompanying mutations in the following genes (*NTRK1*, *NTRK3*, *HER2/ERBB2*, *GRM3*, *AKT3*, *FGF10*, and *FANCF*); patient-specific SafeSEQ plasma assays were also prepared to detect the presence of these additional mutations in plasma. The clinical and pathological characteristics, tumor mutations identified, and plasma mutations detected in baseline plasma samples prior to NAC are all shown in Table 1. Overall, there were 12 TN and 8 HER2+ BC patients enrolled in the pilot cohort. The median (range) age of patients was 57 (38–88) years. Overall, 19 of these 20 patients (overall percent agreement = 95%) showed at least one tumor-specific mutation detected in their plasma (ctDNA positive) at baseline.

Response to NAC

In all, 15 patients (75.0%) had a pCR after NAC according to the histopathologic evaluation of surgical specimen. A pCR occurred in 10 out of 12 patients (83.3%) with TN tumors and 5 out of 8 patients (62.5%) with HER2+ tumors (Table 2). Based on clinical examination and imaging assessment, 15 patients (75.0%) had a cCR; 18 out of 20 patients (90.0%) had concordant pCR and cCR. At mid-treatment, 15 (75.0%) plasma samples had non-detectable ctDNA (12 cCR patients *versus* 3 non-cCR patients). Immediately prior to surgery, 17 patients (85.0%) had non-detectable ctDNA (15 cCR patients *versus* 2 non-cCR patients). Patients showing a good response to NAC had ctDNA drops in the middle of the treatment (examples in Figure 2).

Accuracy of pre-surgery ctDNA + cCR for pCR determination

Table 3 summarizes the performance of the combination of a ctDNA-negative result and achieving cCR (ctDNA + cCR) in predicting pCR after NAC. The status ctDNA and cCR correctly identified the pCR in 14 out of 15 patients (93.33%), whereas there was one false-positive case (patient 7), one

Table 1. Baseline clinical and tumor characteristics and ctDNA status.

