



Cátedra de Innovación
en Oncología de Precisión

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

IDIBAPS
Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Predicción de beneficio terapéutico en cáncer de mama avanzado receptor hormonal positivo y HER2 negativo

Memoria de tesis doctoral presentada por

Olga Martínez Sáez

Para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Director de la tesis

Dr. Aleix Prat Aparicio

Jefe del Servicio de Oncología Médica
del Hospital Clinic de Barcelona
Director de la Cátedra de Innovación en
Oncología de Precisión

Tutora de la tesis

Dra. Montserrat Muñoz Mateu

Consultora Sénior y Coordinadora de la
Unidad de Cáncer de Mama, Servicio de
Hospital Clinic de Barcelona

Programa de doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad de Barcelona

Barcelona, septiembre 2021

Aleix Prat Aparicio, doctorado en Medicina, Jefe de Servicio Oncología Médica del Hospital
Clinic de Barcelona y Director de la Cátedra de Innovación en Oncología de Precisión

CERTIFICA

Que la tesis doctoral con título "Predicción de Beneficio Terapéutico en Cáncer de Mama
Avanzado Receptor Hormonal Positivo y HER2 Negativo", presentada por Olga Martínez Sáez
ha sido realizada bajo su dirección.

Y tras valorar el trabajo realizado por la aspirante al Título de Doctor

AUTORIZA: Su presentación y defensa bajo el tribunal correspondiente.

Aleix Prat Aparicio

Director



Montserrat Muñoz Mateu

Tutora



Olga Martínez Sáez

Doctoranda



Barcelona, 23 de septiembre de 2021.

AGRADECIMIENTOS

A Álex, por ser la persona que más sufre las consecuencias de mi dedicación, quien a pesar de todo me entiende y apoya, por estar siempre, por rescatarme tantas veces.

A mis padres, por haberme transmitido la capacidad de ilusionarme con todo aquello en lo que me involucro, por vuestra capacidad infinita de amar. Sois mi pilar y mi guía.

A mis hermanas, Celia y Clara, mi mayor fortuna, mi todo, mi vida.

A mi abuela, por hacernos llegar su valentía, espíritu luchador e ilusión.

A mis chicas Valderribas, mis otras “dos hermanas”, Lara y Elisa, a las que tanto necesito a mi lado, por entenderme, apoyarme y quererme incondicionalmente.

A todos los que han hecho posible este trabajo: A Montse, que me acogió como una madre desde el primer día, haciéndome sentir como en casa. Gracias por tus sabios consejos. A Aleix, por confiar tanto en mí, por tu espíritu crítico y estímulo constante que me anima a querer aprender “*més més més*”. A Nuria, por haber estado a mi lado desde el principio. Gracias por tu apoyo en cada momento. A Anna, la mejor enfermera. Gracias por tu esfuerzo y tu cariño, eres increíble. Al resto del fantástico “*mama’s team*”, Maria, Barbara, Ceci y Rei, porque siempre me he sentido apoyada y respaldada por vosotros, por el ambiente que creáis y por hacerme sentir tan afortunada. A todo el equipo del lab, a Fara, gracias por tus ganas y motivación, por estar siempre dispuesta a enseñar y compartir. A Tomás, gracias por haberme guiado en los inicios y continuar echando cables en la distancia. A Francesco, por tu ayuda en cualquier momento en el que la he necesitado. A Débora, Patri, Víctor y resto de compañeros, por vuestra enorme predisposición, por hacer las cosas tan fáciles. A las chicas de AP, Esther y Blanca, siempre colaboradoras. A los compañeros del 12 de Octubre, Eva, Pablo y resto del equipo, a los compañeros del ICO de Can Ruti, Mireia, Eudald y demás miembros colaboradores, y a Cremona, por el enorme compromiso con los proyectos que compartimos. Es un lujo poder trabajar con vosotros.

Al servicio de Oncología Médica del Hospital Clinic: a Laura, por transmitirme la ilusión investigadora desde mi más tierna residencia. Hoy tengo la suerte de continuar aprendiendo, compartiendo y riendo contigo. A Neus, por tu cercanía, por tener siempre una sonrisa. A Adela, trabajadora incansable, este trabajo es también tuyo. A los juniors y resto del grupo de guardianes, por vuestro compañerismo. A todos los resis, por vuestra dedicación y ganas. A las secres, administrativos,

enfermeros y resto de compañeros del servicio, por crear sensación de unidad y construir un equipo del que me encanta formar parte.

A mis compañeros del Ramón en Madrid, donde descubrí mi amor por la oncología. Gracias por enseñarme e iniciarme en este camino. A Víctor, por compartir conmigo tu alegría (*passa pra lá!*), es una suerte seguir teniéndote a mi lado. A Alfonso, Gion, Cris, mi antiguo “*mama’s team*”, gracias por tantos buenos momentos, no me olvido de vosotros. A Pablo R., aunque haciéndome rabiar, siempre un apoyo. A Enrique, quien me inició en la senda de la investigación. Gracias por las oportunidades que me brindaste y por confiar en mi desde el primer momento. A los resis pequeños y mayores, a Gajate, mama Vanessa, Reyes, Mer, M.Ángeles, Elena, Javier, Piucha, Alfredo, Maru, Fede, Carmen, Ainara, Eva, y a todos los que fuisteis parte de mi formación como residente, de cada uno de vosotros he aprendido algo.

A mis ramones. ¡Qué afortunada fui! Ana, Marina, Pauli, Cris, Maria, Quique. Sabéis que tenéis un sitio en Barcelona.

A mis alicantinos: mis medikitas, Carmen, Ana y Amor, a las que llevo conmigo desde nuestros inicios en la facultad de medicina; Paco, desde Praga hasta siempre; y Ana y Ali, por casi 30 años juntas.

Por último, a todas las pacientes que han participado de forma tan generosa en este trabajo. Ellas son el sentido y motor de todo nuestro esfuerzo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS	6
INTRODUCCIÓN	9
1. Generalidades del cáncer de mama	9
1.1. Epidemiología.....	9
1.2. Diagnóstico y estadificación inicial	13
1.3. Subtipos inmunohistoquímicos.....	16
1.4. Subtipos intrínsecos y caracterización molecular	17
2. Biopsia líquida en cáncer de mama	25
2.1. Generalidades	25
2.2. Aplicaciones clínicas.....	29
2.3. Monitorización de la respuesta y dinámica precoz del ctDNA	33
3. Tratamiento del cáncer de mama	36
3.1. Cáncer de mama localizado	36
3.2. Cáncer de mama metastásico	39
4. Tratamiento del cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo y HER2 negativo.....	43
4.1. Terapia endocrina	43
4.2. Bases biológicas y desarrollo de resistencias a la terapia endocrina.....	44
4.3. Tratamiento dirigido para pacientes con tumores receptor hormonal positivo y HER2 negativo.....	48
4.4. Otros tratamientos aprobados	57
5. Biomarcadores en cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo y HER2 negativo.....	59
5.1. Biomarcadores predictores de beneficio a inhibidores de CDK4/6	59
5.2. Biomarcadores predictores de beneficio a inhibidores de PI3K	66
6. Estrategias futuras en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo y HER2 negativo	70
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	74
MÉTODOS Y RESULTADOS	77
Primer trabajo: <i>Circulating tumor DNA dynamics in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy.....</i>	79

Segundo trabajo: <i>Independent validation of circulating tumor DNA dynamics to predict survival in advanced hormone receptor positive/HER2-negative breast cancer treated with CDK4/6 inhibitors and endocrine therapy in a multicentric cohort</i>	86
Tercer trabajo: <i>Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer</i>	104
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	128
ANEXOS	131
1. Material suplementario asociado al primer trabajo	132
2. Material no publicado asociado al primer trabajo	143
3. Material suplementario asociado al tercer trabajo	147
4. Material no publicado asociado al tercer trabajo	149
BIBLIOGRAFÍA	153

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

AJCC	Comité Americano del Cáncer (del inglés, <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica (del inglés, <i>American Society of Clinical Oncology</i>)
Barcoding	Codificación de barras
BEAMing	Del inglés, <i>Beads, emulsion, amplification, magnetics</i>
CAP	Colegio Americano de Patólogos (del inglés, <i>College of American Pathologist</i>)
CBC	Hemograma (del inglés, <i>complete blood count</i>)
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas (del inglés, <i>cyclin dependent kinases</i>)
CEP17	Sonda de enumeración de cromosoma 17 (del inglés, <i>chromosome enumeration probe 17</i>)
cfDNA	AND libre circulante (del inglés, <i>cell-free DNA</i>)
Claudin-low	Bajo en claudina
Cluster	Grupo
CNV	Variación del número de copias (del inglés, <i>copy number variation</i>)
CT	Tomografía computerizada (del inglés, <i>computed tomography</i>)
CTCs	Células tumorales circulantes (del inglés, <i>circulating tumor cells</i>)
ctDNA	DNA tumoral circulante (del inglés, <i>circulating tumor DNA</i>)
DBD	Dominio de unión al DNA (del inglés, <i>DNA binding domain</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés, <i>desoxirribonucleic acid</i>)
EMA	Agencia Europea del Medicamento (del inglés, <i>European Medicines Agency</i>)
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica (del inglés, <i>European Society for Medical Oncology</i>)
ESMO-MCBS	Escala de magnitud de beneficio clínico de la ESMO (del inglés, <i>ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale</i>)
ESR1	Gen que codifica el receptor de estrógeno (del inglés, <i>estrogen receptor 1</i>)
dPCR	PCR digital (del inglés, <i>digital PCR</i>)
ddPCR	PCR digital en gotas (del inglés, <i>digital droplet PCR</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>)
Flare	Llamarada
HR	del inglés, <i>Hazard ratio</i>
Heatmap	Mapa de calor
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
KMT2D	Histona-lisina N-methyltransferasa 2D (del inglés, <i>histone-lysine N-methyltransferase 2D</i>)
Hot spot	Punto caliente
IC	Intervalo de confianza

ISH Hibridación *in situ* (del inglés, *in situ hybridization*)

LFTs Test de función hepática (del inglés, *liver function test*)

LHRH Hormona liberadora de la hormona luteinizante (del inglés, *luteinizing hormone-releasing hormone*)

MAPKs Proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*)

Microarray Chip de DNA o RNA

miRNA Micro RNA

mRNA Ácido ribonucleico mensajero (del inglés, *messenger ribonucleic acid*)

mTOR Diana de rapamicina de mamífero (del inglés, *mammalian target of rapamycin*)

mVAF VAF media

mVAFR media de la ratio de las VAF

mVAFR_log Logaritmo de la media de la VAFR

NCCN *National Comprehensive Cancer Network*

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

NOS No especificado de otra forma (del inglés, *not otherwise specified*)

p p-valor

PARP Poli ADP ribosa polimerasas (del inglés, *poly (ADP-ribose) polymerases*)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

PD Progresión de enfermedad (del inglés, *progressive disease*)

PD-L1 Ligando 1 de muerte programada (del inglés, *programmed death-ligand 1*)

PI3K Fosfoinositol 3-quinasa (del inglés, *phosphatidylinositol 3-Kinase*)

PIK3CA Subunidad catalítica alfa p110 de PI3K (del inglés, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*)

PIP2 Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (del inglés, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PIP3 Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (del inglés, *phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate*)

PR Respuesta parcial (del inglés, *partial response*)

RE Receptor de estrógeno

RECIST Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (del inglés, *response evaluation criteria in solid tumors*)

RH Receptor hormonal

RNA Ácido ribonucleico (del inglés, *ribonucleic acid*)

RP Receptor de progesterona

RTK Receptor tirosina quinasa (del inglés, *receptor tyrosine kinase*)

RT-qPCR PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés, *real time quantitative PCR*)

SD Enfermedad estable (del inglés, *stable disease*)

SERDs Degradadores selectivos del receptor de estrógeno (del inglés, *selective estrogen receptor degraders or downregulators*).

SERMs Moduladores selectivos del receptor de estrógenos (del inglés, *selective estrogen receptor modulators*).

Splicing Empalme

TCGA Atlas del genoma humano del cáncer (del inglés, *The Cancer Genome Atlas*)

TILs Linfocitos infiltrantes de tumor (del inglés, *tumor infiltrating lymphocytes*)

TNM Tumor, ganglios y metástasis (del inglés, *tumor, node and metastases*)

TSC1 Complejo de esclerosis tuberosa 1 (del inglés, *tuberous sclerosis complex 1*)

TSC2 Complejo de esclerosis tuberosa 2 (del inglés, *tuberous sclerosis complex 2*)

VAF Frecuencia de la variante alélica (del inglés, *variant allele frequency*)

VAFR Ratio de la VAF

WES Secuenciación del exoma completo (del inglés, *whole-exome sequencing*)

WGS Secuenciación completa del genoma (del inglés, *whole-genome sequencing*)

WHO Organización Mundial de la Salud (del inglés, *World Health Organization*)

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del cáncer de mama

1.1. Epidemiología

Desde el año 2020 el cáncer de mama es el carcinoma más frecuente en el mundo al superar al cáncer de pulmón. Se estima que ese año se diagnosticaron cerca de 2.3 millones de nuevos casos de cáncer de mama en todo el mundo, lo que supone el 11.7% del global de nuevos diagnósticos de cáncer considerando ambos sexos y el 24.5% en mujeres (**figura 1**) (1). Estas estimaciones no tienen en cuenta el impacto de la enfermedad por coronavirus durante 2019, ya que se basan en extrapolaciones de datos sobre el cáncer recopilados en años anteriores a la pandemia.

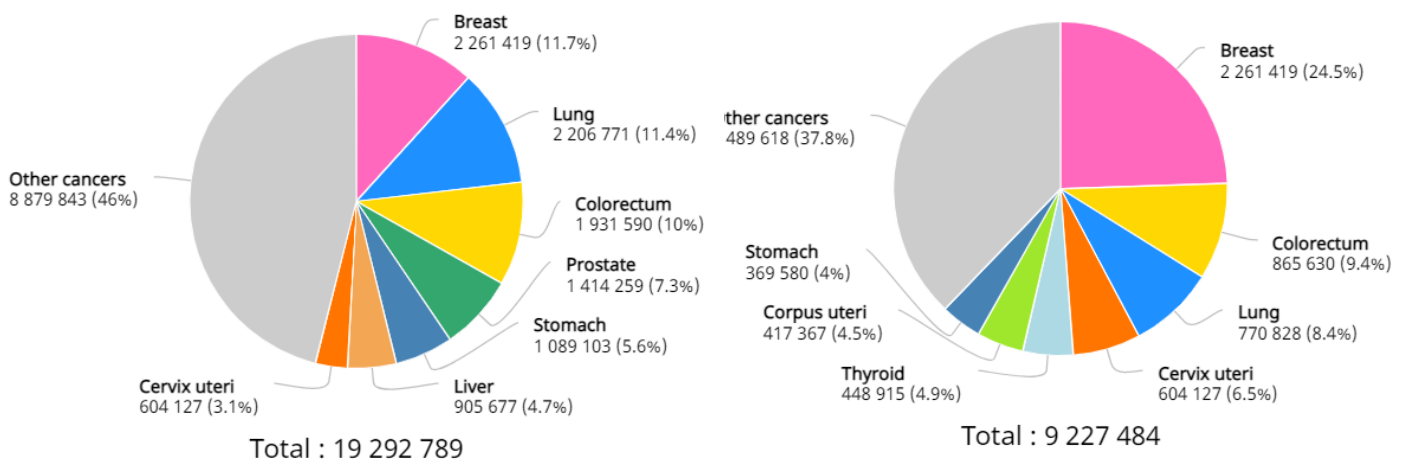


Figura 1. Distribución de los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Estimación para 2020 en ambos sexos a la izquierda y en mujeres a la derecha. Fuente: GLOBOCAN 2020 (1).

En 2020 el cáncer de mama fue la primera causa de muerte por cáncer en la mujer a nivel mundial, con casi 685 000 fallecimientos estimados (15.5% de todas las muertes por cáncer) y la quinta causa de muerte por cáncer en ambos sexos (6.9% de todas las muertes por cáncer) (**figura 2**) (1).

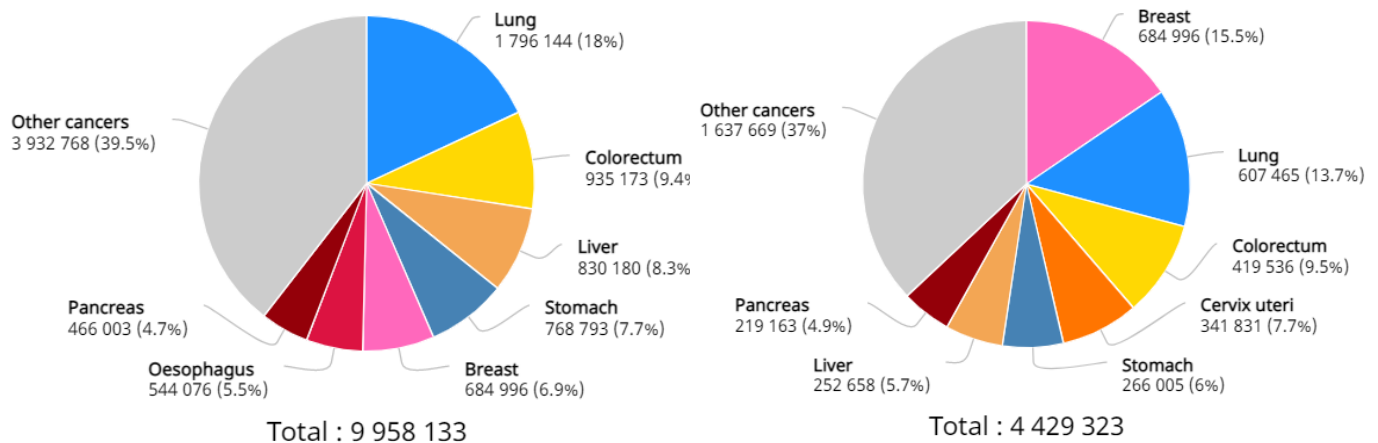


Figura 2. Estimación del número de fallecimientos por tumores en el mundo en 2020, ambos sexos a la izquierda y en mujeres a la derecha. Fuente: GLOBOCAN 2020 (1).

Las tasas de incidencia de cáncer de mama son un 88% más altas en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo (55.9 y 29.7 por 100 000 habitantes y año, respectivamente), con las mayores tasas (>80 por 100 000) en Australia/Nueva Zelanda, Europa Occidental, Norteamérica y el norte de Europa y las tasas más bajas en algunas regiones de Asia y África. Sin embargo, las mujeres que viven en países en vías de desarrollo tienen tasas de mortalidad un 17% más altas en comparación con las mujeres en países en desarrollados (15.0 y 12.8 por 100 000, respectivamente) (**figura 3**) (1). En España se estima que el cáncer de mama será el cáncer más frecuente diagnosticado en las mujeres en 2021 y el tercero considerando ambos sexos, solo por detrás del cáncer colorrectal y el de próstata, con 33 764 casos totales incidentes estimados (**figura 4**) y que producirá 6621 muertes (2).

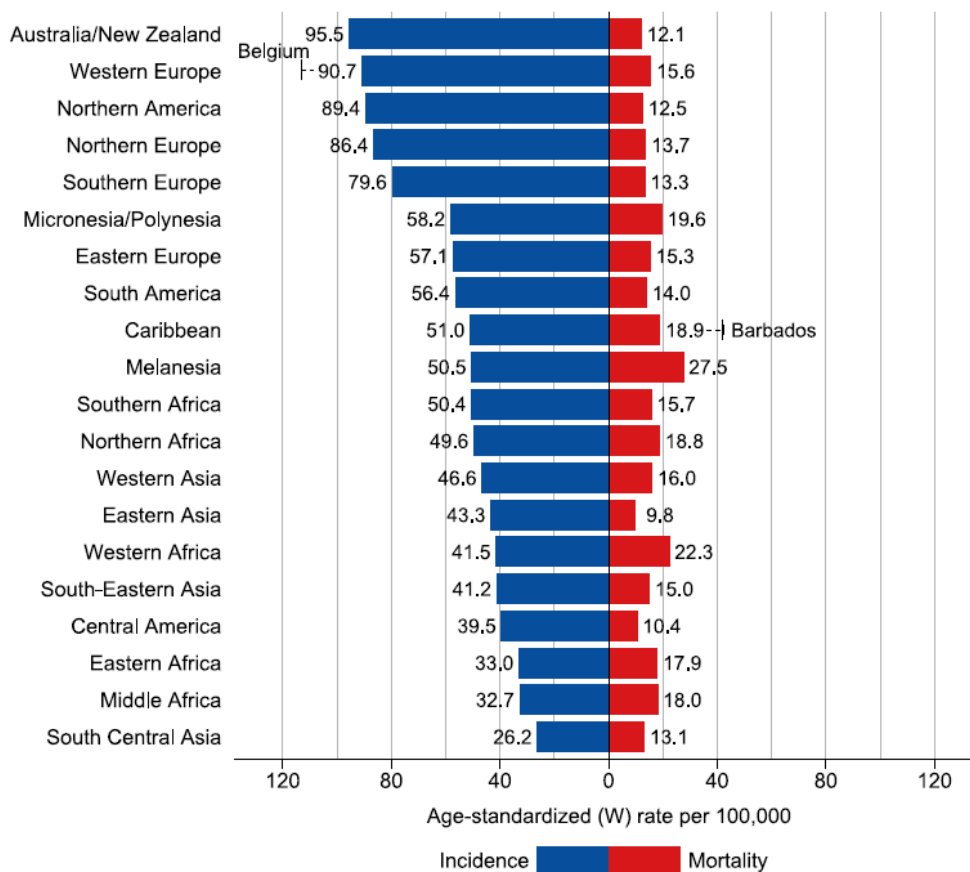


Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad específica de cáncer de mama por región mundial, estandarizadas por edad, en 2020. Fuente: GLOBOCAN 2020 (1).

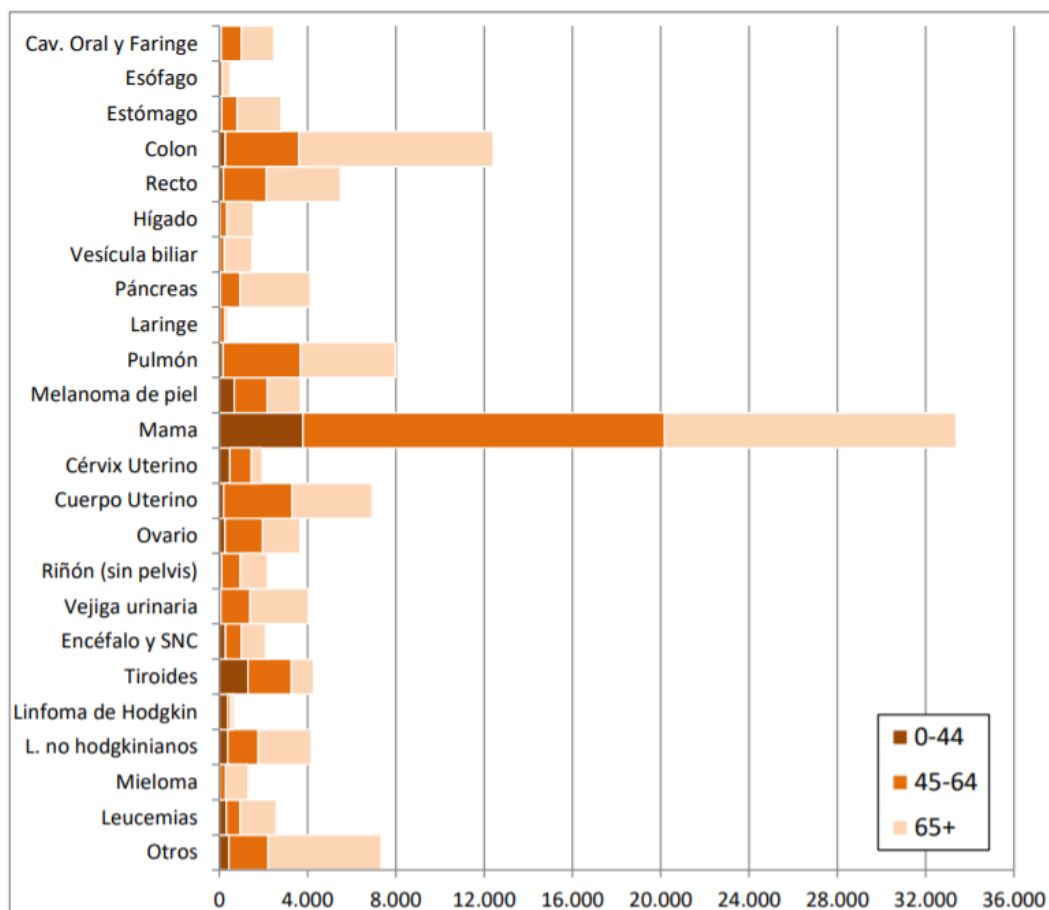


Figura 4. Número estimado de casos de cáncer incidentes por grandes grupos de edad (0-44, 45-64 y más de 65 años) y por tipo de cáncer en mujeres en España en 2021. Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (2).

Las elevadas tasas de incidencia en países con mayor índice de desarrollo humano reflejan una prevalencia más alta y prolongada de factores de riesgo hormonales (edad temprana en la menarquia, edad avanzada al primer nacimiento, menor número de hijos, menor frecuencia de lactancia materna, empleo de terapia hormonal sustitutiva postmenopáusica o de anticonceptivos orales) y de factores de riesgo relacionados con el estilo de vida (ingesta de alcohol, exceso de peso corporal, inactividad física), así como un aumento de detección mediante exámenes mamográficos de cribado y oportunistas (3,4).