Patient ID	Tumor subtype	Tissue mutation	Plasma mutation
1	TN	<i>TP53</i> p.R273P	<i>TP53</i> p.R273P (351.8 MM; 58.6 MM/mL)
4	TN	<i>TP53</i> p.R110Pfs*39, <i>TP53</i> p.R290Pfs*55, <i>TP53</i> p.R175H and <i>PIK3CA</i> p.R310H	<i>TP53</i> p.R110Pfs*39 (70.9 MM; 12.9 MM/mL), <i>TP53</i> p.R290Pfs*55 (NMD), <i>TP53</i> p.R175H (11.2 MM; 2.0 MM/mL)
5	HER2+	<i>TP53</i> p.R290Pfs*55	<i>TP53</i> p.R290Pfs*55 (259.5 MM; 89.9 MM/mL)
6	TN	<i>TP53</i> p.Q144*	<i>TP53</i> p.Q144* (90.9 MM; 15.1 MM/mL)
7	TN	<i>TP53</i> p.R110P	<i>TP53</i> p.R110P (1850.1 MM; 308.4 MM/mL)
9	TN	<i>TP53</i> p.R273L	<i>TP53</i> p.R273L (112.7 MM; 18.8 MM/mL)
10	HER2+	<i>TP53</i> p.V173L and <i>PIK3CA</i> p.H1047R	<i>TP53</i> p.V173L (NMD) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (4.6 MM; 0.8 MM/mL)
11	TN	<i>TP53</i> p.R175H	<i>TP53</i> p.R175H (15.3 MM; 7.7 MM/mL)
12	HER2+	<i>TP53</i> p.M237I and <i>PIK3CA</i> p.E542K	<i>TP53</i> p.M237I (13.7 MM; 6.9 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.E542K (39.2 MM; 19.6 MM/mL)
14	TN	<i>TP53</i> p.C176F	<i>TP53</i> p.C176F (67.2 MM; 11.2 MM/mL)
17	TN	<i>TP53</i> p.N131Tfs*39	<i>TP53</i> p.N131Tfs*39 (1168.5 MM; 194.8 MM/mL)
19	TN	<i>TP53</i> p.Y163*	<i>TP53</i> p.Y163* (58.5 MM; 9.7 MM/mL)
26	HER2+	<i>TP53</i> p.D281V and <i>PIK3CA</i> p.H1047R	<i>TP53</i> p.D281V (39.4 MM; 8.8 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (47.7 MM; 10.6 MM/mL)
28	TN	<i>TP53</i> p.R273H	<i>TP53</i> p.R273H (31.7 MM; 8.1 MM/mL)
29	HER2+	<i>TP53</i> p.K139_V143del	<i>TP53</i> p.K139_V143del (1.0 MM; 0.2 MM/mL)
30	HER2+	<i>TP53</i> p.R213*, <i>TP53</i> p.N131Tfs*39 and <i>PIK3CA</i> p.H1047R	<i>TP53</i> p.R213* (9.9 MM; 1.7 MM/mL), <i>TP53</i> p.N131Tfs*39 (NMD) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (13.3 MM; 2.2 MM/mL)
31	TN	<i>TP53</i> p.S127F	<i>TP53</i> p.S127F (2157.4 MM; 365.7 MM/mL)
32	HER2+	<i>NTRK1</i> p.Ser433Cys, <i>AKT3</i> p.Leu262Val, <i>NTRK3</i> p.Glu474Lys, <i>TP53</i> p.Glu285Lys, <i>ERBB2</i> p.Ile989Met, <i>GRM3</i> p.Asp97His and <i>GRM3</i> p.Arg101Thr	<i>NTRK1</i> p.Ser433Cys (NMD), <i>AKT3</i> L262V (1.3 MM; 0.2 MM/mL), <i>NTRK3</i> E474K (1.5 MM; 0.3 MM/mL), <i>TP53</i> E285K (2.7 MM; 0.5 MM/mL), <i>GRM3</i> D97H (2.3 MM; 0.4 MM/mL) and <i>GRM3</i> D101T (2.3 MM; 0.4 MM/mL)
33	TN	<i>TP53</i> A74fs and <i>FGF10</i> F146fs	<i>TP53</i> A74fs (12.2 MM; 3.4 MM/mL) and <i>FGF10</i> F146fs (8.1 MM; 2.3 MM/mL)
34	HER2+*	<i>FANCF</i> p.Leu241Arg and <i>TP53</i> c.375 + 1dupG	NMD

*Patient ID 34 had 90% of estrogen receptor-positive cells.
ctDNA, circulating tumor DNA; HER2+, human epidermal growth factor receptor 2 positive; MM, mutant molecules; NMD, no mutation detected; TN, triple negative.

false-negative case (patient 32), and three true-negative cases (patients 10, 26, and 31). This resulted in an accuracy of 89.5%, a false-positive rate of 3.8%, and a NPV of 75.0%.

Post-surgery ctDNA status and recurrence

To assess whether any of the 15 patients achieving cCR showed any detectable ctDNA during a surveillance period following surgery, blood

Table 2. Responses to NAC and results of the ctDNA analyses performed in the middle of and after the treatment.

Patient ID	cCR	Mid-NAC plasma	Pre-surgery plasma	pCR
1	Yes	NMD	NMD	Yes
4	Yes	NMD	NMD	Yes
5	Yes	<i>TP53</i> p.R290Pfs*55 (201.9 MM; 33.6 MM/mL)	NMD	Yes
6	Yes	NMD	NMD	Yes
7	No	NMD	<i>TP53</i> p.R110P (1 MM; 0.2 MM/mL)	Yes
9	Yes	NMD	NMD	Yes
10	No	NMD	NMD	No
11	Yes	<i>TP53</i> p.R175H (43.7 MM; 7.3 MM/mL)	NMD	Yes
12	Yes	NMD	NMD	Yes
14	Yes	NMD	NMD	Yes
17	Yes	NMD	NMD	Yes
19	No	NMD	NMD	No
26	No	<i>TP53</i> p.D281V (17.7 MM; 3.0 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (19.3 MM; 3.2 MM/mL)	<i>TP53</i> p.D281V (1.2 MM; 0.2 MM/mL) and <i>PIK3CA</i> p.H1047R (0.6 MM; 0.1 MM/mL)	No
28	Yes	NMD	NMD	Yes
29	Yes	<i>TP53</i> p.K139_V143del (0.6 MM; 0.1 MM/mL)	NMD	Yes
30	Yes	NMD	NMD	Yes
31	No	<i>TP53</i> p.S127F (2.0 MM; 0.3 MM/mL)	<i>TP53</i> p.S127F (5.5 MM; 1.0 MM/mL)	No
32	Yes	NMD	NMD	No
33	Yes	NMD	NMD	Yes
34	Yes	NMD	NMD	Yes

Patients that did not achieve cCR are highlighted in boldface type. cCR, clinical complete response; ctDNA, circulating tumor DNA; MM, mutant molecules; NAC, neoadjuvant chemotherapy; NMD, no mutation detected; pCR, pathologic complete response.

collections from these patients were performed at three time points after surgery (4 weeks, 6 months, and 12 months) and ctDNA testing was performed using the same patient-specific tissue-informed SafeSEQ assays used to monitor each patient during NAC. As shown in Table 4, in 40 samples collected from these 15 patients, none showed any

detectable ctDNA at any point during the 12-month follow-up period. In addition, no ctDNA was detected after 24 months of follow-up in 13 out of 15 patients (two patients were not available for blood collection; data not shown) achieving cCR, and none of these patients were found to have recurrent disease. Only two patients

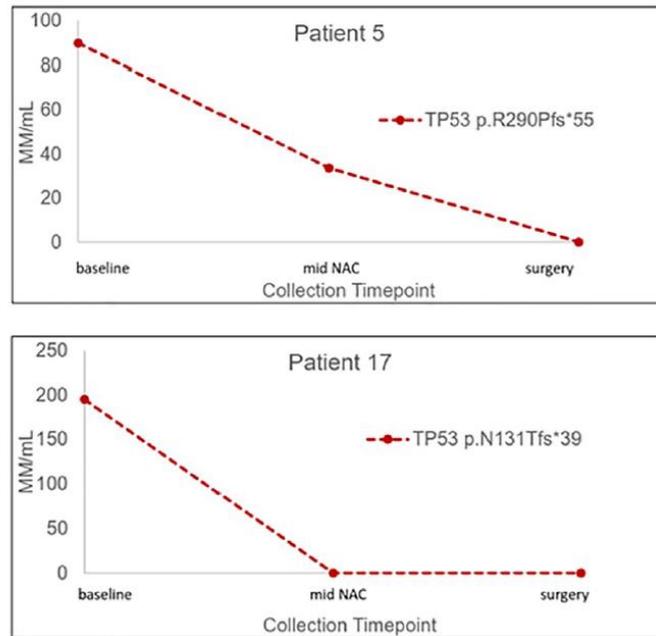


Figure 2. Representative plots of longitudinal ctDNA tracking. Two patients (patients 5 and 17) showed complete clearance of *TP53* mutations in plasma before surgery, which associated with cCR to NAC. cCR, clinical complete response; ctDNA, circulating tumor DNA; NAC, neoadjuvant chemotherapy.

Table 3. Performance of the status of ctDNA and cCR in predicting pCR after NAC.

Measure	
Accuracy	89.5%
False-positive rate	3.8%
PPV	93.3%
NPV	75.0%

cCR, clinical complete response; ctDNA, circulating tumor DNA; NPV, negative predictive value; pCR, pathologic complete response; PPV, positive predictive value.