En términos de prevalencia, el cáncer de mama es el cáncer más prevalente a nivel mundial en mujeres, con una prevalencia estimada a 5 años (personas diagnosticadas en los últimos 5 años y todavía vivas con o sin la enfermedad) de casi 8 millones de mujeres en 2020 en todo el mundo (5). En los países occidentales la prevalencia está aumentando debido tanto al aumento de la incidencia como a las mejoras terapéuticas que han conseguido un descenso en la mortalidad en los últimos años (6).

1.2 Diagnóstico y estadificación inicial

Para realizar un correcto diagnóstico y estadificación del cáncer de mama debe realizarse una exploración clínica completa junto con pruebas de imagen y confirmación anatomopatológica. Las pruebas de imagen incluyen una mamografía bilateral y ecografía mamaria y axilar. La resonancia magnética es la prueba de imagen más sensible pero su empleo no es obligatorio en todos los casos. Se recomienda sobre todo en pacientes con ganglios axilares positivos y cáncer de mama con primario oculto, carcinoma lobulillar, mamas densas, enfermedad de Paget del pezón, grandes diferencias entre la palpación y las pruebas de imagen convencionales, historia familiar de cáncer de mama hereditario, previo al inicio de un tratamiento sistémico neoadyuvante y ante la sospecha de multifocalidad/multicentricidad (7–9).

Además del estudio por imagen es necesaria una evaluación anatomopatológica del tumor primario mediante la realización de una biopsia con aguja gruesa, así como una valoración de los ganglios si hay sospecha de que se encuentren afectados mediante punción aspirativa con aguja fina o biopsia con aguja gruesa (7–9).

El diagnóstico patológico se realiza de acuerdo con la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization [WHO] Classification*) (10). Los dos subtipos histológicos de carcinoma infiltrante de mama más frecuentes son el carcinoma ductal (actualmente denominado NOS [*not otherwise specified*]), que supone el 70-75% de todos los casos y el carcinoma lobulillar (12-15%). Existen otros 18 subtipos que presentan rasgos morfológicos específicos y son mucho menos frecuentes (suponen del 0.5 al 5% del total) (10).

El informe patológico debe incluir la histología del tumor, el grado de diferenciación, la presencia o ausencia de carcinoma *in situ* y la evaluación por inmunohistoquímica del receptor de estrógenos (RE), del receptor de progesterona (RP) y del HER2, imprescindible para realizar una clasificación inmunohistoquímica de los carcinomas infiltrantes de mama con implicaciones terapéuticas (7–9,11). La valoración del estado del HER2 puede realizarse directamente mediante el estudio de la amplificación del gen HER2 con técnicas de hibridación *in situ* (*in situ hybridization [ISH]*), remplazando a las técnicas inmunohistoquímicas, o bien pueden determinarse por técnicas de ISH solo en los casos en los que la tinción inmunohistoquímica es equívoca (12). El estudio del receptor HER2 debe llevarse a cabo de acuerdo con las guías de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (*American Society of Clinical Oncology [ASCO]*) y el Colegio Americano de Patólogos (*College of American Pathologists [CAP]*) (12). El HER2 se define como positivo por inmunohistoquímica (3+) cuando más del 10% de las células presenta tinción completa e intensa de la membrana, y por ISH si el número de copias del gen HER2 es ≥ 6 , o la ratio HER2/*chromosome enumeration probe 17* (CEP17)

es ≥ 2 y las copias de HER2 ≥ 4 (12). Cuando la tinción inmunohistoquímica es completa pero moderada o débil en más del 10% de las células se considera que la tinción es equívoca (2+) y debe confirmarse la positividad mediante técnicas de ISH. La tinción se considera negativa cuando existe más del 10% de las células teñidas pero con intensidad débil o moderada e incompleta (1+) y también cuando menos del 10% de las células presentan tinción (0) (12).

Además del análisis de los tres receptores (RE, RP y HER2) se recomienda realizar un estudio inmunohistoquímico de marcadores de proliferación como el índice proliferativo medido por Ki67 que proporciona información clínica útil, especialmente si los valores son bajos o altos, y del grado histológico (grado I o bajo, II o medio y III o alto grado) (10,11,13,14).

El estudio inmunohistoquímico de los linfocitos infiltrantes de tumor (*tumor infiltrating lymphocytes* [TILs]) puede ser utilizado como marcador pronóstico y predictivo de respuesta en algunos subtipos tumorales, como en los tumores triple negativo, por lo que las guías de Consenso de St. Gallen recomiendan la determinación rutinaria en este subtipo (15).

La estadificación del cáncer de mama se realiza de acuerdo con la octava edición del sistema de estadificación de tumores, ganglios y metástasis (TNM) de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (tablas 1 y 2) (16).

Tabla 1. Clasificación clínica de la estadificación del cáncer de mama (8ª revisión del TNM) (16).

Tumor primario (T)
TX: Tumor primario no localizable
T0: No evidencia de tumor primario
Tis: Carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS) o enfermedad de Paget del pezón)
T1: Tumor ≤ 2 cm en el diámetro mayor
T1mic (Microinvasión): Tumor ≤ 0.1 cm en el diámetro mayor
T1a: Tumor > 0.1 cm y ≤ 0.5 cm en el diámetro mayor
T1b: Tumor > 0.5 cm y ≤ 1 cm en el diámetro mayor
T1c: Tumor > 1 cm y ≤ 2 cm en el diámetro mayor
T2: Tumor > 2 cm y ≤ 5 cm en el diámetro mayor
T3: Tumor > 5 cm en el diámetro mayor
T4: Tumor de cualquier tamaño que invada directamente la pared torácica y/o la piel (ulceración o nódulos cutáneos)
T4a: Extensión a la pared torácica (no incluye la invasión exclusiva del músculo pectoral)
T4b: Ulceración, nódulos satélites cutáneos o edema de piel (incluyendo piel de naranja)

<p>T4c: Presencia simultánea de T4a y T4b</p> <p>T4d: Carcinoma inflamatorio</p>
Ganglios linfáticos regionales (N)
<p>NX: Ganglios linfáticos regionales no evaluables (p.ej. resecados previamente)</p> <p>N0: No se detectan metástasis en los ganglios linfáticos regionales</p> <p>N1: Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales en niveles I y II, móviles</p> <p>N2: Metástasis en ganglios axilares linfáticos ipsilaterales en niveles I y II, fijos o indurados; o en ganglios linfáticos ipsilaterales en la cadena mamaria interna clínicamente detectables sin afectación de ganglios linfáticos axilares clínicamente evidentes</p> <p> N2a: Metástasis en ganglios linfáticos axilares tumefactos o fijos a otras estructuras</p> <p> N2b: Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales en la cadena mamaria interna sin afectación de ganglios linfáticos axilares clínicamente evidentes</p> <p>N3: Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales infraclaviculares (nivel III axilar) con o sin metástasis en ganglios linfáticos en nivel I y II axilar; o ganglios linfáticos en cadena mamaria interna detectados clínicamente con afectación de ganglios linfáticos axilares clínicamente evidentes en niveles I y II; o metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales con o sin afectación de ganglios linfáticos axilares o en la cadena mamaria interna</p> <p> N3a: Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares</p> <p> N3b: Metástasis en ganglios axilares de la cadena mamaria interna</p> <p> N3c: Metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares</p>
Metástasis a distancia (M)
<p>M0: No metástasis a distancia</p> <p>M1: Metástasis a distancia</p>

Tabla 2. Estadios según la clasificación TNM (8ª revisión) (16).

Estadio 0: Tis N0 M0
Estadio IA: T1 N0 M0
Estadio IB: T0-1 N1mic M0
Estadio IIA: T0-1 N1 M0; T2 N0 M0
Estadio IIB: T2 N1 M0; T3 N0 M0
Estadio IIIA: T0-3 N2 M0; T3 N1-2
Estadio IIIB: T4 N0-2 M0
Estadio IIIC: Cualquier T N3 M0
Estadio IV: Cualquier T Cualquier N M1

En el momento del diagnóstico aproximadamente el 63% de las pacientes presenta un estadio localizado, el 30% presenta afectación loco-regional y el 6%, enfermedad a distancia (**figura 5**) (17).

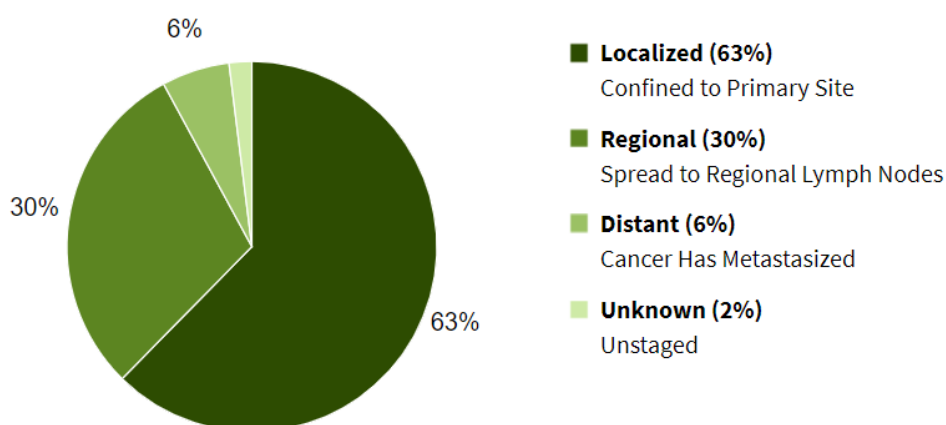


Figura 5. Porcentaje de casos por estadio al diagnóstico. Fuente: SEER 18 2010–2016 (18).

Dado el bajo riesgo de que la enfermedad sea metastásica al diagnóstico el estudio de extensión con TAC de tórax y abdomen y gammagrafía ósea y/o PET/TAC solo se recomienda, en general, en los casos con afectación ganglionar inicial o ante presencia de síntomas o alteraciones analíticas sospechosas (8).

1.3 Subtipos inmunohistoquímicos

El cáncer de mama es una enfermedad clínica y biológicamente heterogénea, su caracterización molecular está basada en la positividad o negatividad de los receptores hormonales, RE y RP, y del receptor HER2, que es utilizada actualmente para guiar el planteamiento terapéutico. Estos tres biomarcadores son pronósticos y predictivos de respuesta a las distintas terapias sistémicas, tanto en enfermedad localizada como metastásica (19,20). En función de su expresión el cáncer de mama puede dividirse en 3 grandes subtipos, tumores con receptor hormonal (RH) positivo y HER2 negativo (70% de las pacientes), tumores HER2 positivos, independientemente de la presencia o no de RH (15-20%) y tumores triple negativo, que presentan negatividad para la tinción de los tres receptores (15%) (21).

La presencia de RH es un marcador de buen pronóstico y predice un claro beneficio al tratamiento endocrino (19). La sobreexpresión o amplificación del receptor de HER2 se asocia a mayor agresividad y peor pronóstico sin tratamiento sistémico específico, pero gracias a la introducción de tratamientos anti-HER2 la supervivencia de las pacientes con de este subtipo tumoral se ha incrementado notoriamente (22). Los tumores triple negativo constituyen el subtipo de peor

pronóstico y presentan un alto riesgo de recaída en los primeros 3-5 años del diagnóstico en los estadios localizados (23).

En la enfermedad metastásica la mediana de supervivencia para los tumores RH positivo y HER2 negativo y para los HER2 positivo es de aproximadamente 5 años, mientras que se sitúa alrededor de un año para la enfermedad triple negativa (24–28).

1.4 Subtipos intrínsecos y caracterización molecular

Se ha observado que la heterogeneidad y complejidad biológica del cáncer de mama no queda completamente recogida por la clasificación en subtipos inmunohistoquímicos ni por el resto de las características clínicas (tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado, etc.), de manera que dos tumores con características clínico-patológicas similares pueden presentar muy diferente pronóstico y distinta respuesta a un mismo tratamiento. A pesar de ello, los factores clínico-patológicos siguen empleándose actualmente como guía para la selección terapéutica (p.ej., para la selección de tratamiento endocrino o terapia anti-HER2).

Sin embargo, desde el año 2000, los estudios iniciados por Charles M. Perou basados en el análisis de expresión génica tumoral (mRNA) han permitido una mayor comprensión biológica de este complejo escenario. La utilización de *microarrays* de DNA complementario en tejido tumoral congelado permitió la identificación de 4 subtipos moleculares "intrínsecos" de cáncer de mama (luminal A, luminal B, HER2-enriched y basal-like) y el grupo normal-like mediante el análisis jerárquico de agrupamiento (o de *clusters* en inglés) (**figura 6**) (29,30).

Los subtipos luminales A y B se distinguen en gran medida de los subtipos no luminales (HER2-enriched y basal-like) por la mayor expresión de vías dependientes de la regulación hormonal (p.ej. mayor expresión de *ESR1* [gen que codifica el RE], *GATA3* o *FOXA1*). A su vez, el subtipo luminal B frente al luminal A presenta una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación o el ciclo celular (p.ej., *MKI67* y *AURKA*) y no tan alta expresión de genes hormonales. El subtipo HER2-enriched se caracteriza por una alta expresión de genes regulados por HER2 (p. ej., *ERBB2*, *GRB7* y *FGFR4*) y genes relacionados con la progresión del ciclo celular junto con una expresión intermedia de genes asociados con las características luminales y baja expresión de genes basales (p.ej. *KRT5* y *FOXC1*). El subtipo basal-like se caracteriza por la alta expresión de genes proliferativos y basales, expresión intermedia de genes relacionados con HER2 y muy baja expresión de genes luminales. El subtipo normal-like se caracteriza por la alta expresión de genes típicos de células epiteliales y adiposas y baja expresión de genes característicos de células epiteliales luminales (**figura 6**) (31,32).

Estos subgrupos tumorales, conocidos como los "subtipos intrínsecos de cáncer de mama", han revelado diferencias críticas en incidencia, supervivencia y respuesta a tratamientos que amplían y complementan la información proporcionada por los marcadores clínico-patológicos clásicos previamente descritos (**figura 7**) (29,31–37).

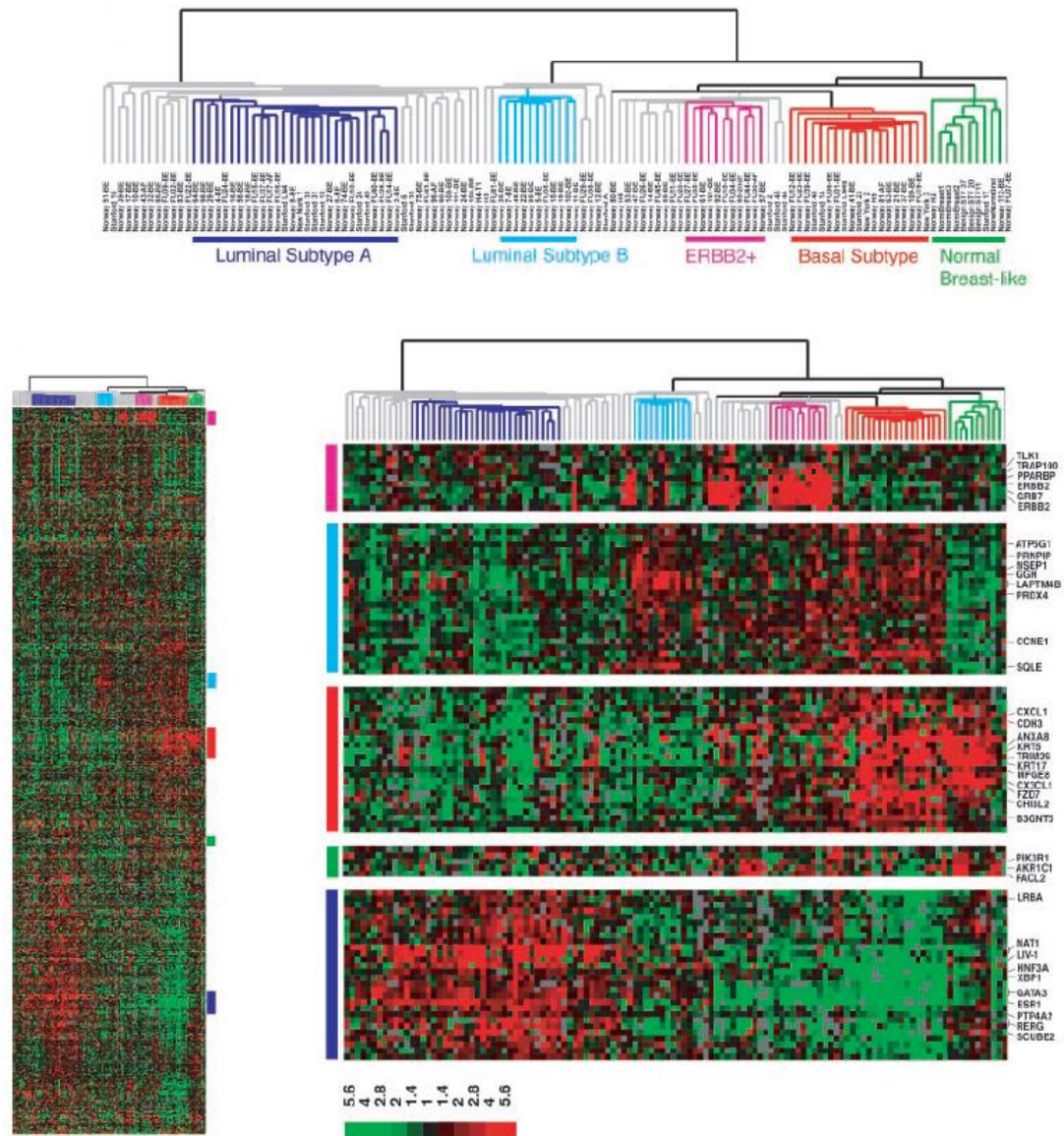


Figura 6. Dendrograma que muestra el análisis de *cluster* jerarquizado con la identificación de los 4 subtipos intrínsecos de cáncer de mama y el grupo normal-like, y el *heatmap* donde se observa la expresión relativa de los distintos genes (filas) para cada muestra tumoral (columnas). El rojo representa alta expresión del gen y el verde, baja. Imagen adaptada de Sorlie et al. (30).

Con la evolución de los estudios genómicos probablemente se desarrollarán nuevas subclasificaciones de los tumores de mama en entidades moleculares adicionales, como ha sucedido con el subtipo *claudin-low* (bajo en claudina), identificado hace unos años. Este nuevo subtipo

identifica tumores triple negativo que presentan típicamente diferenciación metaplásica y medular y propiedades biológicas de células iniciadoras de tumores (35,38).

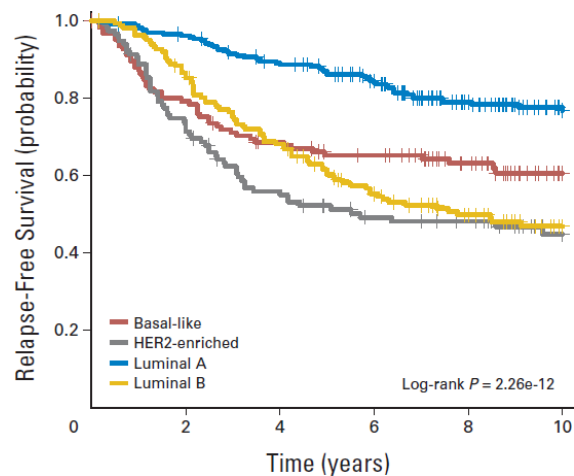


Figura 7. Probabilidad de recaída a distancia según el subtipo intrínseco en una cohorte de 710 pacientes con cáncer de mama localizado, sin ganglios afectados y sin tratamiento adyuvante sistémico. Imagen obtenida de Bernard et al. (31).

El estudio del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, del inglés, *The Cancer Genome Atlas*) ha puesto de manifiesto la importancia de la caracterización del cáncer de mama en los mencionados subtipos con cerca de 500 tumores primarios de mama extensamente estudiados a nivel de DNA (metilación, variaciones del número de copias (en inglés, *copy number variations* [CNV]), mutaciones somáticas y germinales), RNA (miRNA y expresión de RNA) y proteínas (**tabla 1**) (39). En este estudio el análisis de *cluster* mostró la presencia de 4 entidades principales de cáncer de mama que estaban muy bien recapituladas por los 4 subtipos intrínsecos principales, tal como quedan definidas solo por la expresión del mRNA (**figura 8**). En conjunto estos resultados sugieren que los subtipos intrínsecos capturan gran parte de la diversidad biológica que ocurre en el cáncer de mama (39).

Tabla 1. Resumen de las principales características genómicas y proteómicas en los 4 subtipos intrínsecos en el estudio del TCGA. Tabla obtenida de *The Cancer Genome Atlas Network* (39).

	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2E
% ER+/HER2-	87%	82%	10%	20%
% HER2+	7%	15%	2%	68%
% TNBC	2%	1%	80%	9%
p53 Pathway	TP53 mut (12%) Gain of MDM2 (14%)	TP53 mut (32%) Gain of MDM2 (31%)	TP53 mut (84%) Gain of MDM2 (14%)	TP53 mut (75%) Gain of MDM2 (30%)
PIK3CA/PTEN Pathway	PIK3CA mut (49%) PTEN mut/loss (13%) INPP4B loss (9%)	PIK3CA mut (32%) PTEN mut/loss (24%) INPP4B loss (16%)	PIK3CA mut (7%) PTEN mut/loss (35%) INPP4B loss (30%)	PIK3CA mut (42%) PTEN mut/loss (19%) INPP4B loss (30%)
RB1 Pathway	Cyclin D1 amp (29%) CDK4 gain (14%) Low expression of CDKN2C High expression of RB1	Cyclin D1 amp (58%) CDK4 gain (25%)	RB1 mut/loss (20%) Cyclin E1 amp (9%) High expression of CDKN2A Low expression of RB1	Cyclin D1 amp (38%) CDK4 gain (24%)
mRNA Expression	High ER cluster Low proliferation	Lower ER cluster High proliferation	Basal signature High proliferation	HER2 amplicon signature High proliferation
Copy Number	Most diploid Many with quiet genomes 1q, 8q, 8p11 gain 8p, 16q loss 11q13.3 amp (24%)	Most aneuploid Many with focal amps 1q, 8q, 8p11 gain 8p, 16q loss 11q13.3 amp (51%) 8p11.23 amp (28%)	Most aneuploid High genomic instability 1q, 10p gain 8p, 5q loss MYC focal gain (40%)	Most aneuploid High genomic instability 1q, 8q gain 8p loss 17q12 focal ERBB2 amp (71%)
DNA Mutations	PIK3CA (49%) TP53 (12%) GATA3 (14%) MAP3K1 (14%)	TP53 (32%) PIK3CA (32%) MAP3K1 (5%)	TP53 (84%) PIK3CA (7%)	TP53 (75%) PIK3CA (42%) PIK3R1 (8%)
DNA Methylation		Hyper-methylated phenotype for subset	Hypo-methylated	
Protein Expression	High Estrogen-signaling High cMYB RPPA reactive subtypes	Less Estrogen-signaling High FOXM1 and cMYC RPPA reactive subtypes	High expression of DNA repair proteins, PTEN and INPP4B loss signature (p-AKT)	High protein and phospho-protein expression of HER1 and HER2

*Porcentajes basados en 466 tumores.

DNA, deoxyribonucleic acid; ER, estrogen receptor; HER2E, human epidermal growth factor receptor 2-enriched; mRNA, messenger ribonucleic acid; TNBC, triple negative breast cancer.

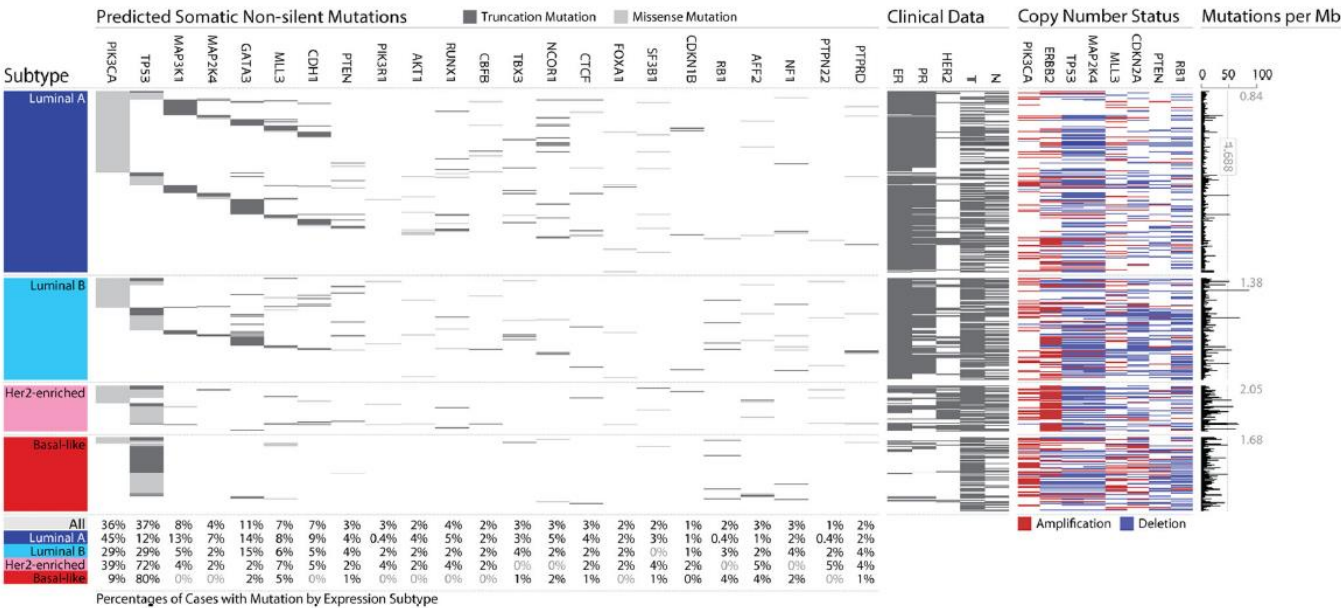


Figura 8. Genes significativamente mutados en cáncer de mama en función del subtipo intrínseco y correlación con características genómicas y clínicas. Imagen obtenida de *The Cancer Genome Atlas Network* (39).

En el estudio del TCGA se observó que a nivel de DNA los tumores con subtipo luminal A son los que muestran un menor número de mutaciones en el genoma y los HER2-enriched y basal-like, los que más. Los tumores luminales se caracterizan por presentar alta frecuencia de mutaciones en *PIK3CA*, superior en los luminales A que en los B (45% frente a 29%) y alteraciones de genes implicados en el ciclo celular, como amplificación de la ciclina D1 (*CCND1*) o de la quinasa dependiente de ciclina 4 (*CDK4*), ambos eventos algo más habituales en los luminales B que en los A (58% frente a 29%, y 25% frente a 14%, respectivamente). En comparación con los luminales B, los luminales A presentan en general menor número de CNV, menor frecuencia de mutaciones en *TP53* (12% frente a 29%), más mutaciones en *MAP3K1* (13% frente a 5%) y similar frecuencia de mutaciones en *GATA3* (14% frente a 15%). Los tumores luminales característicamente retienen la funcionalidad de retinoblastoma (*RB1*), lo que tiene implicaciones terapéuticas. En contraposición, *RB1* se encuentra mutado o se pierde hasta en el 20% de tumores basal-like (39).

El subtipo basal-like es el segundo en cuanto al número de mutaciones en el genoma, se encuentra con frecuencia hipometilado y presenta mutaciones en *TP53* hasta en el 80% de los casos, con menor frecuencia de mutaciones en *PIK3CA* que el resto de los subtipos (9%). La amplificación/sobreexpresión de *HER2* aparece entre el 2-17% de los tumores basal-like (39).

Finalmente, el subtipo HER2-enriched se caracteriza por presentar la más alta proporción de mutaciones a lo largo del genoma y un patrón híbrido con alta frecuencia de mutaciones en *TP53* (72%) y también en *PIK3CA* (39%). Por otro lado, los tumores HER2-enriched presentan una alta frecuencia de mutaciones asociadas con APOBEC3B. APOBEC3B es un subtipo de citidina deaminasa que convierte la citosina en uracilo y que se ha implicado como el origen de mutaciones en numerosos cánceres (40–42).

En 2009 Parker et al. desarrollaron un test predictor del subtipo intrínseco para ser aplicado clínicamente denominado PAM50 que, utilizando RT-qPCR primero, y luego la plataforma de nCounter, desde RNA de tejido parafinado, identifica de manera robusta a los principales subtipos intrínsecos mediante la medición cuantitativa de la expresión de 50 genes (**figura 9**) (31).

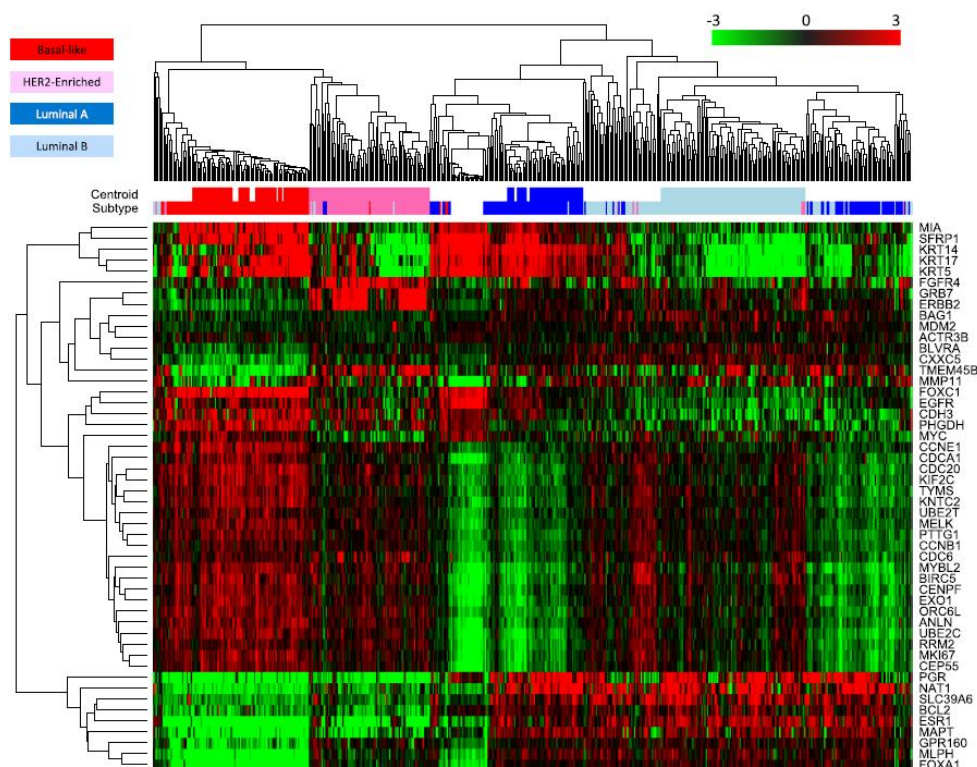


Figura 9. Análisis de *clusters* con los 50 genes del test PAM50 que identifica los 4 subtipos intrínsecos. Imagen obtenida de Bernard et al. (31).

Actualmente el test PAM50 se realiza utilizando la tecnología nCounter® Analysis System (NanoString®, Seattle) y se emplea en la práctica clínica con el nombre comercial de Prosigna®. El test Prosigna®, además de informar sobre el subtipo intrínseco tumoral, proporciona el riesgo de recaída a distancia a 10 años y se emplea en la práctica clínica para ayudar en la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con tumores con RH positivo y HER2 negativo en estadios localizados (43,44).

Sin embargo, no siempre es posible disponer de esta información en todas las pacientes debido a los costes y la accesibilidad, por lo que los subtipos intrínsecos han tratado de ser identificados a través de definiciones subrogadas basadas en el estudio patológico rutinario de los receptores hormonales, el HER2, el grado y el Ki67 que siempre se encuentran disponibles.

Desde 2011 la Conferencia de Consenso de St. Gallen para la toma de decisiones en el cáncer de mama precoz ha establecido unos criterios según los cuales se clasifican los tumores de mama en 4 grupos subrogados de los 4 subtipos intrínsecos (luminal A-like, luminal B-like, HER2-positivo y triple negativo) (**tabla 2**) (45,46).

Tabla 2. Definición subrogada de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Adaptado del Consenso de Expertos de St. Gallen 2013 sobre tratamiento del cáncer de mama precoz (46).

Subtipo intrínseco	Definición clínico-patológica subrogada
Luminal A	“Luminal-A like” Debe cumplir todos los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • RE y RP positivos • HER2 negativo • Ki67 “bajo”^a • Riesgo de recurrencia “bajo” determinado por plataformas de expresión génica (si disponibles)
Luminal B	“Luminal-B like (HER2-negativo)” <ul style="list-style-type: none"> • RE positivo • HER2 negativo • Y al menos uno: <ul style="list-style-type: none"> ○ Ki67 “alto”^a ○ RP negativo o “bajo”^b ○ Riesgo de recurrencia “alto” determinado por plataformas de expresión génica (si disponibles) “Luminal-B like (HER2-positivo)” <ul style="list-style-type: none"> • RE positivo • HER2 positivo • Cualquier RP • Cualquier Ki67
HER2-enriched	“HER2 positive” <ul style="list-style-type: none"> • HER2 positivo • RE y RP negativos
Basal-like	“Triple negative” <ul style="list-style-type: none"> • RE y RP negativos • HER2 negativo

^a En general se acepta el punto de corte $\geq 20\%$ para definir “alto”, aunque existe discrepancia y también se ha sugerido el punto de corte de 14% en algunos estudios (47).

^b $< 20\%$ (48).

Sin embargo, aunque existe una relativa concordancia entre los subtipos intrínsecos y los subtipos clínico-patológicos definidos por inmunohistoquímica, el solapamiento está lejos de ser perfecto. Por ejemplo, se ha observado que alrededor de un 10-20% de los tumores RH positivo y HER2 negativo no son luminal A o B por PAM50, sino basal-like o HER2-enriched (tumores no luminales) (**figura 10**) (49,50). Clínicamente, los subtipos RH positivo y HER2 negativo no luminales se asocian con una baja sensibilidad endocrina y un mal pronóstico tanto en el contexto temprano como en el metastásico. En contraposición, se ha observado que los tumores no luminales son altamente quimio-sensibles y consiguen mayores tasas de respuesta completa patológica en los estudios de neoadyuvancia con quimioterapia que los tumores luminales (51–53).

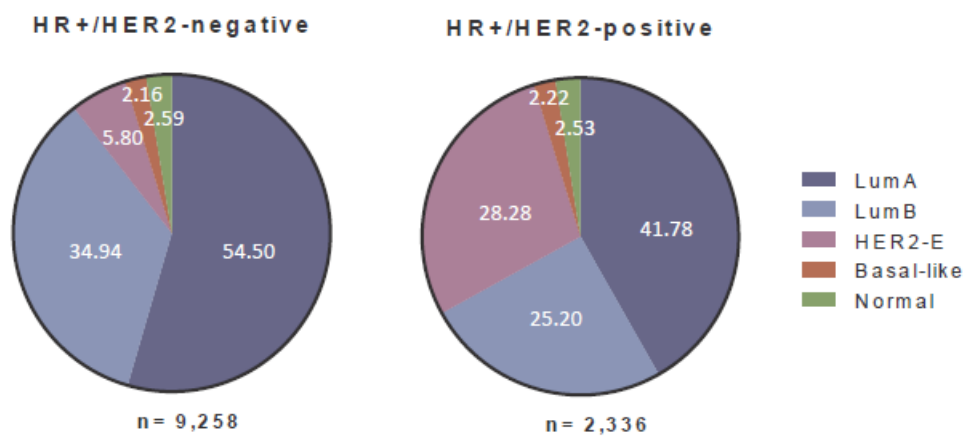


Figura 10. Distribución por subtipos intrínsecos de tumores de mama localizados, RH positivo y HER2 negativo (a la izquierda), y RH positivo y HER2 positivo (a la derecha). Imagen obtenida de Cejalvo et al. (54). HER2-E; HER2-enriched.

2. Biopsia líquida en cáncer de mama

2.1 Generalidades

La biopsia de tejido tumoral es el método estándar para el diagnóstico del cáncer y para el estudio molecular que guía las decisiones terapéuticas. Sin embargo, las biopsias no están exentas de complicaciones, que pueden suceder hasta en el 15% de los procedimientos, y en un porcentaje no despreciable no resultan rentables por la imposibilidad de obtener suficiente material (10-30% de los casos) (55,56). En contraposición a la biopsia de tejido, la biopsia líquida, y en concreto el estudio del DNA tumoral circulante (ctDNA, del inglés, *circulating tumor DNA*), ha cobrado especial interés como método mínimamente invasivo que complementa, o incluso en algunos casos sustituye, a la biopsia tisular (57).

El término biopsia líquida hace referencia al aislamiento de material derivado del tumor (DNA, RNA, células tumorales circulantes [CTCs, del inglés, *circulating tumor cells*] o microvesículas como los exosomas) de la sangre y también otros fluidos biológicos como la orina, la saliva, el líquido ascítico, pleural o el líquido cefalorraquídeo (**figura 11**) (58–60).

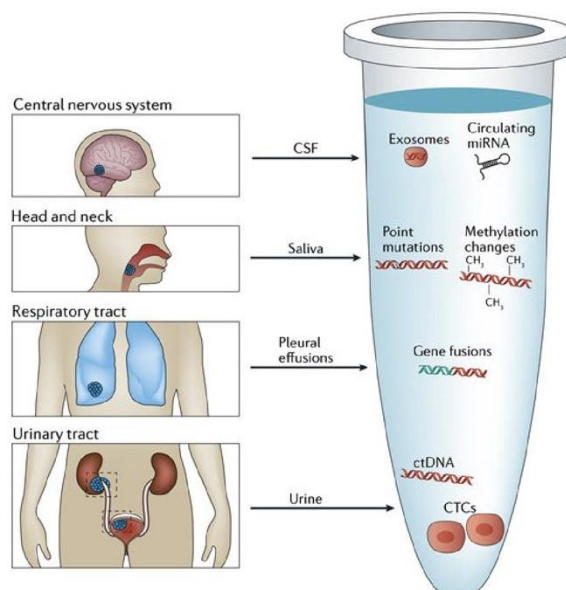


Figura 11. Fluidos corporales como fuente de información molecular derivada del tumor. Imagen obtenida de Siravenga et al. (58). CTCs, *circulating tumor cells*; ctDNA, *circulating cell-free tumor DNA*; miRNA, *microRNA*.

El DNA libre circulante (cfDNA, del inglés, *cell-free DNA*) consiste en pequeños fragmentos de doble cadena de DNA de unas 150-200 pares de bases que se encuentran en el plasma (o en los distintos fluidos corporales) de individuos sanos y que son liberados al torrente circulatorio a partir de apoptosis o necrosis de células, sobre todo hematopoyéticas (61–66). Tras centrifugar la sangre

periférica se consigue separar el componente celular y aislar el cfDNA del plasma, que se encuentra generalmente en pequeñas cantidades. El cfDNA presenta una vida media muy corta, de menos de 2 horas, debido a su rápido aclaramiento hepático y renal, y sus niveles pueden aumentar en determinadas situaciones, como tras el ejercicio, la inflamación o el daño tisular y, también en pacientes con cáncer (67–70).

El ctDNA es la fracción de cfDNA que deriva de tejido tumoral. La presencia de ctDNA en plasma es muy frecuente en pacientes con tumores sólidos, sobre todo en situación metastásica, aunque la proporción sobre el total de cfDNA puede ser muy variable entre los distintos tumores e incluso de un paciente a otro con el mismo tipo tumoral, desde frecuencias inferiores al 0.1% hasta mayores del 90% (**figura 12**) (67,71). La cantidad de ctDNA detectada refleja no solo la carga tumoral, sino también otros parámetros como la biología tumoral o la capacidad de replicación, por lo que tiene un importante papel pronóstico (63,71–77). En cáncer de mama metastásico la frecuencia de detección de ctDNA se sitúa en alrededor del 90% en estudios realizados con diferentes paneles de secuenciación dirigida a genes frecuentemente mutados en cáncer (**figura 12**) (71,78,79).

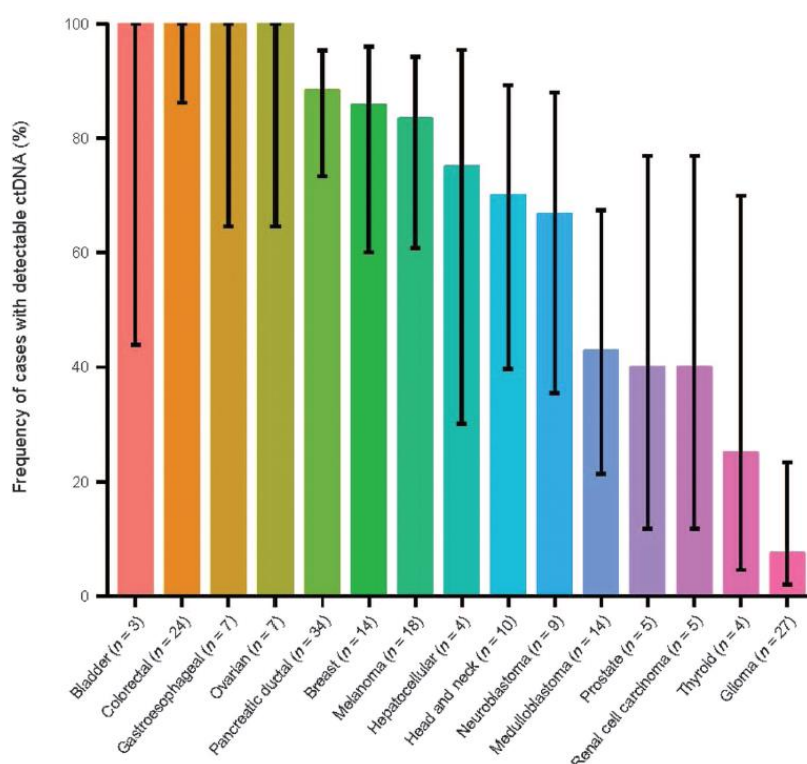


Figura 12. Fracción de pacientes con cáncer metastásico que presenta ctDNA detectable según el tipo tumoral en un estudio que incluía 136 pacientes y 14 tipos tumorales analizados mediante un panel de secuenciación de 100 genes. Imagen obtenida de Bettgowda et al. (71).

Gracias a la presencia de alteraciones en el ctDNA como mutaciones, reordenamientos, CNV o cambios en la metilación es posible identificar la fracción que corresponde al ctDNA ya que estas alteraciones son específicas del tumor y no están presentes en el resto del cfDNA derivado de células sanas (**figura 13**). La frecuencia con la que estas alteraciones son detectadas se conoce como frecuencia de las variantes alélicas (VAF, del inglés, *variant allele frequency*) y equivale al porcentaje de las variantes alélicas sobre el total de la variantes alélicas con y sin alteración (57).

Actualmente se utilizan dos estrategias principales para estudiar el material genómico tumoral a partir del ctDNA (80,81). Por un lado, disponemos de técnicas basadas en la detección de una o varias mutaciones encontradas previamente en el tejido tumoral primario. Estas técnicas incluyen métodos basados en PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative PCR*), así como métodos digitales basados en PCR, como ddPCR (del inglés, *digital droplet PCR*) o BEAMing (del inglés, *beads, emulsion, amplification, magnetics*) (**figura 13**), entre otros (57,80,81). Esta estrategia tiene la principal desventaja de necesitar información del tumor primario, ya que se buscan mutaciones conocidas *a priori* y además solo pueden rastrearse un número limitado de ellas (aunque es posible realizar un ensayo de multiplexación). Sin embargo, la especificidad y sensibilidad son muy altas, con capacidad de detección de hasta fracciones menores al 0.01% sobre el total de cfDNA, además de ser una estrategia rápida y rentable (80–83).

La segunda estrategia es la denominada secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés, *next generation sequencing*) que permite la detección de múltiples alteraciones genéticas en una sola muestra, pero con menor sensibilidad que las técnicas basadas en PCR (**figura 13**) (57,80–82). Las técnicas de NGS realizan una exploración no dirigida que puede analizar desde todo el genoma para detectar alteraciones mediante la secuenciación del genoma completo (WGS, del inglés, *whole-genome sequencing*), secuenciar solo el exoma (WES, del inglés, *whole-exome sequencing*) o bien realizar una secuenciación dirigida de un panel limitado de genes, lo que aumenta la sensibilidad. Esta es la estrategia que utiliza, por ejemplo, *Guardant Health* con su panel de secuenciación dirigida Guardant360® donde se secuencian completamente todos los exones o los exones críticos de 74 genes relevantes en tumores sólidos (**tabla 3**). La NGS puede utilizar PCR o estar basada en capturas para la lectura de fragmentos cortos (alrededor de 150 pares de bases). La NGS está limitada por la alta cantidad de falsos positivos debido a la alta tasa de error de la DNA polimerasa y la reacción de secuenciación, por lo que se han implementado métodos como el “*barcoding*” que realiza una secuenciación previa con códigos de barras, y estrategias bioinformáticas posteriores a la secuenciación para la supresión de estos errores. Para obtener una alta sensibilidad se utilizan estos códigos de barras de DNA, que son moléculas de DNA iniciales con 10-12 bases aleatorias, de manera que el código de barras se amplifica y secuencia junto con el DNA. Así, si se encuentra una alteración

y está presente en todas las secuencias de un mismo paciente con el mismo código de barras, se considerará una alteración real, mientras que si solo se encuentra en una de las secuencias se considerará como un fallo de la secuenciación (**figura 13**) (57,80,84–87).

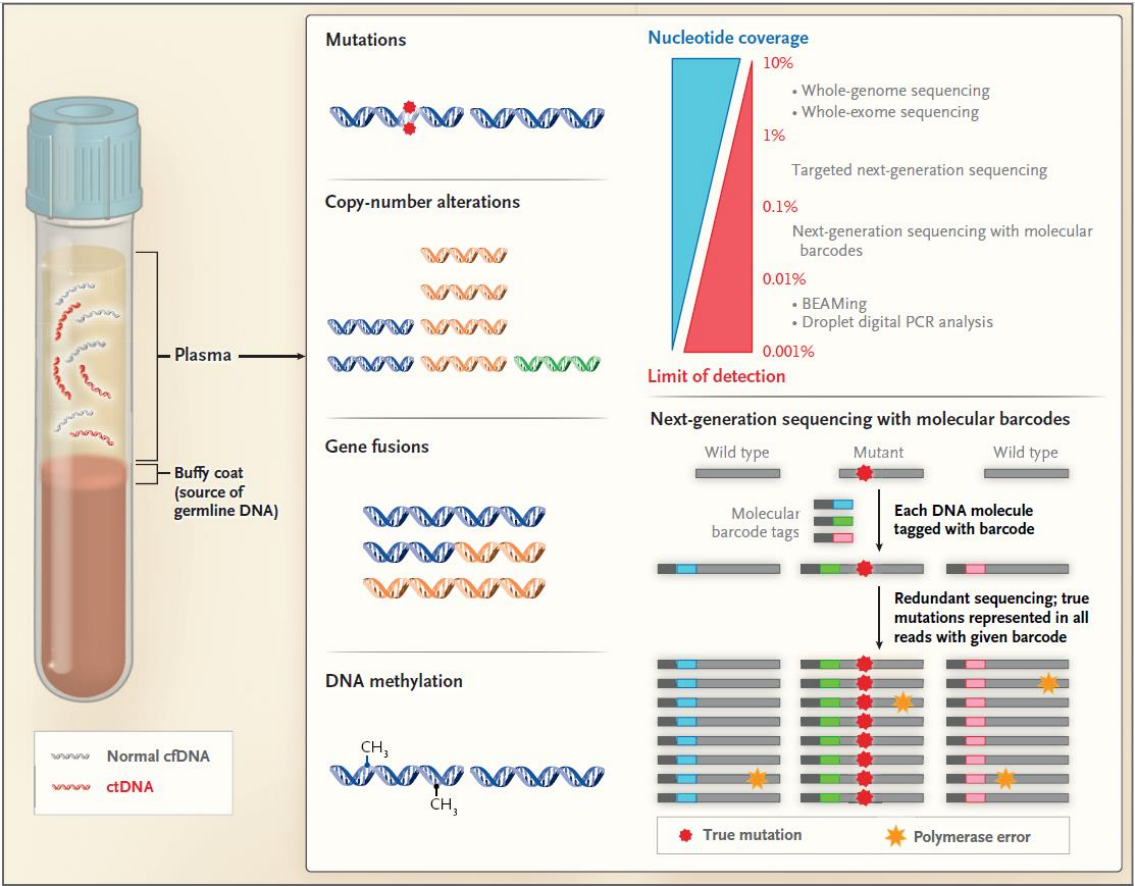


Figura 13. Aislamiento y análisis de ctDNA. Arriba a la derecha se muestra la sensibilidad de las diferentes técnicas y abajo a la derecha, la estrategia de *barcoding* para disminuir errores introducidos por la polimerasa y aumentar los límites de detección de la NGS. Imagen obtenida de Corcoran et al. (57).

Tabla 3. Panel de secuenciación dirigida Guardant360® con los genes y alteraciones analizados (88).

Point Mutations (SNVs) and Deletion Variants (Indels) (74 Genes)							Amplifications (18 Genes)		Fusions (6 Genes)
AKT1	ALK	APC	AR	ARAF	ARID1A	ATM	AR	BRAF	ALK
BRAF	BRCA1	BRCA2	CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	CCND1	CCND2	FGFR2
CDK4	CDK6	CDK12	CDKN2A	CTNNB1	DDR2	EGFR	CCNE1	CDK4	FGFR3
ERBB2	ESR1	EZH2	FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3	CDK6	EGFR	NTRK1
GATA3	GNA11	GNAQ	GNAS	HNF1A	HRAS	IDH1	ERBB2	FGFR1	RET
IDH2	JAK2	JAK3	KIT	KRAS	MAP2K1	MAP2K2	FGFR2	KIT	ROS1
MAPK1	MAPK3	MET	MLH1	MPL	MTOR	MYC	KRAS	MET	
NF1	NFE2L2	NOTCH1	NPM1	NRAS	NTRK1	NTRK3	MYC	PDGFRA	
PDGFRA	PIK3CA	PTEN	PTPN11	RAF1	RB1	RET	PIK3CA	RAF1	
RHEB	RHOA	RIT1	ROS1	SMAD4	SMO	STK11			
TERT*	TP53	TSC1	VHL						

*Incluye la región promotora de *TERT*.
En negrita los genes que recomiendan estudiar las guías de cáncer pulmón de célula no pequeña.

Es importante señalar que la elección entre las diferentes técnicas de detección de ctDNA variará en función del objetivo clínico que se disponga ya que en general las técnicas presentan una relación inversa entre la amplitud de cobertura de nucleótidos y la sensibilidad (**figura 13**) (57,82). Si la finalidad del estudio es detectar enfermedad mínima residual o valorar una recaída tras el tratamiento de la enfermedad localizada se puede seguir evolutivamente en plasma la presencia de una mutación concreta detectada previamente en el tumor primario mediante métodos altamente sensibles, como aquellos basados en PCR. Para detectar la aparición de determinadas mutaciones de resistencia conocidas, como la T190M de *EGFR*, que suele aparecer inicialmente como una mutación subclonal, a baja frecuencia, serán también necesarias técnicas con alta sensibilidad. Si el objetivo es, por ejemplo, la caracterización molecular, más que determinar la presencia de una mutación concreta, interesará una técnica capaz de detectar mayor número de alteraciones, como las basadas en NGS.