experienced recurrent disease after longer clinical follow-up: patient 7 (time until recurrence, 22 months), who did not achieve cCR and had a ctDNA-positive result after NAC, and patient 10 (time until recurrence, 27 months), who did not achieve neither cCR nor pCR, but had NMD after NAC. Unfortunately, these two patients were not available for any follow-up blood collection to undergo ctDNA testing during the 12-month follow-up period after surgery. However, blood samples were obtained in patients 7 and 10 after recurrence, and ctDNA testing revealed the same

ctDNA mutations detected during NAC. Both patients showed a significant increase in ctDNA, with patient 7 presenting the *TP53* p.R110P mutation at 397.7 MM/ml, and patient 10 presenting both *TP53* p.V173L (8.4 MM; 1.5 MM/ml) and *PIK3CA* p.H1047R (6.9 MM; 1.2 MM/ml) mutations. It was unfortunate that these patients were unavailable for ctDNA surveillance monitoring during the period shortly after surgery when positive detection of these mutations might have provided an early signal of recurrent disease.

Discussion

The effectiveness of NAC treatment regimens for BC has improved during recent years and has achieved high rates of pCR, particularly in HER2+ and TN tumors.^{24,25} These observations have prompted the notion that patients that achieve cCR following NAC might be spared breast surgery, as forgoing surgery would potentially reduce surgical complications, improve quality of life, and decrease healthcare costs. This idea of de-escalation of breast surgery in BC patients with an apparent complete response to NAC is gaining recognition as an alternative approach to patient management. However, there are current challenges with accurately determining the status of

Table 4. Surveillance ctDNA testing results for the 15 BC patients achieving cCR after NAC*.

Patient ID	10 weeks after surgery	6 months after surgery	12 months after surgery
1	NMD	NMD	NMD
4	NMD	NMD	NMD
5	NMD	NMD	NMD
6	NMD	NMD	NMD
9	NMD	NMD	NMD
11	NMD	NMD	NMD
12	NMD	NMD	NMD
14	NMD	NA	NMD
17	NMD	NA	NA
28	NMD	NMD	NMD
29	NMD	NMD	NMD
30	NMD	NMD	NMD
32	NMD	NMD	NMD
33	NMD	NMD	NA
34	NMD	NMD	NA

*All but one patient (patient 32) also achieved pCR.
BC, breast cancer; cCR, clinical complete response; ctDNA, circulating tumor DNA; MM, mutant molecules; NA, patient sample not available; NAC, neoadjuvant chemotherapy; NMD, no mutation detected; pCR, pathologic complete response.

residual disease at the end of neoadjuvant treatment using the current clinico-radiological evaluations or image-guided biopsy techniques.^{8,9,26} Therefore, surgery after NAC is still considered the standard of care for primary BC, either to completely remove residual disease in non-pCR cases or to confirm a pCR.

In this pilot study, we identified certain HER2+ and TN BC patients showing clearance of ctDNA mutations as a potential correlate of complete response to NAC. In fact, 14 out of 15 patients meeting the criteria of absence of plasma mutations plus cCR based on clinical examination and imaging assessment had a proven pCR according to the histopathological evaluation of the surgical specimen (PPV=93.3%). This observation leads to the tenable conclusion that these patients could have safely avoided breast surgery after NAC. Moreover, the patient that achieved cCR, but did not achieve a pCR (patient 32) did not showed detectable ctDNA after NAC and did not experience disease recurrence during the follow-up

period, and furthermore did not present resurgence of tumor mutation in plasma. These observations are in accord with the conclusion that, in this patient, residual disease was minimal and did not spread to other organs before the surgery or disease was eliminated during NAC. With longer follow-up, an eventual reappearance of the patient's specific mutation in plasma ctDNA may indicate microscopic occult disease before its detection/visualization by imaging techniques.²⁷

In the future, if liquid biopsy negative results were considered as a correlate of pCR in the decision-making process, patients may not undergo surgery but instead would undergo an intensive follow-up (frequent imaging and/or liquid biopsy surveillance). In case of minimal residual disease, this might be addressed by radiotherapy and/or adjuvant treatment according to the standard practice. By contrast, patients that do not achieve cCR after NAC (five in our study; see patients ID in Table 3) should undergo breast surgery regardless of the presence or absence of plasma