2.2 Aplicaciones clínicas

El análisis del ctDNA en plasma se ha convertido en una herramienta de gran valor ya que presenta la ventaja de ser un método mínimamente invasivo que permite caracterizar molecularmente tumores poco accesibles a una biopsia, realizar una monitorización seriada en el tiempo sin los riesgos y complicaciones que conlleva la biopsia de tejido y, además, capturar mejor la heterogeneidad molecular derivada de distintas poblaciones clonales, en comparación con la biopsia de una sola lesión (57).

La caracterización molecular del tumor es una de las aplicaciones más relevantes del análisis de ctDNA que permite la elección de un tratamiento dirigido, sobre todo en los casos donde la biopsia no consigue material suficiente, o cuando se desea repetir el estudio de forma seriada en el tiempo, para evitar la repetición de biopsias invasivas (89).

Una cuestión importante es la capacidad del ctDNA de reproducir el perfil mutacional derivado de una biopsia tumoral que es la prueba estándar actualmente. Algunos estudios iniciales basados en un escaso número de pacientes sugirieron baja concordancia entre las alteraciones de DNA detectadas en tumor y en el plasma de un mismo paciente, sin embargo, la validez de estos estudios estaba limitada por la recogida de ambas muestras en distintos momentos temporales o por la recogida de plasma en momentos subóptimos para la detección de ctDNA, como, por ejemplo, durante el curso del tratamiento (90,91). Estudios recientes y con mayor número de pacientes en los que estas cuestiones se han tenido en cuenta muestran unas tasas de concordancia del 80-90% entre el plasma y el tejido en muestras obtenidas simultáneamente (78,92,93).

Por otro lado, el estudio de ctDNA en plasma permite la detección precoz de alteraciones moleculares que producen resistencias a los tratamientos. La resistencia adquirida se caracteriza por un sobrecrecimiento de diferentes subclones resistentes en un mismo paciente (94–96). Estos subclones resistentes pueden coexistir en la misma lesión o aparecer en distintas metástasis de la economía del paciente, lo que se conoce como heterogeneidad tumoral. La heterogeneidad tumoral puede ser tanto temporal (nuevas mutaciones que aparecen a lo largo de la evolución), como espacial (el tumor primario y las diferentes lesiones metastásicas no presentan siempre las mismas alteraciones). Esta heterogeneidad no queda recogida si se analiza una sola lesión de tejido metastásico en un único momento temporal (97–99). Un estudio que refleja bien esta situación es el estudio plasmaMATCH, un ensayo fase II, abierto, no aleatorizado, multicéntrico, que analizó la precisión del ctDNA y su capacidad para seleccionar una terapia dirigida en 1051 pacientes con cáncer de mama metastásico, y que detectó una correlación entre la PCR de tejido y la PCR en sangre del 98% cuando las muestras eran contemporáneas pero que descendía al 85% en muestras de momentos temporales discordantes (**figura 14**) (100). En este estudio las mutaciones en *ESR1* presentaron los acuerdos más bajos precisamente porque *ESR1* es un gen en el que aparecen mutaciones de forma habitual tras el tratamiento endocrino (de hasta un 30% en pacientes tras tratamiento frente a menos del 5% en pacientes no tratadas), por lo que esta información se pierde si se analizan solo las mutaciones presentes en el tumor primario o en tejido metastásico recogido en un momento muy anterior al actual (42,100–103).

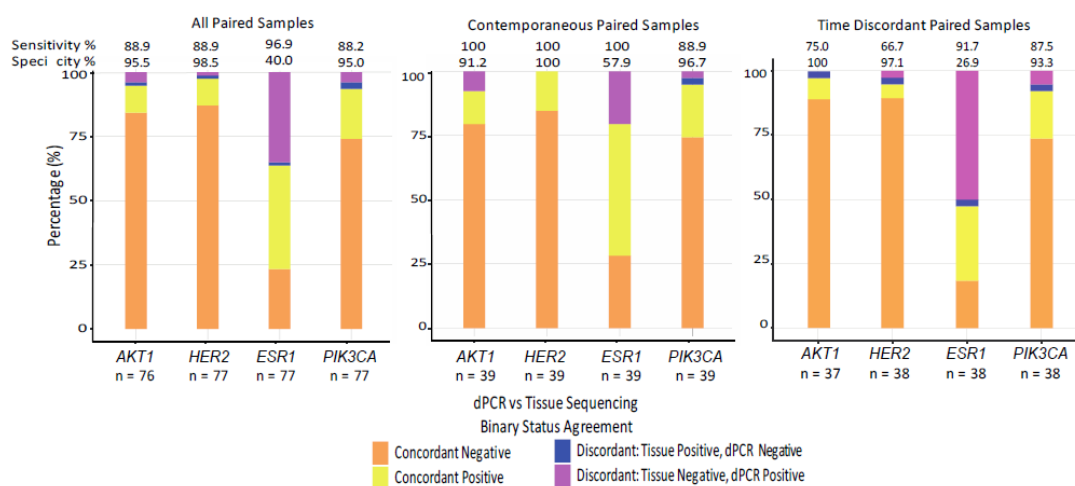


Figura 14. Acuerdo entre los resultados del análisis de ctDNA mediante PCR digital y secuenciación de tejido en el estudio plasmaMATCH. A la izquierda se muestran todas las muestras pareadas, en el centro, las muestras de ctDNA y tejido contemporáneas, y a la derecha, las muestras discordantes en el tiempo con obtención de tejido ≥ 60 días antes de la extracción de plasma. Imagen obtenida de Turner et al. (100).

Entre otras posibles aplicaciones clínicas del estudio del ctDNA (**figura 15**) se encuentra el diagnóstico precoz de cáncer en pacientes sin enfermedad clínica evidente. Existen estudios que han detectado mutaciones en plasma y saliva hasta 2 años antes del diagnóstico tumoral (104,105). La detección precoz podría permitir iniciar un tratamiento con intención curativa de manera temprana con la intención de mejorar el pronóstico de los pacientes (89). De forma global en los distintos tumores en estadio IV se detecta ctDNA en alrededor del 82% de los pacientes, pero esta cifra disminuye a aproximadamente el 50% en estadios I, aunque esto es muy variable según el tipo tumoral (71,86). La progresiva mejoría de la sensibilidad de las técnicas podría llegar a permitir la implementación de una estrategia de cribado a nivel poblacional en individuos asintomáticos, sin embargo, existe todavía un elevado riesgo de sobrediagnóstico y falsos positivos, ya que se han observado alteraciones genómicas en individuos aparentemente sanos sin que se haya desarrollado posteriormente un tumor. Además, existen mutaciones derivadas de hematopoyesis clonal que aumentan progresivamente con la edad (86,87,105–110). La hematopoyesis clonal es una entidad bien reconocida en la que una sola célula madre hematopoyética adquiere una mutación somática que conduce a la expansión clonal de las células. Con el tiempo el clon derivado de células madre hematopoyéticas se expande de manera que contribuye a una proporción considerable de la producción de células sanguíneas maduras en individuos aparentemente sanos, dando lugar a la detección en plasma de mutaciones no derivadas del tumor. La hematopoyesis clonal es más prevalente con el aumento de la edad y conlleva un mayor riesgo de evolución posterior a una neoplasia mieloide (111–113). La prevalencia descrita de la hematopoyesis clonal varía en función de la técnica utilizada. Las técnicas de secuenciación con límite de detección por encima de VAF del 2% describen frecuencias del 1-2% de los individuos a la edad de 40 años y en el 5%-15% de los mayores de 70 años, pero estas cifras se incrementan notoriamente con tecnologías con alta profundidad de secuenciación (109,114–116). Las mutaciones derivadas de las células hematopoyéticas pueden disfrazarse, por tanto, como derivadas del tumor y suponen una fuente de ruido biológico de fondo para el análisis del cfDNA (110). Estos hallazgos deben ser mejor caracterizados antes de poder implementar el análisis de ctDNA como estrategia de cribado diagnóstico.

Por otro lado, la determinación de ctDNA en pacientes con cáncer que ya han sido tratadas con intención curativa, por ejemplo, tras la cirugía, puede mostrar la presencia de enfermedad mínima residual, lo que ha mostrado tener importantes implicaciones pronósticas (117–120). Estos hallazgos podrían convertir la determinación de ctDNA en una herramienta para plantear estrategias de adyuvancia en los pacientes en los que se detecta ctDNA, dado el elevado riesgo de recaída. La determinación seriada de ctDNA durante el seguimiento tras un tratamiento radical también podría detectar una recaída antes de que fuera detectable mediante pruebas de imagen (121). Sin embargo,

estas aplicaciones todavía no son práctica estándar y se encuentran en marcha diferentes estudios para validar su utilidad de forma prospectiva.

Finalmente, otra aplicación importante que está adquiriendo gran interés en la clínica es la posibilidad de monitorizar la enfermedad metastásica mediante el análisis cuantitativo del ctDNA ya que se ha observado que los niveles de ctDNA de cada paciente se correlacionan con la carga de enfermedad y con la respuesta al tratamiento determinada por pruebas de imagen. El empleo del análisis de ctDNA como herramienta de monitorización que sustituyera o complementara a las pruebas radiológicas tendría las ventajas de evitar la radiación sobre el paciente así como permitir una logística más sencilla para llevar a cabo el seguimiento (86,89,106,107,122–124). Sin embargo, una limitación para implementar esta estrategia es que actualmente no se dispone de estudios clínicos que avalen la toma de decisiones terapéuticas en función de los hallazgos obtenidos con el análisis de ctDNA frente a las decisiones guiadas por pruebas de imagen. De hecho, las decisiones clínicas basadas solo en los marcadores tumorales en sangre no han mostrado un beneficio para los pacientes frente a las decisiones basadas en las pruebas de imagen estándar y las diferentes guías clínicas se posicionan en contra de su utilización exclusiva para valorar la respuesta de la enfermedad (125–128). Serán necesarios, por tanto, estudios prospectivos que analicen el papel del seguimiento con ctDNA para determinar la rentabilidad y utilidad de esta estrategia en la práctica clínica frente a las pruebas radiológicas convencionales.

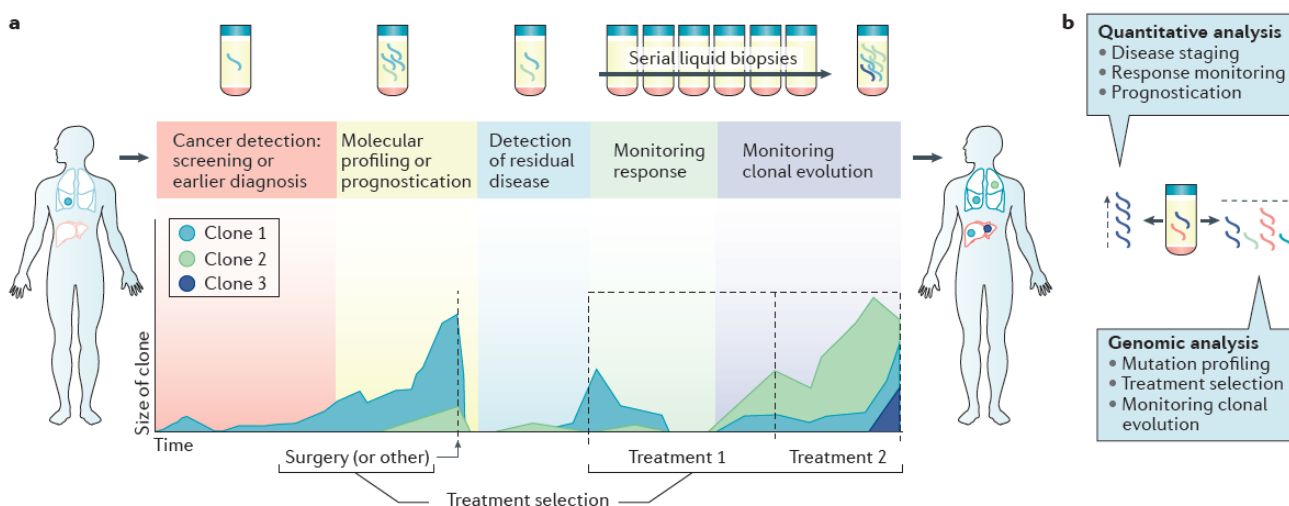


Figura 15. Aplicaciones del análisis de ctDNA. **a.** Curso temporal esquemático para un paciente hipotético que se somete a cirugía (u otro tratamiento inicial), presenta una recaída de la enfermedad y luego recibe terapia sistémica. El paciente comienza con un único foco de enfermedad, pero después del tratamiento aparecen múltiples metástasis y distintos clones (representados en diferentes colores). Se indican las posibles aplicaciones de la biopsia líquida durante el cuidado de este paciente. **b.** La información extraída del ctDNA puede clasificarse, en términos generales, como información cuantitativa (relacionada con la carga tumoral) o información genómica o cualitativa. Imagen obtenida de Wan et al. (89).

2.3 Monitorización de la respuesta y dinámica precoz del ctDNA

La vida media corta del ctDNA en sangre permite realizar una medida que se correlaciona con la carga de enfermedad del paciente a tiempo real, a diferencia de los marcadores tumorales (como CEA o CA 15-3 empleados en el seguimiento del cáncer de mama), que, además de ser mucho menos sensibles y específicos, presentan vidas medias de entre días y semanas, por lo que proporcionan una visión antigua de lo que está sucediendo en la enfermedad (129,130). Algunos estudios sugieren que los niveles de ctDNA pueden subir transitoriamente de forma inicial tras comenzar una terapia, pero tras unas semanas los niveles suelen bajar de forma marcada si existe respuesta al tratamiento (figura 16) (107,131–133).

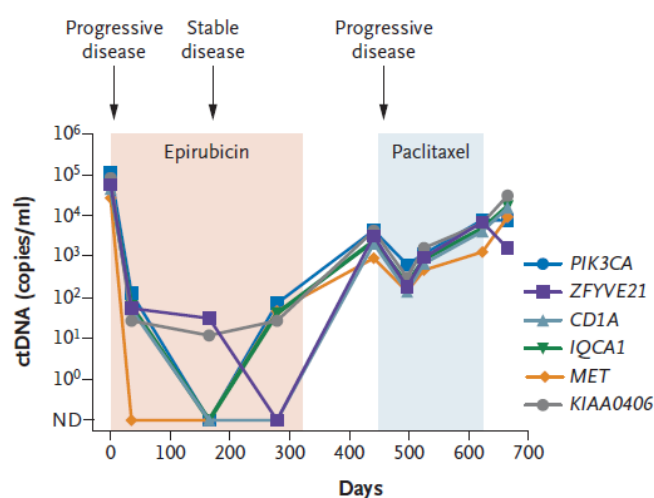


Figura 16. Ejemplo de una paciente con cáncer de mama metastásico en la que se detectan 6 mutaciones diferentes. Las 6 mutaciones presentan un patrón dinámico similar, descienden con la estabilización de la enfermedad y aumentan con la progresión radiológica. Imagen obtenida de Dawson et al. (107).

Se ha sugerido que los cambios en el ctDNA presentan mayor capacidad de predicción de respuesta tumoral que los marcadores tumorales utilizados en la práctica clínica habitual (94,107). El trabajo de Dawson et al. comparó de forma seriada los niveles de ctDNA, de CA 15-3 y el número de CTCs en 30 pacientes con cáncer de mama metastásico que recibían tratamiento sistémico realizando determinaciones cada 3 semanas. El análisis de ctDNA se realizó mediante secuenciación dirigida y/o PCR digital. Se detectó la presencia de ctDNA en el 97% de las pacientes, de CA 15-3 en el 87% y de CTCs en el 78%. Los cambios en los niveles de ctDNA mostraron un rango dinámico (variación entre el nivel mínimo y máximo) más amplio y una mayor correlación con la respuesta tumoral que los niveles de CA 15-3 o de CTCs, además de ser el método que proporcionaba una valoración más precoz de la respuesta (figura 17) (107). El aumento de ctDNA y de CTCs resultó pronóstico en esta serie y no fue así con los valores de CA 15-3.

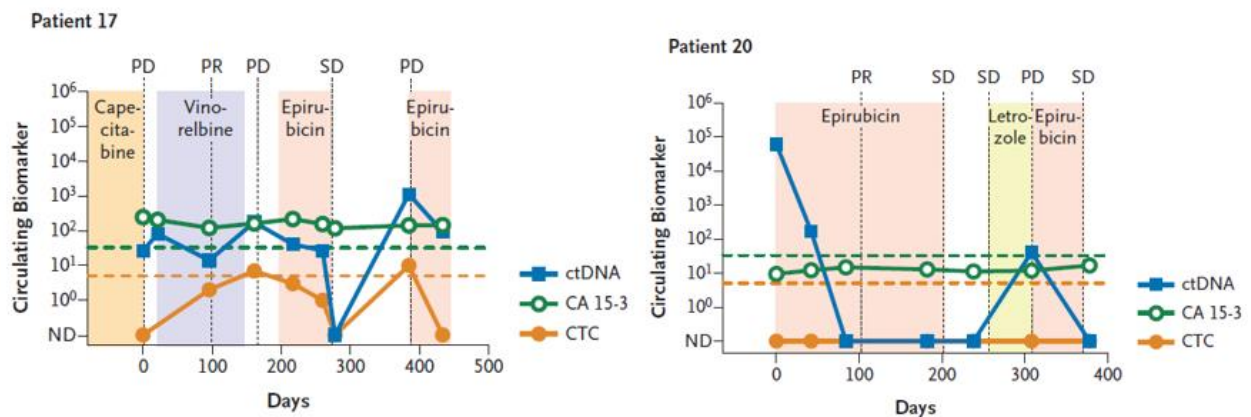


Figura 17. Niveles seriados de ctDNA, CA 15-3 y CTCs en dos pacientes del trabajo de Dawson et al. tratadas con diferentes quimioterápicos y terapia endocrina. Se observa un mayor rango dinámico en los cambios de ctDNA, así como una mayor correlación con la evolución de la enfermedad. La línea discontinua naranja indica el umbral de 5 CTCs por 7.5 ml de sangre. La línea verde punteada indica el umbral de CA 15-3 de 32.4 U/mililitro. Imagen obtenida de Dawson et al. (107). PD, *progressive disease*; PR, *partial response*; SD, *stable disease*.

En otro estudio retrospectivo en 40 pacientes con cáncer de ovario recidivante se recogieron muestras de plasma antes de iniciar tratamiento y al mes de haberlo iniciado. Se determinaron diferentes mutaciones en *TP53* en el tejido tumoral y se diseñó un test específico para cada paciente en función de estas mutaciones utilizando PCR digital. Se comparó la VAF de las mutaciones en *TP53* con el marcador tumoral CA 125 en suero. La VAF de *TP53* previa al inicio del tratamiento se correlacionó con el volumen de enfermedad. Los cambios en ctDNA asociados a la respuesta a la quimioterapia fueron más precoces que los cambios en CA 125. Por otro lado, una reducción de la VAF de *TP53* superior al 60% se asoció de forma independiente en el análisis multivariado al tiempo libre de progresión (72).

El valor de esta caída precoz del ctDNA se ha evaluado en distintos tipos tumorales tratados con diferentes tratamientos (quimioterapia, inmunoterapia, terapias dirigidas e inhibidores de CDK4/6). Se ha observado una clara correlación entre la dinámica temprana de ctDNA (ascenso o descenso de ctDNA a las pocas semanas del inicio del tratamiento) y la respuesta tumoral, así como la supervivencia libre de progresión y también la supervivencia global en algunos tipos de tumores, incluyendo el cáncer de mama triple negativo, aunque no se ha reportado hasta la fecha un asociación con la supervivencia global en los cánceres de mama RH positivo y HER2 negativo (134–142). Los hallazgos descritos apoyan la determinación de la dinámica precoz del ctDNA como biomarcador predictivo de beneficio a distintos tratamientos, capaz de adelantarse a la evaluación mediante pruebas de imagen. De esta manera, el estudio precoz del comportamiento del ctDNA podría convertirse en una herramienta que ayudara a identificar precozmente a aquellos pacientes

resistentes al tratamiento y a la adaptación de la terapia en busca de una estrategia terapéutica más eficaz. La instauración de esta herramienta en la práctica clínica requiere, sin embargo, de una adecuada validación, así como la resolución de algunos aspectos metodológicos y técnicos que están lejos de estar estandarizados en la actualidad.

Por un lado, existe controversia en cuanto al mejor momento para valorar este ascenso o descenso del ctDNA. Los diferentes estudios han realizado la segunda determinación de niveles de ctDNA entre las 2 y las 6 semanas de haber iniciado el tratamiento para evitar el posible *flare* de la primera y segunda semana que se produce secundariamente a la muerte celular y liberación de ctDNA, pero existen pocos estudios que hayan comparado diferentes momentos temporales entre sí (72,132–136,138–140,142).

Tampoco está establecida una clara metodología para valorar la respuesta por ctDNA. Algunos estudios determinan la ratio entre la cantidad en términos absolutos (número copias o ng/mL) o la VAF (medida en porcentaje) de ctDNA inicial y la cantidad o VAF posterior al primer ciclo de tratamiento, y clasifican a los pacientes en grupos según un punto de corte arbitrario (algún descenso [ratio <1], descenso superior al 50 o al 60%, mediana, etc.); otros estudios calculan la diferencia absoluta (o delta) entre los dos momentos temporales, y otros consideran que el grupo de mayor beneficio a una terapia concreta es aquel que produce un aclaramiento o desaparición completa de ctDNA en plasma tras iniciar el tratamiento (72,134–139,142).

Asimismo, se han empleado diferentes tecnologías para determinar el ctDNA en sangre. Algunos estudios realizan primero secuenciación sobre tejido, ya sea del tumor primario o metastásico, para elaborar test basados en PCR que detecten en plasma las alteraciones encontradas en tejido. Muchos estudios analizan solo una o unas pocas mutaciones en cada paciente o bien siguen solo temporalmente la mutación con mayor VAF (72,135,136,138). Otros realizan secuenciación dirigida y establecen una media de todas las mutaciones presentes en un mismo paciente en cada momento temporal (134,139).

En conjunto, la utilización de la biopsia líquida como herramienta de monitorización precoz de la enfermedad metastásica es un campo en tremendo desarrollo, pero donde existen todavía numerosos interrogantes, por lo que son necesarios estudios que determinen la mejor metodología para cada tipo tumoral.

3. Tratamiento del cáncer de mama

3.1. Cáncer de mama localizado

Más del 90% de los cánceres de mama se diagnostican en estadios precoces (17). En este escenario el objetivo es la curación de la enfermedad por lo que los distintos tratamientos están dirigidos a la erradicación del tumor y la prevención de recaídas futuras (8,9). El enfoque terapéutico es complejo e incluye la combinación de tratamiento local (cirugía del tumor primario y de los ganglios regionales con o sin radioterapia posterior) junto con tratamiento sistémico (**figura 17**). La terapia sistémica puede ser preoperatoria (neoadyuvante), postoperatoria (adyuvante), o ambas, y se puede realizar con quimioterapia, terapia endocrina, tratamiento anti-HER2 o una combinación de estos. La selección de los distintos tratamientos locales y sistémicos se realiza en un contexto multidisciplinar y tiene en cuenta diferentes factores pronósticos y predictivos. Estos factores incluyen el tamaño tumoral y la afectación ganglionar, el estado del RE, RP y HER2, el índice proliferativo, el grado, y resto de factores clínico-patológicos del tumor, el riesgo de recaída calculado con plataformas génicas y la comorbilidad, edad, estado menopáusico y preferencias de la paciente (7–9,128).

Siempre que sea posible se prefiere la realización de cirugía conservadora (frente a mastectomía), seguida de radioterapia adyuvante. Las guías recomiendan un tratamiento con quimioterapia neoadyuvante en aquellos tumores localmente avanzados independientemente de la biología tumoral, aquellos mayores de 2cm donde no es posible una cirugía conservadora de entrada y en tumores con biología muy sensibles a la quimioterapia y/o tratamiento dirigido como los triples negativos y HER2 positivo mayores de 2cm y/o con axila positiva independientemente de que la terapia conservadora sea posible (**figura 18**) (7–9).

Además de las recomendaciones anteriores, en general, se acepta que todas las indicaciones de terapia adyuvante pueden emplearse en el escenario neoadyuvante (7,143,144). El tratamiento neoadyuvante permite valorar la respuesta tumoral tras el mismo, lo cual aporta información pronóstica, y, además, en algunos casos permite seleccionar tratamiento adyuvante complementario si no se ha obtenido una respuesta completa patológica tumoral (145,146).

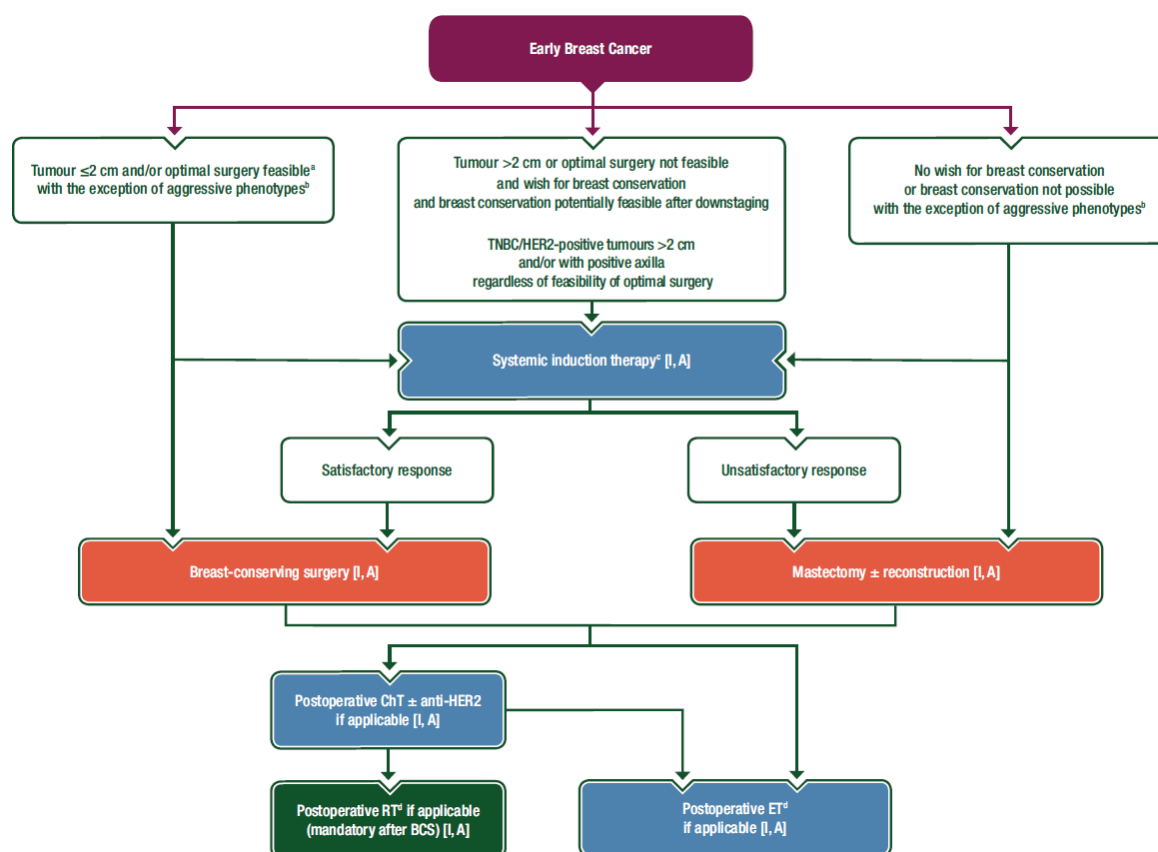


Figura 18. Algoritmo terapéutico en cáncer de mama localizado. Algoritmo extraído de la guía ESMO para cáncer de mama localizado, 2019 (8). BCS, *breast conservative surgery*; ChT, *chemotherapy*; ET, *endocrine therapy*; RT, *radiotherapy*; TNBC, *triple negative breast cancer*.

^a En tumores con una biología que requiere quimioterapia (triple negativo, HER2 positivo, luminal B-like) se prefiere tratamiento neoadyuvante para evaluar la respuesta y el pronóstico y decidir sobre el tratamiento postoperatorio.

^b Fenotipos agresivos: cáncer de mama triple negativo o HER2 positivo.

^c Si se planea quimioterapia debe administrarse como neoadyuvante.

^d RT postoperatoria concomitante, terapia endocrina postoperatoria y terapia anti-HER2.

El empleo de quimioterapia adyuvante, si no se ha recibido de forma neoadyuvante, está indicada prácticamente en todos los tumores HER2 positivo y triple negativo, sobre todo a partir de 0.5 cm de tamaño, dado el elevado riesgo de recaída sin tratamiento. El tratamiento de los tumores HER2 siempre incluirá terapia dirigida frente a HER2. En la enfermedad con RH positivo y HER2 negativo la quimioterapia se recomienda en pacientes de alto riesgo de recaída. Este riesgo se estima mediante la valoración de características clínico-patológicas (tamaño, afectación axilar, índice proliferativo, grado, niveles de expresión de RH) y también por la puntuación obtenida mediante plataformas multigénicas (Oncotype DX®, MammaPrint®, Prosigna®, Breast Cancer Index® o EndoPredict®). Los tumores luminales B o luminales B-like son candidatos a quimioterapia adyuvante si presentan un tamaño superior a 0.5cm y/o afectación axilar, y los luminales A o luminales A-like solo lo son si presentan un estadio localmente avanzado con gran carga tumoral (p. ej. T4 o N2-3) (7–9) (**figura 19**).

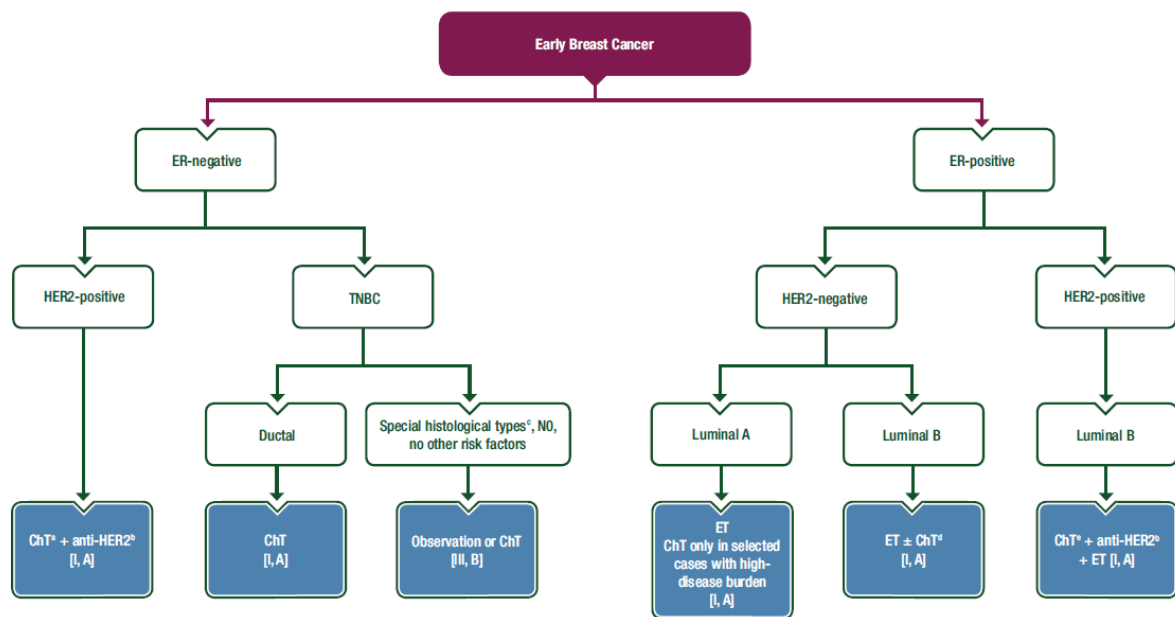


Figura 19. Tratamiento (neo)adjuvante sistémico según el subtipo tumoral. Algoritmo extraído de la guía ESMO para cáncer de mama localizado, 2019 (8). ChT, *chemotherapy*; ER, *estrogen receptor*; ET, *endocrine therapy*; NO, *negative nodes*; PgR, *progesterone receptor*; TNBC, *triple-negative breast cancer*.

^aCon posible excepción de casos seleccionados con T1a-bN0 de muy bajo riesgo.

^bAnti-HER2: trastuzumab ± pertuzumab.

^cAdenoide quístico o apocrino, carcinoma secretor, carcinoma metaplásico de bajo grado.

^dDependiendo del nivel de expresión de ER y PgR, proliferación, riesgo evaluado genómicamente, carga tumoral y/o preferencia del paciente.

^eExcepto en las pacientes de muy bajo riesgo T1a-bN0 para los que se puede considerar tratamiento solo con ET/anti-HER2.

El tratamiento endocrino está indicado en todas las pacientes que presentan RH positivo durante al menos 5 años, aunque el tratamiento extendido hasta los 7-10 años ha mostrado aumentar el beneficio (147–153). En las pacientes premenopáusicas el tratamiento hormonal se realiza con tamoxifeno, con o sin análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) que producen una supresión ovárica induciendo un estado menopáusico, o bien con inhibidores de aromatasa junto con análogos de LHRH. El tratamiento con análogos de LHRH se emplea en los casos de alto riesgo de recaída (7–9,154,155). En las pacientes postmenopáusicas el tratamiento adjuvante estándar se realiza con inhibidores de aromatasa que han mostrado un beneficio superior al tamoxifeno en este escenario (148).

El tratamiento con radioterapia adjuvante se debe administrar tras cirugía conservadora de la mama y después de mastectomía si hay factores de riesgo, como importante volumen tumoral o ganglios axilares afectos, entre otros (156–159).

3.2. Cáncer de mama metastásico

Aunque en más del 90% de los casos la enfermedad se diagnostique en estadios localizados, hasta en un 20-30% de las pacientes se producirá una recaída a distancia (17,160). El cáncer de mama metastásico es una enfermedad incurable en la que los objetivos del tratamiento persiguen aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida (9,128,161).

La selección del tratamiento se realiza teniendo en cuenta diversos factores como el subtipo tumoral, la carga de enfermedad, los tratamientos recibidos previamente y el beneficio obtenido con los mismos, la presencia de síntomas o crisis visceral (definida como disfunción orgánica grave, evaluada por signos, síntomas y criterios analíticos, con rápida progresión de la enfermedad) y la edad y comorbilidades del paciente, así como sus preferencias (9,128,161).

En el cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo el tratamiento de primera elección es la terapia endocrina junto con un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6). Se prefiere el empleo de quimioterapia por su más rápida acción si existe una situación de crisis visceral, o bien se trate de una enfermedad refractaria a la hormonoterapia, donde también se elegirá el tratamiento con citotóxicos (9,128,162). En general, la terapia endocrina se prefiere a la quimioterapia por su mejor perfil de toxicidad, con similares resultados en términos de supervivencia (163,164). Las pacientes con RH positivo premenopáusicas deberán recibir una terapia de supresión de la función ovárica con análogos de LHRH, ooforectomía o radioterapia ovárica (esta última cada vez menos utilizada), y recibirán el mismo tratamiento para la enfermedad oncológica que las pacientes postmenopáusicas (**figura 20**). El tratamiento endocrino con las distintas opciones terapéuticas solas o en combinación con terapias dirigidas (p.ej. everolimus o alpelisib) se empleará de forma secuencial mientras exista un beneficio con el tratamiento hormonal. Cuando finalmente se desarrolla hormono-resistencia las pacientes son entonces candidatas a recibir quimioterapia (9,128,162).

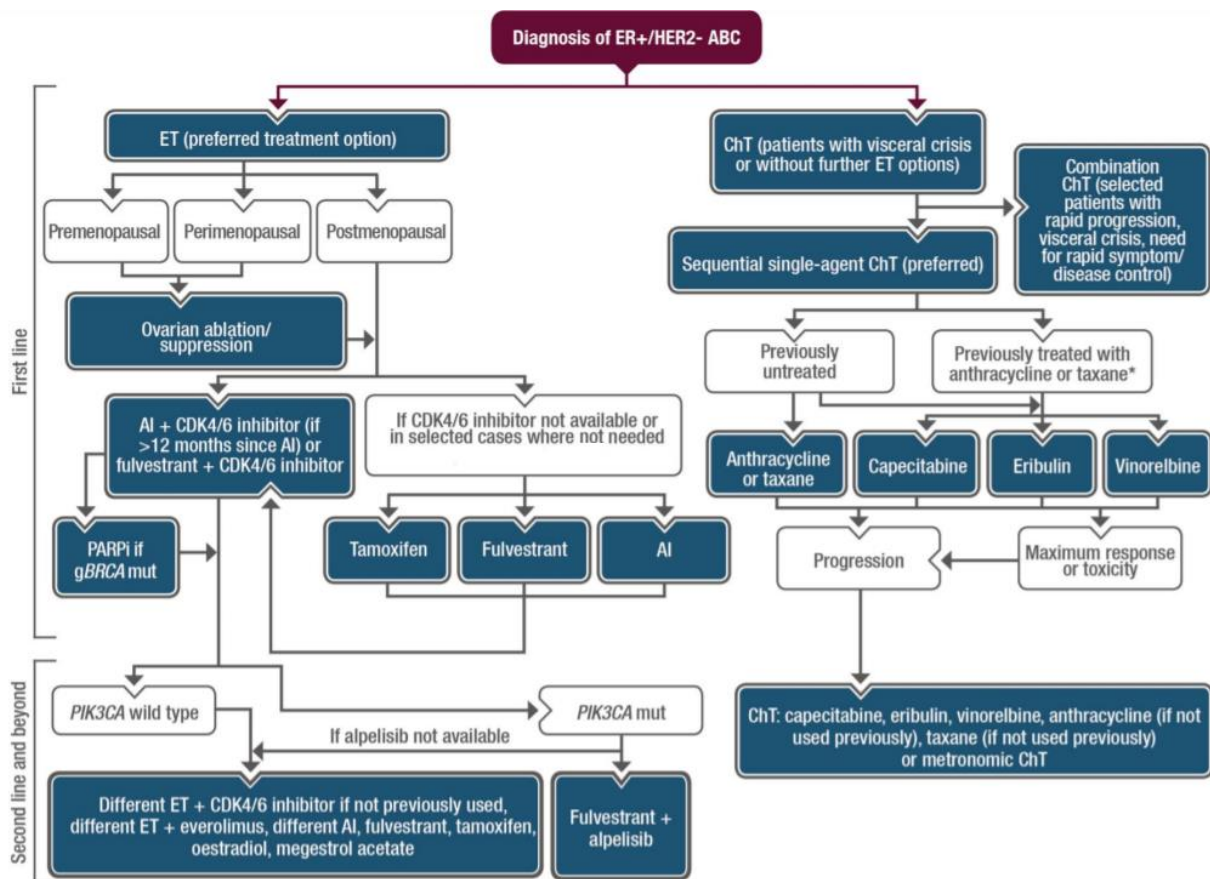


Figura 20. Algoritmo terapéutico en cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo. Algoritmo extraído de la guía ESMO para cáncer de mama avanzado, 2020 (128). ER, *estrogen receptor*; ABC, *advanced breast cancer*; ET, *endocrine therapy*; ChT, *chemotherapy*; AI, *aromatase inhibitor*; PARPi, *PARP inhibitor*.

Existen múltiples citotóxicos que pueden ser empleados en los distintos subtipos de cáncer de mama. De forma general se opta por la monoterapia de forma secuencial, ya que la terapia de combinación es más tóxica y, aunque presenta mayor tasa de respuesta, no ha demostrado mejorar la supervivencia (165). El tratamiento con varios quimioterápicos de forma simultánea queda relegado a situaciones donde se requiere un rápido control de la enfermedad (9,128,161).

Las antraciclinas y los taxanos son los quimioterápicos que se prefieren como primera opción si no existe ninguna contraindicación u otra preferencia de la paciente (**figura 20**), sobre todo en pacientes que no los han recibido en neo/adyuvancia previamente o en las que los han recibido, pero presentan una recaída tardía tras el empleo de estos. Sin embargo, las antraciclinas presentan el inconveniente de la dosis techo por su riesgo de cardiotoxicidad, y los taxanos producen neuropatía, que es una toxicidad limitante de dosis. En pacientes previamente tratadas con estos fármacos, la capecitabina, la eribulina o la vinorelbina son opciones terapéuticas apropiadas para la primera línea (128,161,166,167). Otras opciones terapéuticas incluyen la gemcitabina, los platinos o la terapia metronómica (128,161,166,167).

La combinación de bevacizumab con taxanos en primera línea ha demostrado aumentar la supervivencia libre de progresión y la tasa de respuestas frente a los taxanos solos, pero no la supervivencia global, por lo que la combinación se considera solo en casos seleccionados (161,168–170).

En la enfermedad HER2 positiva el tratamiento consiste en quimioterapia junto con tratamiento dirigido frente a HER2. En casos seleccionados de tumores HER2 positivo y RH positivo, con bajo volumen tumoral, puede ofrecerse un tratamiento con terapia endocrina y anti-HER2 sin quimioterapia. Esta también es una opción como terapia de mantenimiento tras una inducción inicial con quimioterapia y anti-HER2 (9,128,161).

Para los tumores triples negativo no se dispone de terapia dirigida por lo que el tratamiento se basa en quimioterapia. La inmunoterapia junto con quimioterapia ha mostrado beneficio en primera línea en aquellos tumores que presentan positividad para la tinción de PD-L1, tanto con atezolizumab como con pembrolizumab (9,128,161,171,172).

Asimismo, el estudio genético está indicado en todas las pacientes con enfermedad metastásica, independientemente de su historia familiar, ya que sus resultados presentan implicaciones terapéuticas. La presencia de mutaciones germinales en *BRCA1/BRCA2* permitiría el empleo de inhibidores de PARP en las pacientes con tumores HER2 negativos (9,128).

Para monitorizar la evolución de la enfermedad metastásica debe tenerse en cuenta la sintomatología del paciente y su estado funcional, la exploración física, los valores analíticos como la fosfatasa alcalina, pruebas de función hepática, calcio, hemograma, marcadores tumorales (como CEA, CA 15-3 y CA 27.29) cuando sean apropiados y pruebas de imagen (TAC y gammagrafía ósea o PET/TAC). La valoración de progresión por imagen se realiza en función de los criterios RECIST 1.1 (del inglés, *response evaluation criteria in solid tumors*) (9,173).

La frecuencia de la monitorización no está completamente estipulada. En general se recomienda realizar un control con pruebas de imagen cada 2-4 meses en pacientes en tratamiento con quimioterapia y cada 4-6 meses en pacientes con terapia endocrina (**tabla 4**) (9).

Tabla 4. Intervalos de seguimiento para pacientes con cáncer de mama metastásico recomendados por las guías NCCN (9).

	Baseline Prior to New Therapy	Chemotherapy	Endocrine Therapy	Restaging if Concern for Progression of Disease
Symptom Assessment	Yes	Prior to each cycle	Every 1–3 months	Yes
Physical Examination	Yes	Prior to each cycle	Every 1–3 months	Yes
Performance Status	Yes	Prior to each cycle	Every 1–3 months	Yes
Weight	Yes	Prior to each cycle	Every 1–3 months	Yes
LFTs, CBC	Yes	Prior to each cycle	Every 1–3 months	Yes
CT Chest/Abdomen/ Pelvis with Contrast	Yes	Every 2–4 cycles	Every 2–6 months	Yes
Bone Scan	Yes	Every 4 cycles	Every 4–6 months	Yes
PET/CT	Optional	Optional	Optional	Optional
Tumor Markers	Optional	Optional	Optional	Optional

LFTs, liver function test; CBC, cell blood count; CT, computed tomography.

4. Tratamiento del cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo y HER2 negativo

El cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo supone aproximadamente el 70% de los tumores malignos de mama y las terapias endocrinas constituyen el pilar de su tratamiento. Durante los últimos 20 años el conocimiento sobre la complejidad de la biología de la enfermedad y de los mecanismos que median las resistencias a la terapia endocrina ha permitido incrementar las opciones terapéuticas en estas pacientes, prologando la supervivencia y manteniendo o mejorando su calidad de vida.

4.1. Terapia endocrina

Existen distintas estrategias de tratamiento endocrino actualmente aprobadas para su empleo en la práctica clínica (**tabla 5**) (161).

Tabla 5. Tipos de tratamiento endocrino que pueden emplearse en cáncer de mama metastásico con RH positivo. Tabla extraída de la guía SEOM para cáncer de mama avanzado, 2018 (161).

Mechanism of action	Class	Agent
Estrogen receptor blockage	SERM	Tamoxifen, toremifen
	SERD	Fulvestrant
Estrogen deprivation	Ovarian ablation	Surgery, radiation
	Ovarian suppression with GnRH analogs	Goserelin
		Triptorelin
		Leuprolide
	NSAI	Anastrozole
Unknown	SAI	Letrozole
		Exemestane
	Progestins	Megestrol acetate
		Medroxyprogesterone acetate
	High-dose estrogens	Diethylstilbestrol (DES)

SERM, *selective estrogen receptor modulator*; SERD, *selective estrogen receptor downregulator*; GnRH, *gonadotropin-hormone releasing-hormone*; NSAI, *non-steroidal aromatase inhibitors (3rd generation)*; SAI, *steroidal aromatase inhibitors (3rd generation)*.

Los inhibidores de la aromatasa impiden la conversión periférica de andrógenos en estrógenos, inhibiendo la enzima aromatasa, por lo que actúan disminuyendo la cantidad de estrógenos circulantes. Actualmente se emplean los inhibidores de aromatasa de tercera generación, letrozol y anastrozol (no esteroideos) y exemestano (esteroideo) (161,174).

Los moduladores selectivos del RE (SERMs, del inglés, *selective estrogen receptor modulators*), como el tamoxifeno, actúan uniéndose al receptor como antagonistas en unos tejidos (p.ej. tejido mamario) y como agonistas en otros (p.ej. tejido endometrial) (174).

Los degradadores selectivos del receptor de estrógeno (SERDs, del inglés, *selective estrogen receptor degraders or downregulators*) ejercen su acción por varios mecanismos, al unirse competitivamente al receptor impiden su dimerización, aumentan su degradación y dificultan su traslocación al núcleo. Al degradar el receptor actúan como antagonistas en todos los tejidos. El único SERD actualmente aprobado es el fulvestrant, aunque existen numerosos SERDs orales en desarrollo (174). Finalmente, la ablación o supresión ovárica puede conseguirse mediante cirugía o radioterapia ovárica o con análogos de LHRH (161,174).

En el escenario metastásico los inhibidores de la aromatasa demostraron ser superiores a tamoxifeno y se convirtieron en el estándar de primera línea de tratamiento (175). Tras la progresión a la terapia endocrina inicial fulvestrant demostró ser una opción eficaz (176). Además, varios estudios observaron que fulvestrant conseguía mejor supervivencia libre de progresión que los inhibidores de la aromatasa en pacientes con cáncer de mama avanzado sin tratamiento endocrino previo (13 frente a 18 meses), pero sin diferencias en supervivencia global, que se situaba alrededor de los 50 meses (177–179). Con estos estudios las guías clínicas aceptaron tanto el empleo de inhibidores de aromatasa como fulvestrant en primera línea para enfermedad metastásica RH positivo y HER2 negativo (9,128).

Es importante señalar que a pesar de la eficacia general de la terapia endocrina existe alrededor de un 30% de pacientes que presenta resistencia primaria a la misma, y, por otro lado, invariablemente todas las pacientes acabarán desarrollando resistencia secundaria a lo largo del tiempo (128,180).

4.2. Bases biológicas y desarrollo de resistencias a la terapia endocrina

A partir del conocimiento del papel de los estrógenos en el cáncer de mama, de cómo actúan mediante su unión al RE y de las vías intracelulares en las que se han visto implicados es posible entender las estrategias desarrolladas para abordar el desarrollo de resistencias en el cáncer de mama RH positivo.

Los estrógenos actúan uniéndose a los RE que se encuentran fundamentalmente localizados a nivel nuclear o citoplásmico (**figura 21**). Una vez unen el estrógeno, los RE se liberan de las proteínas chaperonas y dimerizan entre sí, lo que produce un cambio de conformación y la asociación con

coactivadores, formando la unidad transcripcional que se une a los elementos de respuesta estrogénica en el DNA. Mediante esta vía los RE funcionan como factores de transcripción nucleares dependientes de ligando, ejerciendo su acción por un mecanismo de actuación genómico clásico (**figura 21**, vía A) (181,182). De esta manera los RE inducen la transcripción de numerosos genes implicados en proliferación y control del ciclo celular, como *CCND1*, entre otros, y genes relacionados con la supervivencia, la invasión y la angiogénesis (181). Por otra parte, los RE también pueden actuar a través de una vía genómica no clásica, donde intervienen otros factores de transcripción, como algunos miembros de las familias AP-1/SP-1, que modulan programas transcripcionales alternativos (**figura 21**, vía B) (181,183).

Existen otras dos vías a través de las cuales también actúa el RE, una independiente de estrógenos, que produce la activación del RE a través de la fosforilación inducida por factores de crecimiento; y otra vía no genómica, más rápida, que actúa a través de algunos RE localizados en la membrana celular mediante la interacción con varios factores de crecimiento de tipo tirosina-quinasa (EGFR, HER2, IGFR-1, FGFR), así como señalizadores intermedios, como proteínas de membrana y del reclutamiento de proteínas quinasas intracelulares (Src y PI3K) que activan cascadas de señalización intracelular (p.ej. AKT y MAPK) (**figura 21**, vía C y D) (184). La activación aberrante de estas dos vías puede intervenir en el desarrollo de resistencia *de novo* y adquirida a la terapia endocrina, actuando como una vía de escape y de “*bypass*” del bloqueo terapéutico del RE. Todas estas vías relacionadas con factores de crecimiento y señalización intracelular que implican a PI3K, MAPK o Src acaban convergiendo en el aumento de proliferación celular mediante la regulación del control del ciclo celular (185–187).

La aparición de mutaciones en *ESR1* es otro mecanismo por el cual se puede generar resistencia adquirida a los inhibidores de aromatasa, ya que estas mutaciones dan lugar a un receptor constitutivamente activado independientemente de la presencia de estrógenos. Estas mutaciones son muy poco frecuentes en el tumor primario pero aparecen entre el 10-50% de las pacientes pretratadas con inhibidores de aromatasa (103,174).