mutations detected. Moreover, three of five patients not achieving cCR had plasma mutations detected prior to surgery, which has been associated with poorer prognosis,^{28,29} and, in fact, two on these patients (ID 7 and ID 10) relapsed. Regrettably, both of these patients were not available for ctDNA testing during the 4-week, 6-month, and 12-month follow-up period post-surgery, and both patients showed markedly increase ctDNA levels at 24 months after recurrence. Although patient 10 showed clearance of both *TP53* and *PIK3CA* mutations in ctDNA from baseline, the same mutations re-appeared after recurrence at 24 months. Similarly, patient 7 had NMD at mid-NAC but again the baseline mutation in the *TP53* gene was present at the end of the treatment. These observations raise the possibility that these mutations may indicate underlying resistance mechanisms of the tumor.³⁰

The detection of ctDNA in plasma regardless of achieving cCR and pCR in five cases prompts the need to rigorously establish a clinically relevant level of ctDNA that triggers heightened suspicion of molecular residual disease (MRD). Moreover, clinical ctDNA cutoffs that comprise qualitative judgments of ‘MRD positive’ versus ‘MRD negative’ are likely to require more sophisticated algorithms to be developed that integrate both patient-specific mutations, as well as sample-level tumor mutational burden to gain greater certainties of an individual patient’s risk of recurrence/relapse or cure in response treatment. In this study, we have provided a framework of longitudinal testing in a small cohort of BC patients to begin establishing a clinically relevant cutoff using SafeSEQ technology. Further trials with greater numbers of patients will be required to ascertain both the frequency of testing, qualitative result, and quantities of ctDNA that will serve of a useful adjunct to determine both disease clearance and risk of disease recurrence. In managing the patient using ctDNA results, it will be critical to establish both durability of neoadjuvant response by determining consistency of negative ctDNA test results as well as a higher risk of recurrence triggered by consecutive positive and ascending values of ctDNA in plasma. Here, the serial sampling after the surgery was reassuring, as none of these five patients experienced elevations of ctDNA levels during the follow-up. Interpretation of the results at exceedingly low levels of ctDNA of detection should be done with caution, and bearing in mind that SafeSEQ is an ultra-sensitive technique able to detect as few as three mutants in 20,000 total DNA molecules²²

Accordingly, the overall percent agreement between tissue and plasma mutations in this study was 95%, much higher than the observed with other techniques,^{31,32} even when low levels of ctDNA are usually not detectable in early disease.³³ Another explanation for the presence of low levels of (clinically irrelevant) mutant molecules could be the occurrence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential, which has been reported to be frequent for the *TP53* gene.^{34,35}

The results of this pilot study should be interpreted within the context of its strengths and limitations. An important limitation of this study is its small sample size, although this patient cohort is fairly representative of a typical neoadjuvant population. A second limitation of this study is that the post-surgery follow-up time was restricted to 12 months, so it is not possible to rule out any other potential recurrence in the future, as the recurrence window of HER2+ and TN BC is estimated to be 5 years, or even more in the case of luminal tumors.³⁶ Given these limitations (only two patients had recurred at the writing of this manuscript), ctDNA levels could not be assessed as a prognostic factor for recurrence. In addition, we were unable to perform post-surgery surveillance blood testing of all patients and at all of the scheduled time points during the follow-up.

In summary, the SafeSEQ NGS technology identified 19/20 (95%) of BC patients with detectable mutations in plasma at baseline, enabling the vast majority of patients to be tracked *via* liquid biopsy during NAC. Clearance of ctDNA positivity and achieving cCR after NAC had favorable correlation with effective pathological response. Moreover, the presence of clearly detectable ctDNA levels is likely to be associated with the lack of clinical/pathological complete response in BC patients. These findings prompt further studies with larger patient cohorts to investigate the added value of ctDNA to predict pCR, aiding in determining which patients might be safely spared surgery after NAC. If this strategy is confirmed to be clinically useful, an approach of ‘watch and wait’ (including serial plasma testing) could be implemented in selected minimal-risk patients.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the medical ethical committee of the Hospital Universitario

Vall d'Hebron on 30/09/2016 (ID PR(AG) 204/2016). All patients provided written informed consent.