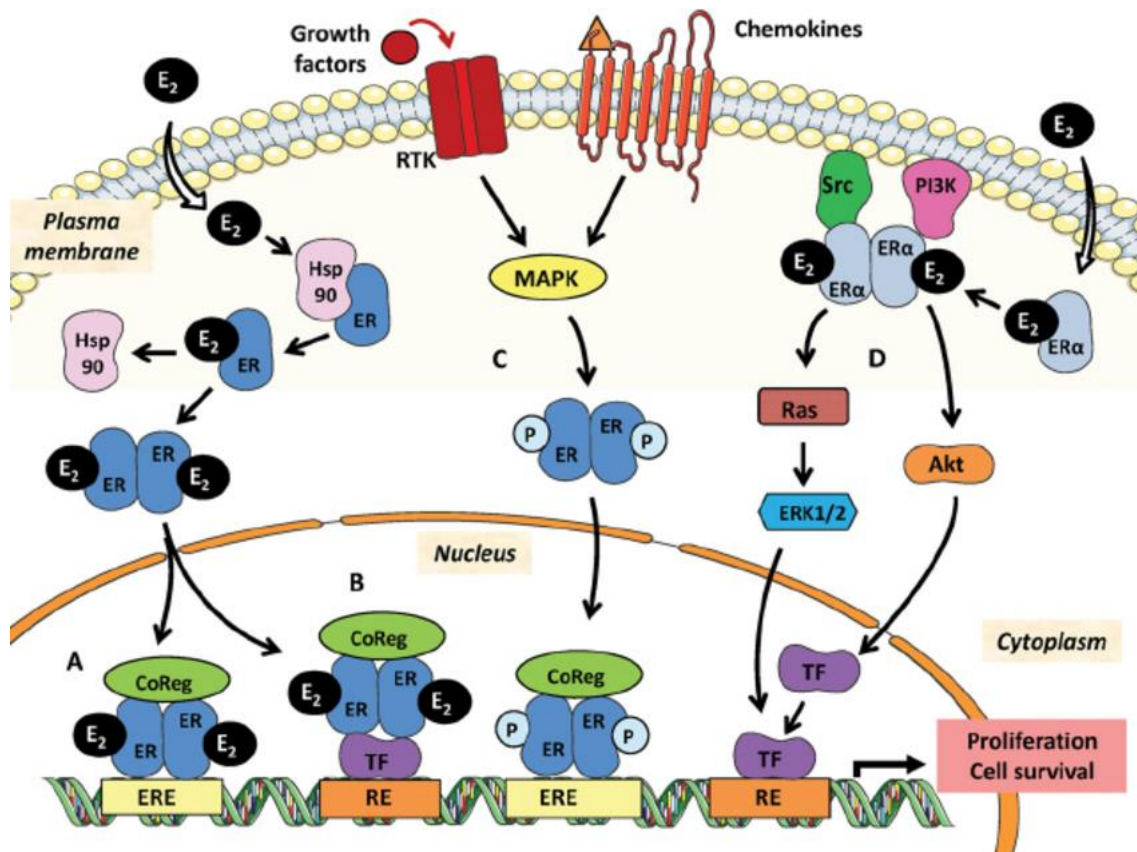


Figura 21. Vías de señalización del RE. Vía A, vía genómica clásica; vía B, vía genómica no clásica, vía C, independiente de estrógenos, activa al RE a través de la fosforilación inducida por factores de crecimiento; vía D, vía no genómica o de membrana. Imagen obtenida de Le Romancer M et al. (181). E2, estrógenos; ERE, elementos de respuesta a estrógenos; RE, elementos de respuesta a otros factores de transcripción; P, fosforilación; RTK, receptor de tirosina quinasa; CoReg, correguladores; TF, factor de transcripción; Hsp90, *heat shock protein 90* (chaperona).

La estructura del RE puede observarse en la **figura 22**. El RE se une al DNA a través del dominio de unión (DBD, del inglés, *DNA binding domain*). La región AF-1 es el lugar de fosforilación independiente de ligando (p.ej., fosforilación por MAPKs) y la región AF-2 es la dependiente de ligando.

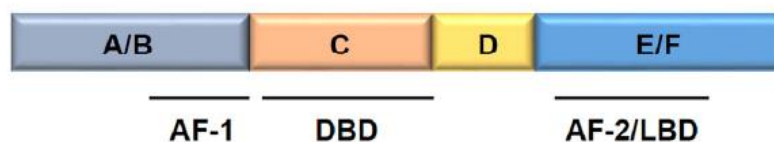


Figura 22. Estructura del RE. Los dominios A – F que constituyen el RE incluyen el dominio de la función de activación 1 (AF-1) independiente de ligando, el dominio de unión al DNA (DBD), la región bisagra y el dominio de unión al ligando (LBD)/dominio de función de activación 2 (AF-2). Imagen modificada de Patel HK and Bihani T (174).

En los últimos años se ha mejorado la eficacia de la terapia endocrina en el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo, retrasando el desarrollo de resistencias a la misma. Esto se ha conseguido gracias al desarrollo de tratamientos frente a los mecanismos responsables de regulación y progresión del ciclo celular, con el empleo de los inhibidores de CDK4/6, y también de las vías intracelulares claves en la proliferación celular, con el uso de los inhibidores PI3K o mTOR (**figura 23**).

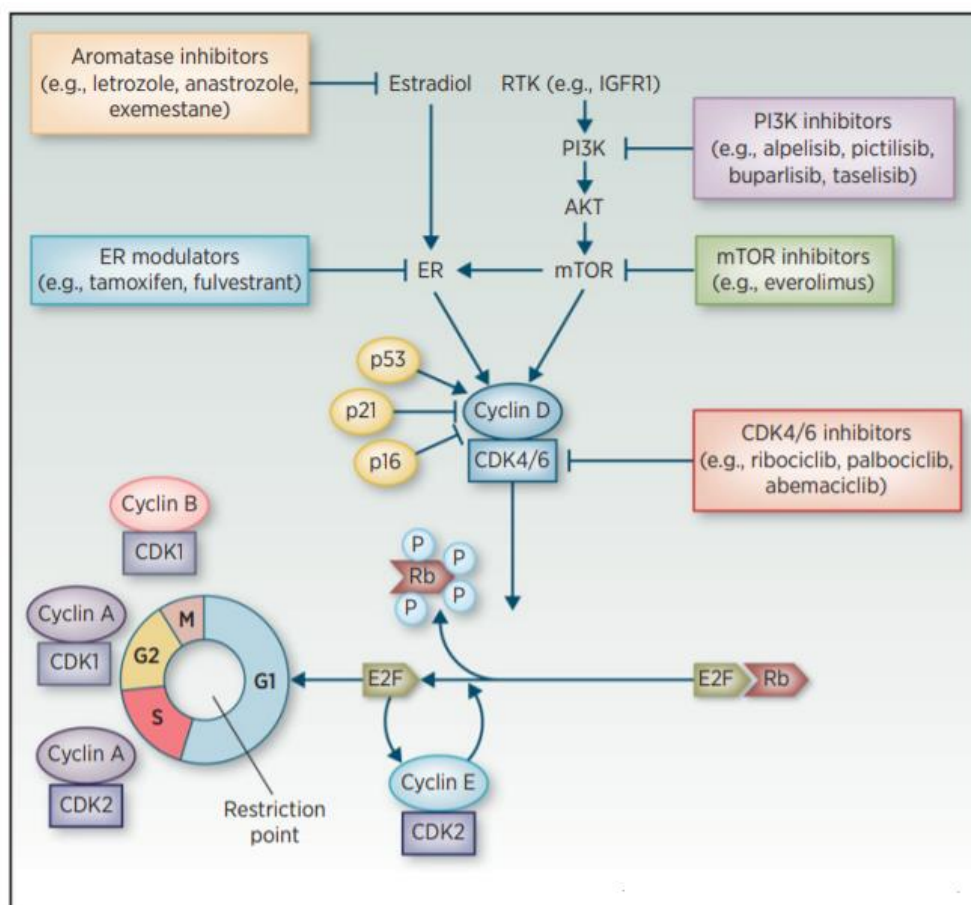


Figura 23. Regulación del control del ciclo celular en el punto de control o restricción G1/S y tratamientos dirigidos a los distintos puntos de la vía. Las señales mitogénicas convergen al nivel de la regulación positiva de la ciclina D1. CDK4/6-ciclina D1 fosforilan e inactivan la proteína Rb, lo que provoca la disociación de los factores de transcripción E2F y la regulación transcripcional de genes importantes para la transición G1/S y la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción. Modificado de Tripathy et al. (188). CDK, *cyclin-dependent kinase*; ER, *estrogen receptor*; IGF1R, *insulin-like growth factor 1 receptor*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; Rb, *retinoblastoma*; RTK, *receptor tyrosine kinase*.

4.3. Tratamiento dirigido para pacientes con tumores receptor hormonal positivo y HER2 negativo

4.3.1 Tratamiento con inhibidores de CDK4/6

4.3.1.1 Bases biológicas

La proliferación celular depende de la progresión a través de distintas fases del ciclo celular, un proceso altamente organizado donde están implicadas señales de crecimiento reguladoras, así como proteínas que monitorizan la integridad genética, las CDKs, que actúan como un complejo con su pareja ciclina (**figura 23**) (188,189). Las CDK4 y CDK6 son activadas por la ciclina D1 de forma temprana en el ciclo celular para facilitar la progresión de este a través del punto de restricción G1/S. El complejo ciclina D1-CDK4/6 conlleva la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb), que a diferencia de otras proteínas del organismo se encuentra inactivada en estado de fosforilación. Esto permite que se liberen los factores de transcripción E2F que regulan genes fundamentales para activar la transición de la fase G1 a S, incluida la ciclina E, que se asocia con CDK2, fosforilando aún más a Rb, lo que resulta en progresión del ciclo celular más allá del punto de restricción y entrada irreversible en la fase S. Los factores E2F también regulan genes implicados en la replicación del DNA, la estructura de la cromatina o la segregación de los cromosomas (189,190).

La actividad de las CDKs está sometida a un control estrecho, es inducida por señales mitogénicas, incluyendo señales derivadas de las vías del RE y PI3K-AKT-mTOR, que promueven la síntesis de ciclina D, e inhibida por distintas proteínas inhibidoras, como p16 o p21, activada esta última a su vez por p53 en respuesta al daño de DNA (188,189).

La actividad aberrante del ciclo celular conlleva la proliferación celular descontrolada, uno de los procesos distintivos del cáncer (191). Esta actividad tiene lugar como resultado de alteraciones por encima de los complejos CDK-ciclina (p.ej. estimulación mediada por factores de crecimiento o alteraciones en vías intracelulares como PI3K) o por afectación de los propios genes que codifican proteínas del ciclo celular (p.ej. amplificación de ciclina D1, *CDK4* o *CDK6*) (189).

En el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo es muy frecuente la señalización aberrante por ciclina D1 y CDK4/6. Por un lado, el RE lleva a la transcripción de la ciclina D1, la cual interacciona con CDK4/6, siendo uno de los principales estímulos proliferativos para la célula RE positiva y, por otro lado, la amplificación de la ciclina D1 es un evento frecuente en este tipo de cáncer de mama y los

niveles aumentados de mRNA y de proteína ciclina D1 se observan hasta el 50% de los tumores, lo que se ha asociado a resistencia hormonal (192–194).

Estudios preclínicos en líneas celulares han demostrado que la inhibición de CDK4 y CDK6 atenúa la proliferación celular de líneas celulares luminales con RH positivo y su efecto es sinérgico con el tratamiento endocrino (195). CDK4 y CDK6 han mostrado también continuar promoviendo la proliferación de células de cáncer de mama en el contexto de la resistencia al tratamiento hormonal inducida in vitro y su inhibición es capaz de revertirla (196,197). Todos los datos expuestos proporcionaron una fuerte justificación para la investigación de los efectos de la inhibición de CDK4 y CDK6 en cáncer de mama.

4.3.1.2 Estudios clínicos

Los primeros inhibidores de CDKs en aparecer fueron pan-inhibidores de las distintas CDKs que resultaron poco efectivos y tóxicos. Posteriormente se diseñaron los inhibidores selectivos de CDK4/6, de los que actualmente se encuentran aprobados palbociclib, ribociclib y abemaciclib (198). En primera línea de tratamiento para enfermedad metastásica RH positivo y HER2 negativo el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 en combinación con inhibidores de aromatasa ha mostrado doblar la mediana de supervivencia libre de progresión, con incrementos absolutos de aproximadamente 12 meses frente al tratamiento endocrino en monoterapia en los ensayos pivotaes fase III PALOMA-2 (con palbociclib), MONALEESA-2, MONALEESA-7 (con ribociclib) y MONARCH-3 (con abemaciclib) (**tabla 6**) (25,28,199–202). Los estudios con los 3 inhibidores de CDK4/6 han mostrado beneficios similares, con unas *hazard ratio* (HR) de alrededor de 0.5-0.6 en todos los estudios y medianas de supervivencia libre de progresión de 28-24 meses frente a 13-16 meses con el tratamiento endocrino en monoterapia. Las tasas de respuesta se sitúan alrededor del 50-60% en las pacientes con enfermedad medible y el beneficio clínico en el 80% (25,199–202).

La supervivencia global, objetivo secundario de todos los estudios, también ha resultado ser superior en el brazo de la combinación en el estudio MONALEESA-7 con ribociclib en pacientes premenopáusicas, con una HR de 0.71 (intervalo de confianza (IC) al 95%, 0.54-0.95; $p=0.01$), y en el estudio MONALEESA-2, con una HR de 0.76 (IC al 95%, 0.63-0.93; $p=0.04$) (24,28,201–203). Se esperan todavía resultados del resto de estudios.

La adición de un inhibidor de CDK4/6 a fulvestrant en pacientes previamente expuestos a tratamiento endocrino también ha supuesto un aumento de supervivencia libre de progresión en los estudios PALOMA-3, MONARCH-2 y MONALEESA-3 (204–206). Estos tres estudios fase III muestran

datos similares con los tres fármacos, con HR para supervivencia libre de progresión de entre 0.4-0.6 y medianas de supervivencia libre de progresión de 9.2 meses con palbociclib en el estudio PALOMA-3 (estudio que permitía varias líneas de tratamiento previo) frente a 3.8 meses en el brazo con fulvestrant en monoterapia; 16.4 meses en el brazo con abemaciclib versus 9.3 con fulvestrant el MONARCH-2; y 20.5 frente a 12.8 meses en el MONALEESA-3, que incluía pacientes tanto en primera como segunda línea (204–206). La supervivencia global también ha resultado superior con los tres inhibidores, con HR de 0.7-0.8 (**tabla 6**) (204,207,208).

Un reciente metaanálisis ha observado la superioridad de los regímenes con inhibidores de CDK4/6 sobre la monoterapia con tratamiento hormonal, mostrando una equivalencia sustancial entre los tres inhibidores en términos de supervivencia libre de progresión y ninguna diferencia con la quimioterapia (163).

Tabla 6. Resumen de ensayos con la combinación de inhibidores de CDK4/6 y terapia endocrina en cáncer de mama metastásico HR positivo y HER2 negativo.

	PALOMA-2 (203)	MONALEESA-2 (28,201)	MONALEESA-7 (24,25)	MONARCH-3 (202)	PALOMA-3 (205,207)	MONARCH-2 (204)	MONALEESA-3 (206,208)
Diseño	LTZ/Pbo vs LTZ/Palbo	LTZ/Pbo vs LTZ/Ribo	TE/Pbo* vs TE/Ribo*	LTZ/Pbo vs LTZ/Abema	FVT/Pbo vs FVT/Palbo	FVT/Pbo vs FVT/ Abema	FVT/Pbo vs FVT/ Ribo
No. pts	666	668	672	493	521	699	726
Tto previo	No progresión a IA	No progresión a IA	No progresión a IA (permitida 1L QT)	No progresión a IA	Progresión a IA (permitida 1L QT)	Progresión a IA	Progresión o no a IA
SLP (m)	14.5 vs 27.6 HR 0.56 (p<0.001)	16 vs 25.3 HR 0.56 (p<0.001)	13 vs 23.8 HR 0.55 (p<0.001)	14.8 vs 28.24 HR 0.54 (p<0.001)	3.8 vs 9.2 HR 0.42 (p<0.001)	9.3 vs 16.4 HR 0.55 (p<0.001)	12.8 vs 20.5 HR 0.59 (p<0.001)
SG (m)	No reportada	51.3 vs 63.9m (HR 0.76; p=0.04)	49 vs NA (HR 0.71; p=0.01)	No reportada	28.0 vs 34.8 (HR 0.81; p=0.022)	37.3 vs 46.7 (HR 0.76; p=0.014)	41.5 vs 53.7 (HR 0.73; IC 0.59-0.90)
TR† y BC†	44.4 vs 55.3% 70.3 vs 84.9%	37.1 vs 52.7% 71.8 vs 80.1%	36 vs 51% 67 vs 80%	43.8 vs 59.2% 71.5 vs 78%	11 vs 25% 36 vs 64%	21.3 vs 48.1% 51.8 vs 73.3%	28.7 vs 40.9% 59.7 vs 69.4%
ESMO-MCBS	3	5	5	3	4	4	4

LTZ, letrozol; Pbo, Placebo; Palbo, palbociclib; TE, terapia endocrina; Ribo, ribociclib; Abema, abemaciclib; FVT, Fulvestrant; Pts, pacientes; Tto, tratamiento; IA: inhibidor de aromatasa; L, línea, QT, quimioterapia; SLP, supervivencia libre de progresión; SG, supervivencia global; TR, tasa de respuesta; BC, beneficio clínico; m, meses; HR, *hazard ratio*; NA, no alcanzada, ESMO-MCBS, escala de magnitud de beneficio clínico de ESMO.

*Terapia endocrina con inhibidor de aromatasa o tamoxifeno y goserelina.

† En pacientes con enfermedad medible.

Otro reciente metaanálisis ha mostrado que el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 junto con terapia endocrina aumenta también la supervivencia global independientemente de la edad, el estatus menopáusico, la sensibilidad endocrina y el compromiso visceral (209).

Los resultados de los estudios pivotaes anteriormente expuestos han dado lugar a la aprobación desde 2015 de los distintos inhibidores de ciclinas por parte de la FDA y por la EMA. Palbociclib fue el que recibió la primera aprobación por parte de la FDA (210–215).

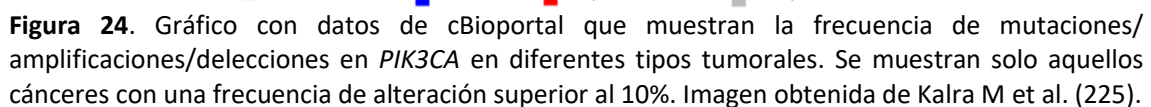
En pacientes politratadas también existe evidencia clínica del beneficio del tratamiento con inhibidores de CDK4/6. En el ensayo clínico fase II de un solo brazo MONARCH-1 con abemaciclib en monoterapia en pacientes tratadas con múltiples líneas se observó un 19.7% de tasa de respuestas y un beneficio clínico del 42.4% (216–220). Recientemente el ensayo fase II nextMONARCH que randomizaba a pacientes politratadas con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo a recibir abemaciclib 150mg con tamoxifeno versus abemaciclib 150mg/12h o abemaciclib 200mg, mostró que la combinación aumentaba la supervivencia global (24.2 meses con la combinación frente a 20.8 meses con abemaciclib 150mg y 17.0 meses con abemaciclib 200mg). La HR de la combinación frente a abemaciclib 150mg fue de 0.63 (IC 95% 0.40-0.97, $p=0.034$) (221).

Las guías clínicas reconocen el empleo de inhibidores de CDK4/6 como opción de primera línea en el cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo junto con tratamiento endocrino, salvo que exista una situación de crisis visceral o no se disponga de más opciones de terapia endocrina (**figura 20**). El tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y terapia hormonal es también de elección en segunda línea y líneas sucesivas si no se ha recibido previamente (9,128,161).

4.3.2. Tratamiento con inhibidores de PI3K

4.3.2.1. Bases biológicas

La vía PI3K-AKT-mTOR es una de las principales vías de señalización en células humanas, implicada en procesos fisiológicos esenciales como el metabolismo de la glucosa, en la supervivencia, proliferación, crecimiento y motilidad celular (222–224). Su desregulación es frecuente en numerosos cánceres humanos, lo que conduce al crecimiento oncogénico, la proliferación y la invasión (**figura 24**). En el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo la activación aberrante de la vía se ha observado con especial frecuencia, bien mediada por receptores de factores de crecimiento, por mutaciones activadoras en los genes que codifican las subunidades de PI3K o en otros genes como *AKT*, o por la pérdida de la regulación negativa de PTEN (39,196).



PI3Kα es un heterodímero proteico formado por la subunidad catalítica p110α (codificada por el gen *PIK3CA* localizado en el cromosoma 3) y la subunidad reguladora p85α (codificada por el gen *PIK3R1* localizado en el cromosoma 5). Las mutaciones de *PIK3CA* tienen especial relevancia en el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo ya que se han observado hasta en el 30-40% de estos tumores. Se trata generalmente, además, de mutaciones troncales, que permanecen clonalmente dominantes a lo largo de la evolución de la enfermedad, aunque se han descrito con una frecuencia discretamente superior en las muestras de tumores metastásicos en comparación con las de primarios y tras tratamiento endocrino (39,227–230).

52

la activación de AKT se produce una activación de complejo 1 de mTOR (mTORC1) que promueve el crecimiento celular y la proliferación (**figura 25**). Esta cascada es antagonizada por PTEN, que convierte de nuevo PIP3 en PIP2 (223).

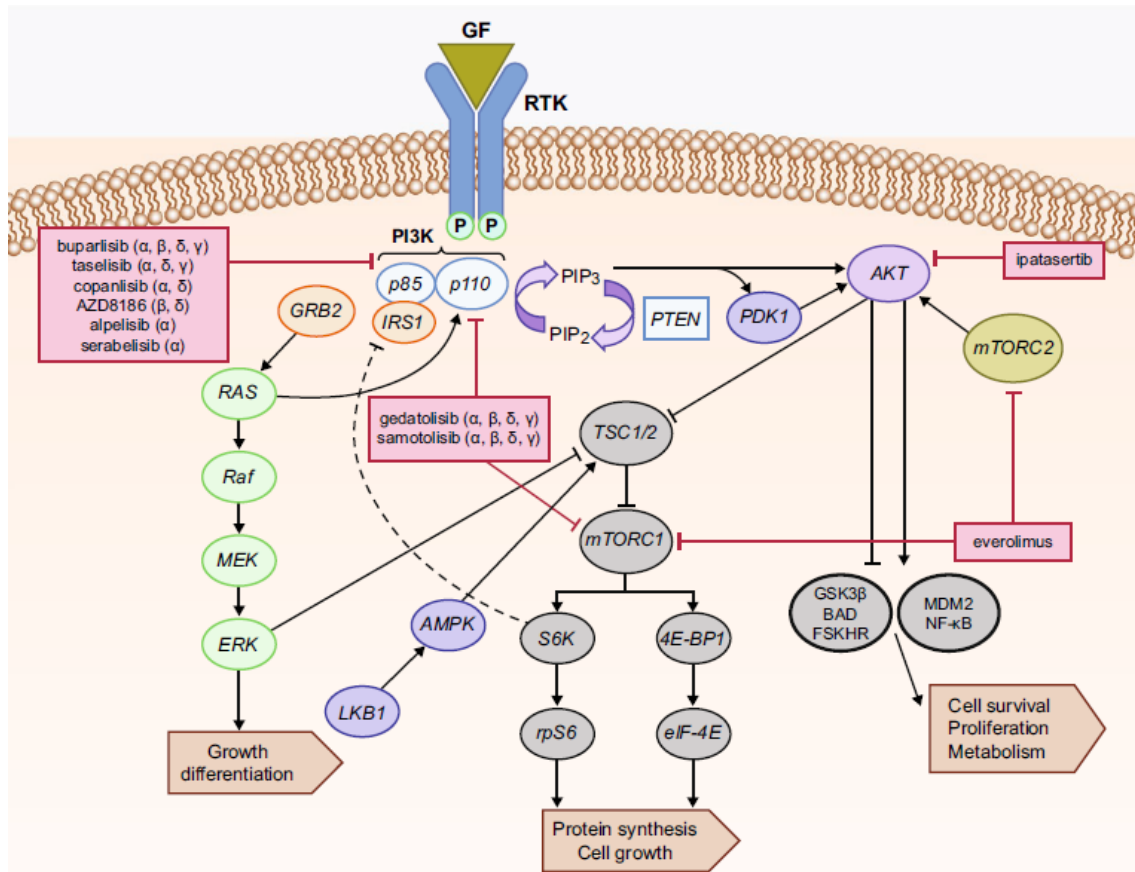


Figura 25. Vía PI3K-AKT-mTOR y fármacos dirigidos a las distintas dianas terapéuticas. Imagen obtenida de Dienstmann et al. (232). AMPK, AMP-dependent protein kinase; GF, growth factor; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; IRS1, insulin receptor substrate 1; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.

En el cáncer de mama las alteraciones más comunes son las mutaciones oncogénicas en *PIK3CA* en forma de sustituciones de nucleótido único que activan constitutivamente la proteína, mientras que las amplificaciones en ausencia de mutación son relativamente raras (233,234). Las mutaciones activadoras en *PIK3CA* más frecuentes tienen lugar en los dominios helical (E545K y E542K en el exón 9), el dominio quinasa (H1047R en el exón 20) y el dominio C2 (exón 7) de la proteína, que constituyen los llamados puntos calientes o “hot spot”, que son regiones en el genoma susceptibles de mutar con una frecuencia inusualmente más elevada (235). Las mutaciones en el dominio helical mimetizan la activación que se produce por receptores de factores de crecimiento mientras que las del dominio quinasa aumentan la actividad lipídica de la quinasa, y las del dominio C2 inducen o facilitan cambios conformacionales que aumentan la actividad de PI3Kα (236–238). Existe también una larga cola de mutaciones menos frecuentes que se producen a lo largo del gen *PIK3CA*, la mayoría

de las cuales conducen a una activación parcial en modelos bioquímicos y celulares. Estas otras mutaciones probablemente se encuentran infraestimadas ya que los estudios iniciales no secuenciaban todos los exones, y sus consecuencias funcionales y clínicas son menos claras que las de las mutaciones “*hot spot*”. Si bien estos mecanismos mutacionales adicionales pueden ser distintos, es probable que converjan en un modelo en el que las mutaciones de *PIK3CA* abren estructuralmente el complejo PI3K, aumentando la unión a la membrana y la actividad de la quinasa (227,239,240). Aunque las mutaciones de *PIK3CA* no son las únicas alteraciones genéticas que pueden activar la vía PI3K-AKT-mTOR, la frecuencia de otras alteraciones es menor, como por ejemplo, las mutaciones en *PTEN*, poco comunes en cáncer de mama RH positivo, o las mutaciones en *AKT*, descritas solo en el 3% de estos cánceres (39,241).

Resulta fundamental señalar que existe una importante regulación cruzada entre las vías del RE y la de PI3K. Se ha observado que la activación de la vía PI3K está asociada tanto a la resistencia *de novo* como adquirida al tratamiento endocrino y que la inhibición de esta vía es capaz de revertir esta resistencia en modelos celulares y de xenografts (229,242). Por otro lado, la inhibición de PI3K en monoterapia aumenta la dependencia a la vía del RE como un mecanismo de escape para lograr la supervivencia, lo que media resistencia a la inhibición de PI3K. Esta resistencia puede ser revertida si se emplea tratamiento antiestrogénico de forma simultánea (243).

La interacción entre ambas vías es compleja y se produce a varios niveles. Por un lado, diferentes quinasas, como las MAPK, o los efectores de la vía PI3K, AKT y S6K, pueden fosforilar directamente al RE activando la vía del RE de forma independiente de ligando (**figura 20**) (184). Por otro lado, existe una interacción y regulación de la señalización del RE mediante la fosforilación de proteínas correguladoras del RE por parte de receptores de factores de crecimiento, como sucede con la fosforilación de c-Jun mediada por la vía PI3K, tras la cual c-Jun se asocia a c-Fos para formar el complejo AP1 y regular la transcripción por la vía de señalización genómica no clásica (**figura 20**) (183). Además, existe una importante interacción cruzada entre PI3K y el RE a nivel de la membrana plasmática. El RE unido a la membrana plasmática aumenta los niveles de segundos mensajeros como el AMP cíclico e inicia rápidamente la activación de varias moléculas de señalización como IGF-1R, EGFR, HER2, PI3K, MEK y Src (vía no genómica) (244).

Además, la inhibición de PI3K es capaz de inducir un estado abierto de la cromatina en el loci del RE en modelos de cáncer de mama. La histona-lisina N-metiltransferasa 2D (KMT2D) es necesaria para el reclutamiento de FOXA 1, PBX1 y el RE en los loci diana del RE y la activación de la transcripción dependiente del RE. AKT se une y fosforila a KMT2D, atenuando la actividad metiltransferasa, induciendo una pérdida de unión de KMT2D a los genes diana del RE y una supresión de la

transcripción dependiente de RE (vía genómica), mientras que la inhibición de PI3K aumenta la actividad de KMT2D (223,245).

La interacción multidireccional entre las vías del RE y la de PI3K, fundamentales ambas para la supervivencia de la célula mamaria RH positivo, explica la falta de eficacia de la monoterapia cuando existen mutaciones en *PIK3CA*. Esta interrelación proporciona un racional molecular para inhibir simultáneamente ambas vías en busca de un efecto sinérgico y un mayor control de la enfermedad (227).

El valor pronóstico de las mutaciones de *PIK3CA* en cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo es algo controvertido. En estadios tempranos se ha sugerido que las pacientes con mutaciones pudieran presentar mayor supervivencia y, por el contrario, en el escenario metastásico las mutaciones parecen conferir peor supervivencia global y un menor beneficio de la quimioterapia (246–249). Por otro lado, no se ha observado que la presencia de mutaciones en *PIK3CA* condicione menor beneficio a los inhibidores de CDK4/6 (140).

En el cáncer de mama HER2 positivo las mutaciones de *PIK3CA* han mostrado conferir peor pronóstico, sugiriendo una relación entre esta vía y la del receptor HER2, lo que ha proporcionado el racional para la realización de estudios con la combinación de anti-HER2 con inhibidores de la vía PI3K (250,251).

4.3.2.2 Estudios clínicos

Los estudios iniciales con inhibidores de PI3K se llevaron a cabo con fármacos pan-inhibidores como buparlisib o pictilisib que inhibían todas las isoformas de la subunidad catalítica. Estos fármacos en combinación con terapia endocrina mostraron beneficios modestos pero alta toxicidad, lo que limitó su desarrollo ulterior (252–254). Posteriormente, los inhibidores selectivos, como el inhibidor específico de la subunidad catalítica α , alpelisib, han mostrado actividad con mejor perfil de toxicidad (255). Alpelisib (BYL719; PIQRAY®, Novartis Pharmaceuticals) es un inhibidor α -selectivo de PI3K, biodisponible por vía oral, 50 veces más potente frente a PI3K α que otras isoformas, que ha demostrado sinergismo con fulvestrant en modelos preclínicos, en estudios fase I y recientemente en el ensayo de fase III SOLAR-1 (255,256).

El estudio SOLAR-1, un ensayo de fase III aleatorizado, evaluó el tratamiento con alpelisib en combinación con fulvestrant frente a placebo con fulvestrant en 572 pacientes postmenopáusicas o varones que hubieran sido tratados previamente con un inhibidor de aromatasa y no hubieran

recibido quimioterapia para la enfermedad avanzada (255). El análisis de las mutaciones de *PIK3CA* se realizó mediante un test de Novartis basado en PCR y el kit QIAGEN theascreen® *PIK3CA* RGQPCR. Estas pruebas realizaban PCR múltiple a tiempo real sobre tejido parafinado derivado del tumor primario o de las metástasis y analizaban 11 mutaciones “hot spot” en *PIK3CA* (tabla 7) (257).

Exon 7	C420R
Exon 9	E542K; E545A; E545D; E545G; E545K; E545X ^a ; Q546E; Q546R; Q546X ^a
Exon 20	H1047L; H1047R; H1047X ^a ; H1047Y

^aThe Novartis clinical trial assay does not differentiate all mutations and reports E545X for E545A/D/G/K mutations, Q546X for Q546E/K/R mutations, and H1047X for H1047L/R/Y mutations. Table.

PIK3CA Mutations

Tabla 7. Mutaciones en *PIK3CA* analizadas por el kit QIAGEN theascreen® *PIK3CA* RGQ PCR y el test de PCR de Novartis en el estudio SOLAR-1. Imagen obtenida de Rugo et al. (257).

En la cohorte de pacientes con mutación de *PIK3CA* alpelisib mostró una supervivencia libre de progresión de 11.0 meses frente a 5.7 meses (HR 0.65; IC 95% 0.50-0.85, $p<0.001$). La tasa de respuestas (26.6 frente a 12.8%) y el beneficio clínico (61.5 frente a 45.3%) también favorecieron al brazo de alpelisib con fulvestrant. La tasa de respuestas en la cohorte de mutaciones con enfermedad medible se duplicó (16.2 frente a 35.7%; $p<0.001$). En el grupo de pacientes sin mutación en *PIK3CA* (n=231) alpelisib no mejoró la supervivencia libre de progresión de forma estadísticamente significativa, con 7.4 frente a 5.6 meses (HR 0.85; IC 95% 0.58-1.25) (255).

En un análisis de subgrupos del ensayo SOLAR-1 también se observó un beneficio estadísticamente significativo en la supervivencia libre de progresión para alpelisib en pacientes con mutaciones en *PIK3CA* detectadas en sangre mediante el estudio de ctDNA, con una supervivencia libre de progresión en los pacientes con mutación de 10.9 con alpelisib frente a 3.6 meses con placebo (HR 0.55; IC 95% 0.39-0.79; $p<0.001$) (258). El beneficio de administrar alpelisib fue constante en todos los subgrupos de pacientes. La supervivencia global, objetivo secundario del estudio, fue de 39.3 meses comparada con 31.4 meses con solo fulvestrant, pero no resultó estadísticamente significativa (HR 0.86, IC 95% 0.64-1.15; $p=0.15$) (259).

La combinación de fulvestrant con alpelisib recibió la aprobación de la FDA en mayo de 2019 junto con la prueba diagnóstica QIAGEN theascreen® *PIK3CA* RGQ PCR en muestras de tejido tumoral y/o en ctDNA como técnica para la selección de los pacientes (260,261). Sin embargo, sabemos que

existen otras mutaciones en *PIK3CA* que no forman parte del panel theascreen® pero que también podrían ser predictoras de beneficio al mismo (262,263). Si bien estas mutaciones no fueron consideradas en el estudio SOLAR-1, existen datos que apoyan su probable valor como biomarcadores predictivos de beneficio a la inhibición de PI3K (262–264). De hecho, la FDA aprobó también los test diagnósticos basados en secuenciación dirigida FoundationOne® CDx y FoundationOne® Liquid CDx, y la EMA dio la aprobación a alpelisib en julio de 2020 sin exigir una prueba específica para la detección de mutación (265,266). La puntuación obtenida por la ESMO – MCBS fue de 3.

Las guías clínicas recomiendan el empleo de alpelisib en segunda línea (**figura 20**), tras la progresión a inhibidores de CDK4/6, dado el mayor beneficio mostrado por estos últimos (9,128). Aunque en el estudio SOLAR-1 solo 20 pacientes (6%) habían recibido previamente inhibidores de CDK4/6, también se observó beneficio en este grupo, con una supervivencia libre de progresión de 5.5 versus 1.8 meses (HR 0.48, IC 95% 0.17-1.36) (258). El estudio fase II BYLieve llevado a cabo posteriormente también ha mostrado beneficio de alpelisib tras el empleo de inhibidores de CDK4/6, con el 50.4% de las pacientes sin progresión de enfermedad a los 6 meses y con una mediana de supervivencia libre de progresión de 7.3 meses (267). Esto es especialmente relevante dado el aumento de la probabilidad de aparición de mutaciones en *PIK3CA* tras el tratamiento endocrino con o sin inhibidores de CDK4/6, y el empleo generalizado en la práctica clínica de inhibidores de CDK4/6 en primera línea (229).

4.4. Otros tratamientos aprobados

Dada la relevancia de la vía PI3K-AKT-mTOR en el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo y su implicación en el desarrollo de resistencia a la terapia endocrina se han desarrollado y estudiado numerosos fármacos dirigidos a inhibir distintos puntos de esta. Los primeros inhibidores de la vía PI3K que llegaron a la clínica fueron los inhibidores de mTORC1. Entre ellos, everolimus demostró beneficio en el estudio fase III BOLERO-2 donde pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo metastásico que hubieran progresado a un inhibidor de aromatasa no esteroideo eran aleatorizadas a recibir exemestano con o sin everolimus. La supervivencia libre de progresión fue de 6.9 frente a 2.8 meses (HR 0.43; IC 95% 0.35-0.54, $p < 0.001$) (102). En base a estos resultados, everolimus fue aprobado y las guías clínicas recogen esta opción terapéutica tras la progresión a una primera línea hormonal (9,128,161). Además, everolimus no solo ha mostrado beneficio en combinación con exemestano si no también cuando se asocia con otra pareja de hormonoterapia como fulvestrant o tamoxifeno (268,269).

Everolimus no ha sido comparado directamente con alpelisib, sin embargo, recientemente se ha comunicado una comparación indirecta entre los dos estudios de registro (BOLERO-2 y SOLAR-1) en pacientes con mutación de *PIK3CA* que, tras ajustar las poblaciones por las principales variables pronósticas, sugiere mejores resultados para alpelisib y fulvestrant, aunque las conclusiones están muy limitadas por el escaso número de pacientes, por la diferente terapia endocrina utilizada (exemestano y fulvestrant, respectivamente) y porque en la rama de monoterapia en la población del BOLERO-2 los resultados son inferiores a los de la monoterapia en el estudio SOLAR-1 (267).

En base a los datos disponibles hasta la fecha, aunque la secuencia óptima de tratamiento en cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo es incierta, las guías apoyan el empleo de alpelisib junto con tratamiento endocrino tras la progresión a inhibidores de CDK4/6 en pacientes con mutaciones en *PIK3CA*, y everolimus con terapia endocrina en las pacientes sin mutación o estado mutacional no conocido (**figura 20**) (9,128).

Además de la inhibición de mTORC1, se encuentran en desarrollo otros fármacos dirigidos frente a la vía PI3K-AKT-mTOR, como los inhibidores selectivos de AKT que previenen la activación de mTORC1 y con lo que se reportado actividad prometedora en pacientes con mutaciones en *AKT1* (270,271).

Otras opciones terapéuticas para la enfermedad RH positivo y HER2 negativa más allá de la segunda línea incluyen otros tratamientos hormonales en monoterapia no empleados previamente (**tabla 5**). Abemaciclib también puede ser utilizado en monoterapia (220).

Además de la terapia endocrina, existen distintas opciones citotóxicas ya mencionadas previamente. Las pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1* y *BRCA2* pueden recibir tanto olaparib como talazoparib tras la progresión a terapia endocrina y a tratamiento con antraciclinas y/o taxanos recibidos en la neoadyuvancia, adyuvancia o en el escenario metastásico, salvo que la paciente no sea candidata a esta quimioterapia (9,128,272–275). La aprobación de ambos fármacos se basa en dos estudios fase III, OlmpiAD y EMBRACA, que demostraron beneficio de olaparib y talazoparib, respectivamente, en pacientes HER2 negativas con mutación germinal en *BRCA1* o *BRCA2* que habían recibido hasta 2-3 líneas previas (276,277). Ambos inhibidores de PARP demostraron aumento de supervivencia libre de progresión con respecto a la quimioterapia de elección del investigador con una tasa de respuesta de alrededor del 60%, frente a menos del 30% con quimioterapia y mejor perfil de toxicidad y calidad de vida (276,277).

5. Biomarcadores en cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo y HER2 negativo

5.1. Biomarcadores predictores de beneficio a inhibidores de CDK4/6

Aunque la incorporación de los inhibidores de CDK4/6 junto con el tratamiento endocrino ha supuesto un cambio de paradigma en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo, mejorando globalmente su supervivencia, existe un 20% de pacientes que no obtiene ningún beneficio con el empleo de esta terapia. Sin embargo, aunque se han propuesto y estudiado diferentes biomarcadores, tanto genómicos, como basados en expresión génica y proteica o en cambios en el ctDNA, actualmente no se dispone de claros biomarcadores validados que permitan identificar a aquellas pacientes con resistencia intrínseca a inhibidores de CDK4/6 (278). Esto es particularmente desalentador dada la posible eficacia de formas alternativas de terapia en estas pacientes, incluyendo los inhibidores de PI3K, los inhibidores de mTOR, así como la quimioterapia.

5.1.1. Biomarcadores basados en alteraciones de DNA

Existe evidencia preclínica que sugiere que las alteraciones en *RB1* o en otros genes reguladores del ciclo celular pueden conferir resistencia a los inhibidores de CDK4/6 (279). En la práctica clínica la pérdida de *RB1* se ha asociado a resistencia intrínseca al tratamiento (280–283). Sin embargo, la aparición de esta alteración sucede en un porcentaje muy pequeño de casos, detectándose con frecuencia algo mayor, aunque inferior al 10%, durante el curso del tratamiento, por lo que pareciera estar más asociada al desarrollo de resistencias secundarias que intrínsecas (79,279,284).

En un gran análisis combinado de los tres ensayos aleatorizados con ribociclib, MONALEESA-2, -3 y -7, se analizó el ctDNA obtenido antes del inicio del tratamiento en 1503 pacientes mediante secuenciación con un panel dirigido de 557 genes (284). Los resultados de este estudio identificaron mutaciones en *FRS2*, *MDM2*, *PRKCA*, *ERBB2*, *AKT1 E17K* y *BRCA1/2* como potenciales biomarcadores predictivos de mayor sensibilidad a ribociclib y mutaciones en *CHD4*, *ATM* o *CDKN2A/2B/2C*, como posibles biomarcadores de resistencia. Sin embargo, estos resultados son exclusivamente generadores de hipótesis y deben ser confirmados (284).

En contraposición, otros estudios que han analizado biomarcadores relacionados con el ciclo celular (incluyendo la pérdida de *CDKN2A*), como las amplificaciones de ciclina D1 o ciclina E1, que también habían mostrado resultados prometedores en modelos preclínicos, no han confirmado su utilidad posteriormente en la práctica clínica (195,199,283,285–288). Se ha observado que otras alteraciones

relacionadas con el ciclo celular, como la amplificación de *CDK6*, podrían adquirirse durante el curso del tratamiento generando resistencias, pero no existe evidencia clara sobre su papel en la resistencia inicial (289).

Las alteraciones que inactivan (mutaciones truncantes y deleciones homocigotas) *FAT1*, un gen supresor de tumores que codifica para una proteína cadherina de membrana que activa la vía Hippo, suprimiendo el crecimiento celular, se han asociado a incrementos en la expresión de *CDK6* y resistencia a los inhibidores tanto a nivel preclínico como clínico (283). Aunque la frecuencia de estas alteraciones en tumores antes de iniciar el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 es inferior al 2%, sí parece tratarse de un potencial biomarcador de resistencia intrínseca a los mismos (283). Por otro lado, mutaciones en otros genes, como *PIK3CA*, *TP53*, *FGFR1* o *ESR1*, parecen presentar valor pronóstico, pero tampoco han mostrado ser predictoras de beneficio al tratamiento (207,283,284,288,290,291).

5.1.2. Biomarcadores basados en expresión génica

Se ha observado que los niveles de expresión de *CCNE1*, gen que codifica la ciclina E, podrían ser predictores de beneficio a inhibidores de CDK4/6. El complejo ciclina E-CDK2 puede sortear al complejo CDK4/6-ciclina D1 fosforilando a Rb, de manera que se libera E2F y se produce la progresión de la fase G1 a S (**figura 23**) (279). En un estudio de biomarcadores asociado al ensayo PALOMA-3 se objetivó un mayor beneficio de palbociclib en aquellas pacientes con bajos niveles de expresión de *CCNE1* frente a aquellas con altos niveles, observándose una interacción estadísticamente significativa (292). Existe también evidencia derivada de ensayos en neoadyuvancia con inhibidores de CDK4/6 donde los altos niveles de expresión de *CCNE1* se han asociado a un menor arresto del ciclo celular (279,293,294). Recientemente, un estudio de biomarcadores asociado al ensayo PEARL en 219 pacientes tratadas con palbociclib y fulvestrant o capecitabina, mostró también que los altos niveles de *CCNE1* estaban asociados en el análisis multivariante a mayor riesgo de progresión en las pacientes tratadas con palbociclib y fulvestrant en comparación con capecitabina, mientras que no existían diferencias en los tumores con baja expresión de *CCNE1*. Sin embargo, el test de interacción no resultó estadísticamente significativo en este estudio (295). En el estudio MONALEESA-7 también se observó una tendencia a un mayor beneficio en supervivencia libre de progresión en las pacientes con bajos niveles de expresión de *CCNE1* (296). Sin embargo, este beneficio no fue observado en los estudios PALOMA-2 ni MONALEESA-3 (297,298). En conjunto, los datos descritos no descartan un potencial beneficio de palbociclib, aunque probablemente menor, en el grupo con alta expresión de *CCNE1*, por lo que se requieren validaciones metodológicas y clínicas adicionales para dilucidar el papel de la expresión de *CCNE1* como biomarcador de beneficio con inhibidores de CDK4/6 (292).

Además de *CCNE1*, la expresión de otros genes ha sido explorada con resultados algo contradictorios en algunos casos. En el estudio PALOMA-2 los bajos niveles de *PD-1* se asociaron a mayor beneficio de palbociclib. Por otro lado, los tumores con mayor activación de vías de factores de crecimiento, como, aquellos con niveles de mRNA de *FGFR2* y *ERBB3* más altos, se asociaron también con un mayor beneficio. Asimismo, los análisis de expresión génica realizados en modelos preclínicos y en pacientes del estudio MONALEESA-2 mostraron que la baja expresión de *FGFR1* se asoció a mayor beneficio de ribociclib (299). Sin embargo, en el estudio MONALEESA-7, no se observaron diferencias en el beneficio de ribociclib en función de los niveles de *FGFR1*, tampoco en función de los de *ESR1* ni otros genes relacionados con la proliferación como *MKI67*. Sí se observó una tendencia a mayor beneficio en términos de supervivencia libre de progresión en pacientes con altos niveles de expresión de *CCND1*, *IGFR1* y *ERBB3* (296). Los análisis llevados a cabo en el estudio MONALEESA-3 tampoco fueron sugestivos de mayor beneficio de ribociclib en función de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular (como *MKI67* o *MYC*), ni con la vía de CDK4/6 (como *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *CDK2*, *CDK4*, *CDK6*, *RB1* o *TP53*, entre otros), la vía de las MAPK (como KRAS) o con receptores tirosina quinasas (p.ej., *EGFR*, *ERBB2-4* o *FGFR1-4*) (298). En conjunto, la evidencia actual no permite establecer claros biomarcadores a nivel de expresión de genes concretos.

Por otro lado, se ha estudiado el valor del subtipo intrínseco tumoral como biomarcador predictivo de beneficio a inhibidores de CDK4/6. Dentro de la enfermedad RH positivo y HER2 negativo los subtipos no luminales presentan un peor pronóstico y predicen resistencia endocrina, pero, además, recientemente se ha observado que el subtipo basal-like parece no beneficiarse de palbociclib en el estudio PALOMA-2 ni de ribociclib en los diferentes ensayos MONALEESA (**figura 26**) (47,286,300,301). El subtipo HER2-enriched tampoco muestra un beneficio de palbociclib, aunque sí de ribociclib con una HR inferior incluso a la obtenida para los subtipos luminales en los estudios MONALEESA (**figura 26**) (302,303). Estos resultados, aunque prometedores, requieren validación para poder tener implicaciones en la práctica clínica.

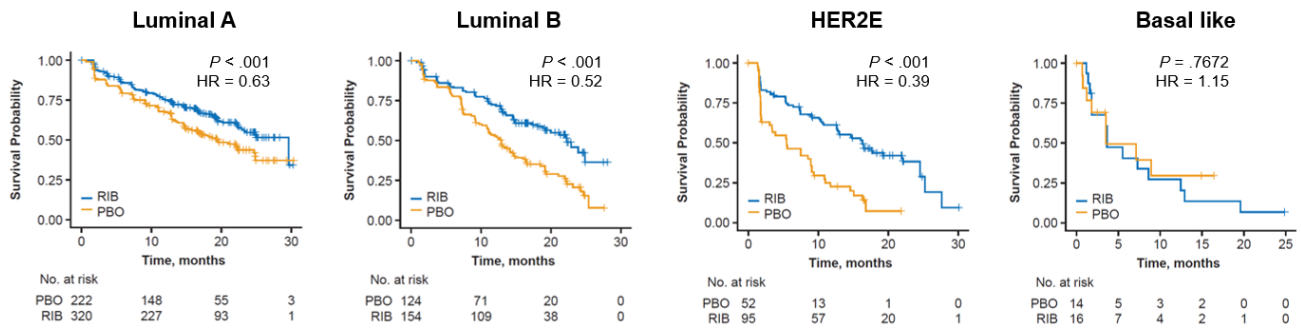


Figura 26. Supervivencia libre de progresión según el subtipo intrínseco en el análisis combinado de las pacientes de los estudios MONALEESA-2, -3 y -7. Imagen obtenida de Prat et al. (304). PBO; placebo, RIB; ribociclib.

5.1.3. Biomarcadores basados en expresión proteica

Los niveles de positividad del RE analizados por inmunohistoquímica en los estudios PALOMA-2 y PALOMA-3 no mostraron asociación con el beneficio al tratamiento (305,306). Tampoco los niveles de expresión de las proteínas ciclina E1, ciclina D1, p16, CDK6 o Rb analizados por inmunohistoquímica han resultado predictivos de beneficio terapéutico (203,287,295,305,307).

5.1.4. Dinámica precoz del ctDNA

O'Leary et al. analizaron recientemente la utilidad de la dinámica temprana del ctDNA como biomarcador predictivo de beneficio al tratamiento en pacientes con cáncer de mama tratadas en el ensayo PALOMA-3 con fulvestrant y palbociclib o placebo. Se obtuvo plasma en tres momentos temporales (basal, en el ciclo 1 día 15 y en el momento de la progresión). Se analizaron 455 muestras basales con una PCR múltiple digital para cuatro de las mutaciones "hot spot" más frecuentes de *PIK3CA* en los exones 9 y 20 (E542K, E545K, H1047R y H1047L). Este análisis identificó 100 casos (22%) con una mutación en *PIK3CA* (medido por copias mutantes/mL). Se calculó una ratio entre las muestras basales y las muestras del ciclo 1 día 15 en 73 muestras pareadas (53 de las cuales recibieron fulvestrant y palbociclib). Se estableció un punto de corte a partir de la mediana de las ratios entre los dos puntos temporales y se observó que la reducción superior a la mediana se relacionaba con la supervivencia libre de progresión ($HR\ 3.95$, $p=0.001$). Las pacientes con una ratio de reducción inferior a la mediana (mayor descenso) a las 2 semanas presentaron mejor supervivencia libre de progresión (140). Posteriormente este punto de corte se perfeccionó mediante el índice C de Harrel, índice que mide la capacidad predictiva de un modelo, y se obtuvo un nuevo punto que separaba mejor los dos grupos pronósticos, el grupo con ratio superior al punto

de corte presentó una mediana de supervivencia libre de progresión de 4.1 meses (IC 95% 3.6–5.5) frente al grupo con ratio inferior al punto de corte, en el que la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 11.2 meses (IC 95% 11.1–no alcanzado; HR 4.92; IC 95% 1.98–12.26, $p < 0.001$, $q < 0.001$) (**figura 27**). Los niveles iniciales de ctDNA con mutación de *PIK3CA* no resultaron asociados a la supervivencia libre de progresión en pacientes tratadas con palbociclib (140).