Consent for publication

All authors have read the manuscript and approved its submission to Therapeutic Advances in Medical Oncology.

Author contribution(s)

Nikaoly Ciriaco: Conceptualization; Data curation, Formal analysis; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Esther Zamora: Conceptualization; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Santiago Escrivá-de-Romaní: Conceptualization; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Ignacio Miranda Gómez: Data curation; Writing – original draft; Writing – review & editing.

José Jiménez Flores: Data curation.

Cristina Saura: Conceptualization; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Hillary Sloane: Formal analysis; Methodology; Writing – original draft.

Anna Starus: Formal analysis; Methodology; Writing – original draft.

Johannes Fredebohm: Formal analysis; Methodology; Writing – review & editing.

Lucy Georgieva: Formal analysis; Methodology; Writing – original draft.

Graham Speight: Formal analysis; Methodology; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Frederick Jones: Conceptualization; Methodology; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Santiago Ramón y Cajal: Writing – original draft; Writing – review & editing.

Martín Espinosa-Bravo: Conceptualization; Data curation; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Vicente Peg: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Writing – original draft; Writing – review & editing.

Acknowledgements

The authors thank all the patients and their families who participated in this study. They thank Anabel Herrero, PhD, on behalf of Springer Healthcare Communications, for providing medical writing support for this manuscript. This medical writing assistance was funded by Sysmex Inostics, Inc.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by a grant from Sysmex Inostics, Inc. The sponsor coordinated data collection from study centers, and funded the statistical analysis and medical writing assistance.

Competing interests

E.Z. has received fees as consultant, participated in advisory boards or received travel grants from Roche/Genentech, Eisai Europe, and Daiichi Sankyo/AstraZeneca; S.E.R. has received fees as consultant, participated in advisory boards or had an investigator role from Daiichi Sankyo/AstraZeneca, Pfizer, Roche, Seagen, Byondis, Lilly, MedSIR, and Synthon; C.S. has served as consultant, participated in advisory boards or received travel grants from Byondis, AstraZeneca, Daiichi Sankyo, Eisai, Exact Sciences, Exeter Pharma, F. Hoffmann–La Roche Ltd, MediTech, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Philips, Pierre Fabre, Puma biotechnology, Sanofi-Aventis, SeaGen and Zymeworks; V.P. has received fees as consultant, participated in advisory boards or received travel grants from Sysmex, Roche, Merck Sharp & Dohme, AstraZeneca, Bayer and Exact Sciences.

The remaining authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Availability of data and materials

Data supporting the results presented in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID iDs

Nikaoly Ciriaco  <https://orcid.org/0000-0002-1151-554X>

Esther Zamora  <https://orcid.org/0000-0002-2233-367X>

Santiago Escrivá-de-Romaní  <https://orcid.org/0000-0001-7816-7589>

José Jiménez Flores  <https://orcid.org/0000-0002-2576-1776>

Vicente Peg  <https://orcid.org/0000-0002-5203-6166>

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. 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. Ataseven B and von Minckwitz G. The impact of neoadjuvant treatment on surgical options and outcomes. *Ann Surg Oncol* 2016; 23: 3093–3099.
3. Spring LM, Fell G, Arfe A, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and survival: a comprehensive meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2020; 26: 2838–2848.
4. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6622–6628.
5. Kuerer HM, Rauch GM, Krishnamurthy S, et al. A clinical feasibility trial for identification of exceptional responders in whom breast cancer surgery can be eliminated following neoadjuvant systemic therapy. *Ann Surg* 2018; 267: 946–951.
6. Mamounas EP. Omitting surgery in complete responders after neoadjuvant chemotherapy: the quest continues. *Ann Surg Oncol* 2018; 25: 3119–3122.
7. Heil J, Kuerer HM, Pfof A, et al. Eliminating the breast cancer surgery paradigm after neoadjuvant systemic therapy: current evidence and future challenges. *Ann Oncol* 2020; 31: 61–71.
8. Schaeffgen B, Mati M, Sinn HP, et al. Can routine imaging after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer predict pathologic complete response? *Ann Surg Oncol* 2016; 23: 789–795.
9. Zhang K, Li J, Zhu Q, et al. Prediction of pathologic complete response by ultrasonography and magnetic resonance imaging after neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Cancer Manag Res* 2020; 12: 2603–2612.
10. Li Y, Zhou Y, Mao F, et al. The diagnostic performance of minimally invasive biopsy in predicting breast pathological complete response after neoadjuvant systemic therapy in breast cancer: a meta-analysis. *Front Oncol* 2020; 10: 933.
11. Alimirzaie S, Bagherzadeh M and Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: a comprehensive review. *Clin Genet* 2019; 95: 643–660.
12. Corcoran RB and Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. *N Engl J Med* 2018; 379: 1754–1765.
13. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61–70.
14. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 2015; 7: 302ra133.
15. McDonald BR, Contente-Cuomo T, Sammut S-J, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis to detect residual disease after neoadjuvant therapy in breast cancer. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaax7392.
16. Moss J, Zick A, Grinshpun A, et al. Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer. *Ann Oncol* 2020; 31: 395–403.
17. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 2643–2650.
18. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1199–1209.
19. Li S, Lai H, Liu J, et al. Circulating tumor DNA predicts the response and prognosis in patients with early breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *JCO Precis Oncol* 2020; 4: 244–257.
20. Radovich M, Jiang G, Hancock BA, et al. Association of circulating tumor DNA and circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy with disease recurrence in patients with triple-negative breast cancer: preplanned secondary analysis of the BRE12-158 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020; 6: 1410–1420.
21. Rodriguez BJ, Córdoba GD, Aranda AG, et al. Detection of TP53 and PIK3CA mutations in circulating tumor DNA using next-generation sequencing in the screening process for early breast cancer diagnosis. *J Clin Med* 2019; 8: 1183.
22. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 9530–9535.

23. Rago C, Huso DL, Diehl F, *et al.* Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res* 2007; 67: 9364–9370.
24. Hurvitz SA, Martin M, Symmans WF, *et al.* Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; 19: 115–126.
25. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, *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. *J Clin Oncol* 2015; 33: 13–21.
26. van Loevezijn AA, van der Noordaa MEM, van Werkhoven ED, *et al.* Minimally invasive complete response assessment of the breast after neoadjuvant systemic therapy for early breast cancer (MICRA trial): interim analysis of a multicenter observational cohort study. *Ann Surg Oncol* 2021; 28: 3243–3253.
27. Mesquita A, Costa JL and Schmitt F. Utility of circulating tumor DNA in different clinical scenarios of breast cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 3797.
28. Chen Y-H, Hancock BA, Solzak JP, *et al.* Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy. *NPJ Breast Cancer* 2017; 3: 24.
29. Ortolan E, Appierto V, Silvestri M, *et al.* Blood-based genomics of triple-negative breast cancer progression in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *ESMO Open* 2021; 6: 100086.
30. Chen Z, Sun T, Yang Z, *et al.* Monitoring treatment efficacy and resistance in breast cancer patients via circulating tumor DNA genomic profiling. *Mol Genet Genomic Med* 2020; 8: e1079.
31. Madić J, Kiiäläinen A, Bidard F-C, *et al.* Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 2015; 136: 2158–2165.
32. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, *et al.* PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 150: 299–307.
33. Board RE, Wardley AM, Dixon JM, *et al.* Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 461–467.
34. Razavi P, Li BT, Brown DN, *et al.* High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med* 2019; 25: 1928–1937.
35. Ptashkin RN, Mandelker DL, Coombs CC, *et al.* Prevalence of clonal hematopoiesis mutations in tumor-only clinical genomic profiling of solid tumors. *JAMA Oncol* 2018; 4: 1589–1593.
36. Suppan C, Posch F, Mueller HD, *et al.* Patterns of recurrence after neoadjuvant therapy in early breast cancer, according to the residual cancer burden index and reductions in neoadjuvant treatment intensity. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 2492.

Visit SAGE journals online
[journals.sagepub.com/
 home/tam](https://journals.sagepub.com/home/tam)