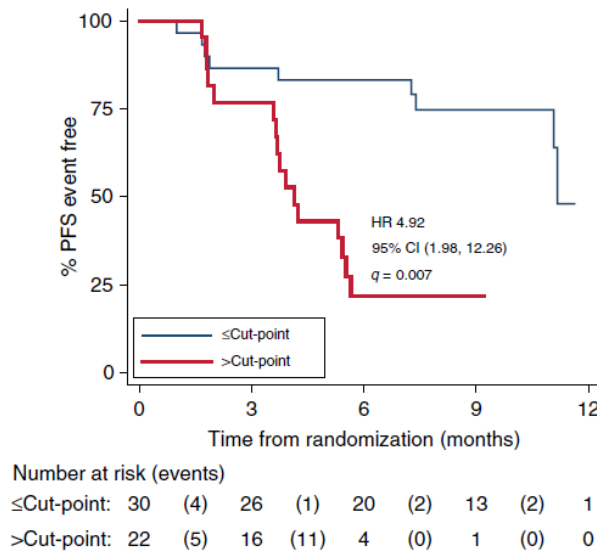


Figura 27. Gráfica Kaplan–Meier para supervivencia libre de progresión en pacientes que recibieron palbociclib y fulvestrant separadas por ratio alto o bajo utilizando el punto de corte optimizado por el índice C de Harrell. Imagen obtenida de O’Leary et al. (140).

Por otro lado, en el estudio de O’Leary se analizó también la presencia de mutaciones en el dominio de unión al ligado de *ESR1* (E380Q, S463P, L536R, Y537S, Y537C, Y537N y D538G) mediante otra PCR múltiple digital. Se identificó alguna mutación en 114 pacientes (25.6%), aunque solo 65 pacientes presentaban muestras pareadas. Se observó un descenso en el número de copias/ml tras 2 semanas de tratamiento, que fue más marcado en las pacientes que recibieron palbociclib. Sin embargo, a diferencia de lo que sucedía con *PIK3CA*, la ratio calculada a las 2 semanas del tratamiento no se asoció de forma significativa con la supervivencia libre de progresión (140).

El estudio de O’Leary apoya el empleo del análisis de ctDNA como biomarcador útil para identificar aquellas pacientes que muestran resistencia intrínseca a inhibidores de ciclinas. Sin embargo, una limitación importante de esta estrategia es que solo una pequeña proporción de pacientes presentó una mutación en alguno de los 4 “hot spot” de *PIK3CA* analizados, lo que permitió el seguimiento y la monitorización de menos de un cuarto de las pacientes del estudio (140). Esta limitación dificultaría la generalización del empleo de este biomarcador a la mayoría de las pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo tratadas con inhibidores de CDK4/6.

Hrebien et al. estudiaron el momento óptimo para analizar la dinámica precoz del ctDNA en pacientes con cáncer de mama con RH positivo y HER2 negativo metastásico, tratadas con paclitaxel y capivasertib en el ensayo clínico BEECH (141). En primer lugar, se realizó secuenciación dirigida con un panel de 14 genes en plasma, lo que permitió detectar alteraciones en 16 de 34 pacientes. Se elaboraron pruebas PCR digitales personalizadas para monitorizar a estas 16 pacientes de forma semanal durante las 4 primeras semanas del primer ciclo. Se observó un descenso en el ctDNA desde el día 8, y el día 28 se identificó como el mejor momento para determinar el cambio en el ctDNA que discriminara a las pacientes con corta frente a larga supervivencia libre de progresión (141). Aunque este estudio apoya que el mejor punto temporal para establecer la variación de los niveles de ctDNA en cáncer de mama son las 4 semanas del inicio del tratamiento, esto podría ser solo aplicable al tipo de terapia utilizada en el estudio y no es posible generalizar esta afirmación al resto de tratamientos, como a los inhibidores de CDK4/6.

Sin embargo, recientemente el estudio de Darrigues et al. en pacientes con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo metastásico tratadas con palbociclib y fulvestrant también ha apoyado que las 4 semanas son el mejor momento temporal para estudiar los cambios precoces en ctDNA en pacientes tratadas con inhibidores de CDK4/6, mostrando resultados diferentes al estudio de O'Leary (142). El trabajo de Darrigues comparó el nivel basal de ctDNA con dos momentos temporales diferentes, a los 15 y a los 30 días del inicio del tratamiento. Estos autores analizaron la presencia de mutaciones en tejido tumoral archivado con un panel de secuenciación dirigida de 15 genes (*AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *ERBB2*, *EGFR*, *FBXW7*, *HRAS*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA* y *PIK3CA*). En las pacientes en las que no se disponía de tejido se realizó un panel de secuenciación en plasma que incluía 39 genes (**tabla 8**). Las alteraciones detectadas se seguían posteriormente con una PCR digital personalizada que determinaba en plasma las mutaciones encontradas en tejido (142).

Tabla 8. Listado de 39 genes analizados por secuenciación dirigida en muestras plasmáticas en el estudio de Darrigues et al. (142).

<i>AKT1</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>ALK</i>	<i>KDR</i>	<i>NOTCH4</i>	<i>BRAF</i>	<i>KEAP1</i>	<i>NRAS</i>	<i>BRCA1</i>	<i>KIT</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>BRCA2</i>
<i>KRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PTEN</i>	<i>EGFR</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>PTPN11</i>	<i>ERBB2</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>RET</i>	<i>ERBB3</i>	<i>MET</i>
<i>STK11</i>	<i>FBXW7</i>	<i>MTOR</i>	<i>TP53</i>	<i>FGFR1</i>	<i>NF1</i>	<i>TSC1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>TSC2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>VHL</i>

El estudio analizó las ratios calculadas con los niveles medios de ctDNA (copias/mL) en el día 15 y en el día 30 con respecto a los niveles basales y mostró que una ratio inferior a 1 en el día 30 se asociaba con mejor supervivencia libre de progresión (25 versus 3 meses, HR 7.2; IC 95% 1.5–32.6, p=0.004) (**figura 28**), a diferencia de la ratio a los 15 días, que no mostró una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia libre de progresión (142). Al igual que el estudio de O'Leary, los niveles de ctDNA basales no mostraron un impacto en la supervivencia libre de progresión.

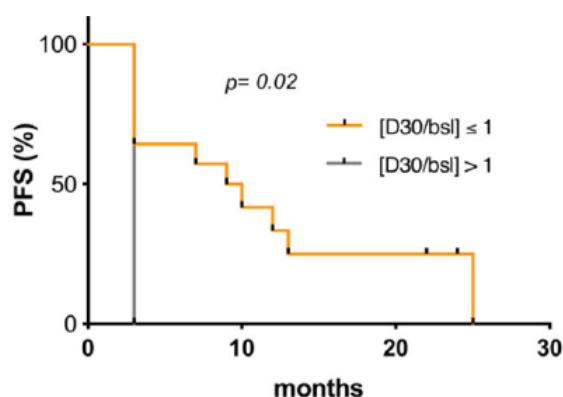


Figura 28. Supervivencia libre de progresión en función de la ratio ≤ 1 o > 1 calculada en el día 30. Imagen obtenida de Darrigues et al. (142). PFS, *progression free survival*; bsl, *basal*.

Los resultados obtenidos están limitados por el pequeño tamaño del estudio ya que, a pesar de que inicialmente participaron 61 pacientes, solo 53 disponían de tejido tumoral y solo en 22 de estas 53 pacientes se encontró alguna alteración para elaborar la PCR digital personalizada. Se realizó secuenciación en plasma en 13 de las 31 pacientes en las que no se había encontrado ninguna alteración en tejido, lo que detectó alguna alteración en 3 pacientes más. En total 25 pacientes (41%) pudieron estudiarse con PCR digital en la muestra basal pero solo 17 y 19 presentaban muestras pareadas a los 15 y a los 30 días, respectivamente. Aunque los resultados apoyan el valor de la dinámica precoz del ctDNA como biomarcador predictivo de beneficio en pacientes tratadas con inhibidores de CDK4/6, de nuevo, como sucede en el trabajo de O’Leary, la estrategia propuesta sería aplicable en menos de la mitad de estas pacientes, dado que en un amplio porcentaje no consiguió detectarse ninguna alteración (142).

Para que el estudio de la dinámica precoz de ctDNA pueda utilizarse en la práctica clínica como un biomarcador predictivo de beneficio en pacientes tratadas con inhibidores de CDK4/6 serán necesarias estrategias capaces de monitorizar a un mayor número de pacientes, además de estudios que confirmen y validen los resultados obtenidos hasta la fecha en los trabajos de O’Leary y Darrigues. Quedan, además, interrogantes abiertos respecto al mejor momento temporal para valorar la dinámica precoz del ctDNA y la metodología óptima para llevar a cabo el análisis de esta dinámica.

Actualmente, por tanto, no se dispone de ningún biomarcador validado que pueda emplearse en la práctica para detectar, de forma temprana, qué pacientes no son candidatos al tratamiento con inhibidores de CDK4/6, lo que supone una necesidad clínica no cubierta.

5.2. Biomarcadores predictores de beneficio a inhibidores de PI3K

Como se mencionaba previamente, la vía PI3K-AKT-mTOR puede ser activada por diferentes factores, donde destacan las alteraciones oncogénicas en *PIK3CA*, pero también en otros genes como *PIK3R1*, *PTEN* o *AKT* (39,241,308,309). Algunas de estas alteraciones, junto con otras, como las amplificaciones en *FGFR1/2*, las mutaciones en *KRAS* o *TP53*, se han estudiado como potenciales mecanismos de resistencia a los inhibidores de *PIK3CA*. Sin embargo, muchos de los estudios son retrospectivos y exploratorios, por lo que los resultados no son concluyentes (243,308–311). Entre todos estos biomarcadores, solo las mutaciones en *PIK3CA* han mostrado capacidad predictiva para el tratamiento con el inhibidor de PI3K α -selectivo alpelisib en el escenario metastásico (255). Sin embargo, una cuestión muy relevante es que sabemos que existen mutaciones en *PIK3CA* que no forman parte del panel theascreen® y que no han sido incluidas en el ensayo SOLAR-1, pero para las que se dispone de datos que apoyan su probable valor como biomarcadores predictivos de beneficio a la inhibición de PI3K. Por ejemplo, la mutación N345K, que no es capturada por theascreen®, está considerada como patogénica y oncogénica, confiere una ganancia de función y ha demostrado aumentar la sensibilidad a los inhibidores de PI3K en modelos preclínicos (262,263). Por otro lado, algunas mutaciones menos frecuentes, como la G1049R, han demostrado una fuerte actividad, similar a la variante “hot spot” E542K, en una plataforma de evaluación de mutaciones (263).

En este sentido, es interesante destacar el subestudio retrospectivo de biomarcadores realizado mediante secuenciación de *PIK3CA* con FoundationOne® CDx en el ensayo SOLAR-1 donde se detectó alguna mutación en 239 pacientes, incluyendo 31 en las que el test theascreen® resultó negativo. Las pacientes mostraron beneficio de recibir alpelisib, aunque no se reportaron los datos separados de las 31 pacientes con mutaciones diferentes a las detectadas por theascreen® (312).

Además, en este mismo ensayo se realizó otro análisis retrospectivo de biomarcadores en ctDNA recogido al inicio del estudio, donde se secuenció la región exónica completa de *PIK3CA*. En este estudio se dispuso de plasma en 381 pacientes (66.6%), de los cuales, 193 (50.7%) tenían una mutación en *PIK3CA* que fue detectable por PCR en el 87% de los mismos. De forma global, se observó un beneficio de alpelisib en términos de supervivencia libre de progresión en los 101 pacientes con mutaciones en *PIK3CA* detectadas mediante secuenciación de ctDNA, sin embargo, en los 13 pacientes que presentaban alteraciones detectadas por secuenciación pero no por PCR este beneficio no fue observado (313). No obstante, no queda especificado qué mutaciones concretas fueron detectadas, y, dado el pequeño tamaño muestral, tampoco es posible extraer conclusiones a partir de estos hallazgos.

Un reciente estudio que pone énfasis en esta cuestión es el estudio observacional de vida real llevado a cabo entre enero/2011 y septiembre/2020 por Rugo et al. y presentado en ASCO de 2021 (264). El trabajo analizó el perfil genómico de 31 765 muestras de tejido y 1346 biopsias líquidas de pacientes estadounidenses con cáncer de mama en las que se secuenció *PIK3CA* de forma completa con FoundationOne® CDx y FoundationOne® Liquid CDx. El 35% de todas las muestras tisulares y el 31% de las biopsias líquidas albergaban al menos una mutación en *PIK3CA*. De estas, aproximadamente 2/3 tenían exclusivamente mutaciones que habrían sido detectadas por el panel therascreen® utilizado en el ensayo SOLAR-1, el 10% de las muestras de tejido y el 14% de las biopsias líquidas presentaban mutaciones detectadas por el panel junto con mutaciones no detectadas por este, y el 19% presentaba solo mutaciones no detectadas por el panel. Estas últimas pacientes, por tanto, no serían identificadas mediante estudios de PCR que analizaran solo las mutaciones “hot spot” como el test therascreen® (**figura 29**) (264).

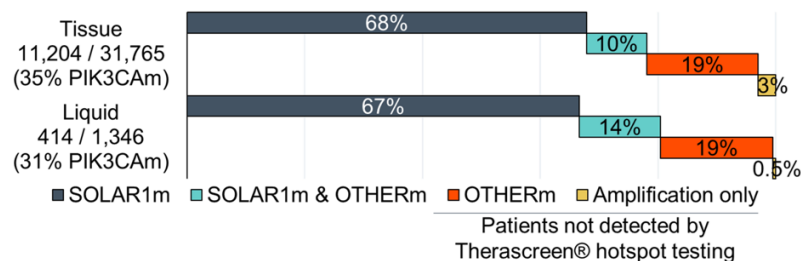


Figura 29. Distribución de mutaciones en *PIK3CA* detectadas en el estudio de mundo real de Rugo et al. Imagen obtenida de Rugo et al. (264). SOLAR1m, mutación detectada por el panel therascreen®; OTHERm, mutación no detectada por el panel therascreen®.

Las mutaciones más comunes en *PIK3CA* no analizadas en el SOLAR-1 fueron N345K, E726K y deleciones *in-frame* (dentro del marco de lectura traduccional) en el dominio de unión de la subunidad reguladora P85 y el dominio C2 (**figura 30**) (264).

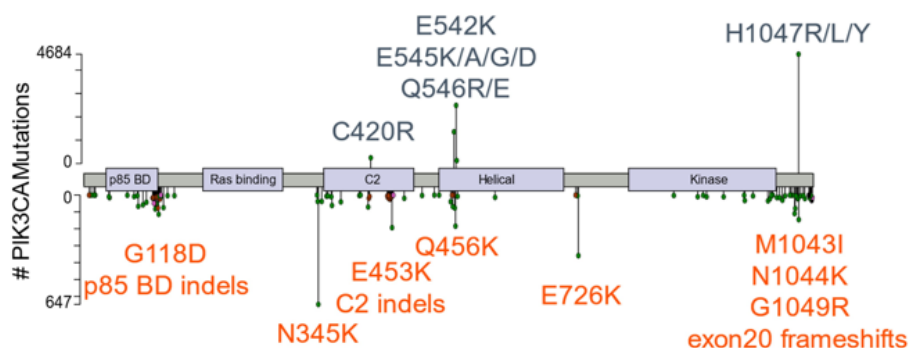


Figura 30. Representación del gen *PIK3CA* y la frecuencia de las mutaciones detectadas por therascreen® en azul, y en naranja, las mutaciones predictoras de ser activadoras que no son detectadas por therascreen®. Imagen modificada de Rugo et al. (264).

Con la información clínica disponible en 1579 pacientes se comparó el empleo de alpelisib entre las pacientes que habían recibido un informe de perfil genómico con la presencia de una mutación en *PIK3CA* después de la aprobación de alpelisib por la FDA, observándose que el 28% de aquellas con mutaciones estudiadas en el SOLAR-1 fueron tratadas con alpelisib frente solo el 15% de las que presentaban mutaciones de *PIK3CA* fuera de este grupo de mutaciones (264).

El número de pacientes sin mutaciones detectadas por el panel que fueron tratadas con alpelisib fue pequeño (n=36) e incluyó unos pocos casos con RH negativo y/o HER2 positivo. Por otro lado, muchas pacientes habían recibido múltiples líneas previas y algunas en combinaciones terapéuticas inusuales, como con abemaciclib, bicalutamida o tratamiento anti-HER2. Aunque los datos son inmaduros para muchas de las pacientes, se documentó una supervivencia libre de progresión de más de seis meses en al menos cinco pacientes, lo que sugiere un potencial beneficio de alpelisib en este grupo de pacientes con mutaciones no “*hot spot*” en *PIK3CA* (264).

El trabajo de Rugo et al. muestra como las estrategias de secuenciación detectan mutaciones de *PIK3CA* en un mayor número de pacientes con cáncer de mama metastásico que las pruebas que analizan solo unos pocos “*hot spot*”. Estas mutaciones pueden variar en su oncogenicidad, en la capacidad de activar la vía PI3K y en la sensibilidad que generan a alpelisib, por lo que es fundamental su mejor caracterización funcional, además de recopilar evidencia clínica prospectiva para valorar su papel como biomarcadores, lo que tendrá implicaciones en la selección del tratamiento de las pacientes, pudiendo ofrecer a las candidatas la posibilidad de ser tratadas con un fármaco dirigido, oral, que retrase el empleo de quimioterapia.

Resulta interesante señalar, además, que en estudios recientes se ha observado que los pacientes con doble mutación en *PIK3CA* podrían presentar un mayor beneficio de la inhibición de la vía (314). En modelos preclínicos se ha mostrado cómo estas dobles mutaciones producen una mayor activación de la vía PI3K, promoviendo aún más el crecimiento tumoral en comparación con las mutaciones únicas (314). Las dobles mutaciones actúan a través de varios mecanismos que incrementan la unión de la quinasa a la membrana y producen una mayor desinhibición de p110 α por parte de p85 α . Las parejas de dobles mutaciones descritas con mayor frecuencia suelen combinar una mutación “*hot spot*” junto con otra menos frecuente, como E726, E453 y M1043 (264,314). Estas últimas mutaciones aparecen con más frecuencia descritas como dobles mutaciones que como mutaciones únicas en las bases de datos de cBioPortal y MSK-IMPACT. En estas bases casi todos los tumores con una segunda mutación en E726, E453 o M1043 presentan también una mutación en E542, E545 o H1047 (314).

Las dobles mutaciones parecen conferir mayor sensibilidad a los inhibidores de PI3K tanto en modelos preclínicos como clínicos, como muestran los resultados del ensayo clínico fase III SANDPIPER con fulvestrant en combinación con tasisib o placebo (314). En este estudio se realizó secuenciación de ctDNA y se observó que un 19% de pacientes presentaba dobles mutaciones en *PIK3CA*, frecuencia mayor a la observada en tejido archivado (12%). Las pacientes con mutaciones en *PIK3CA* en el brazo de tasisib obtuvieron una tasa de respuesta del 20.3% frente al 9.7% en el brazo de placebo (n=103) (p=0.020). Las pacientes con mutación única de *PIK3CA* en el brazo de tasisib (n=193) obtuvieron una tasa de respuestas del 18.0% comparada con 10.0% en el brazo de placebo (n=80), diferencia no estadísticamente significativa (p=0.10). Por el contrario, las pacientes con mutaciones múltiples (≥ 2 mutaciones) de *PIK3CA* tratadas con tasisib (n=43) consiguieron un 30.2% de respuestas frente al 8.7% en el brazo de placebo (n=23) (p=0.049) (314).

El papel de estas dobles mutaciones debería ser confirmado de forma prospectiva en estudios más amplios, de manera que su detección pudiera ayudar a seleccionar pacientes especialmente sensibles a la inhibición de PI3K. Sin embargo, a pesar de que los estudios de secuenciación completa detectan dobles mutaciones en 12-19% de los tumores RH positivo y HER2 negativo, la práctica habitual de secuenciar solo unos nucleótidos o unos pocos exones a lo largo del gen infraestima esta frecuencia, con reportes inferiores al 1% (315,316).

6. Estrategias futuras en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama metastásico receptor hormonal positivo y HER2 negativo

Como se ha mencionado previamente, el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo es una enfermedad tremendamente heterogénea. En este complejo escenario los estudios basados en expresión génica han proporcionado información muy relevante con la identificación de los grandes 4 subtipos intrínsecos que capturan buena parte de la diversidad biológica observada en cáncer de mama (29,32,49). La identificación de estos subtipos mediante el test PAM50 basado en RNA resulta clínicamente útil y se utiliza actualmente en la práctica de forma rutinaria para la toma de decisiones terapéuticas en el escenario de enfermedad localizada (31). En la enfermedad metastásica se ha observado que estas cuatro entidades moleculares pueden predecir también supervivencia y beneficio a fármacos, como muestran los resultados de los ensayos MONALEESA, entre otros estudios (50,303,317). Los subtipos no luminales presentan un claro peor pronóstico en comparación con los luminales, mayor resistencia hormonal y más sensibilidad a la quimioterapia (52,53,286,303,317). Por otro lado, se ha descrito mayor expresión de genes inmunes e infiltración estromal por TILs comparado con los subtipos luminales (Prat et al., no publicado), lo que tiene importantes implicaciones clínicas. Este conocimiento está permitiendo el desarrollo de ensayos clínicos dirigidos específicamente a cada uno de los subtipos dentro de la enfermedad RH positivo y HER2 negativo, como sucede, por ejemplo, en el ensayo TATEN (NCT04251169) donde se emplea inmunoterapia asociada a quimioterapia en tumores no luminales, o en el ensayo NEREA (NCT04460430) para pacientes con tumores HER2-enriched, que utiliza hormonoterapia junto con neratinib, un inhibidor de tirosina quinasa de HER2, permitiendo realizar un abordaje más personalizado en cada paciente.

Más allá del conocimiento sobre la enfermedad aportado por el análisis del RNA, es importante considerar también otros aspectos, como la valiosa información que se obtiene a partir del estudio del DNA, lo que nos ha permitido identificar diferentes biomarcadores, como las mutaciones de *PIK3CA*, predictivas de respuesta a inhibidores de PI3K α en la enfermedad RH positivo y HER2 negativo metastásica (259). Recientemente, otras alteraciones en DNA, aunque mucho menos frecuentes, como las mutaciones de *HER2*, las fusiones de *NTRK* o las mutaciones germinales en *BRCA1/2*, han abierto oportunidades terapéuticas en estas pacientes, con la aprobación de neratinib para los tumores con mutación en *HER2*, entrectinib y larotrectinib para las fusiones de *NTRK* y de los inhibidores de PARP para las mutaciones en *BRCA1/2* (276,277,318–321). El papel de los inhibidores de PARP en pacientes con mutaciones somáticas en *BRCA1/2* y otras alteraciones de la vía de la recombinación homóloga se encuentra actualmente en estudio (NCT03990896, NCT03286842, NCT04053322).

Otras alteraciones, como las mutaciones en *ESR1*, *AKT1* y *ERBB3* o las amplificaciones en *MDM2* se hallan también en investigación y todavía no se han aprobado fármacos dirigidos para ellas en el escenario del cáncer de mama metastásico (318).

Por otro lado, la información derivada del estudio proteico cada vez presenta mayor relevancia, como muestran los interesantes resultados con fármacos inmunoconjugados dirigidos a proteínas específicas de membrana (322). En la enfermedad HER2 positiva ya disponemos del inmunoconjugado trastuzumab-emtansina (T-DM1) y en la triple negativa, de sacituzumab govitecan que recibió la aprobación por la FDA en abril de 2021, y aunque todavía no existe ningún inmunoconjugado aprobado para la enfermedad RH positivo y HER2 negativo, existen numerosos fármacos en estudio, como trastuzumab deruxtecan (DS-8201) para los tumores HER2-low (aquellos con inmunohistoquímica de HER2 1+ o 2+), patritumab-deruxtecan (HER3-DXd; U3-1402), dirigido frente a HER3, o CX-2009 dirigido frente a CD166, entre otros (323–328). Son necesarios más estudios que identifiquen nuevos biomarcadores proteicos candidatos para el diseño de futuros inmunoconjugados selectivos y seguros (322).

Es importante mencionar también otras estrategias terapéuticas en investigación, como el empleo de inmunoterapia que tradicionalmente se ha considerado una opción poco efectiva para el cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo al considerarse un tumor “frío”, pero cada vez tenemos más evidencia de que determinados subgrupos de pacientes podrían beneficiarse de la misma, como aquellos que presentan un subtipo no luminal, hipótesis que está siendo testada en el estudio TATEN (NCT04251169), o aquellos con alta expresión de *PD-1*, que se está estudiando en el ensayo ACROPOLI (NCT04802876) con spartalizumab en múltiples tipos tumorales (329–332).

Existen datos preclínicos que apoyan también la combinación de inhibidores de CDK4/6 con inmunoterapia en cáncer de mama. En modelos murinos se ha mostrado como los inhibidores de CDK4/6 inducen una regulación al alza de genes relacionados con el procesamiento y presentación antigénica así como un aumento de la presencia de TILs (333). Estudios en pacientes con RH positivo y HER negativo con abemaciclib sugieren que la combinación con inmunoterapia pudiera ser más efectiva que el tratamiento en monoterapia (220,334,335). Actualmente se encuentran en marcha estudios que combinan estas dos terapias en el escenario metastásico (NCT04591431, NCT02779751, NCT02778685, NCT03147287) y que arrojarán luz sobre la posibilidad de utilizar la inmunoterapia en este contexto.

Por otro lado, en primera línea, otras novedosas estrategias de combinación se han sugerido como prometedoras. Algunos datos preclínicos apoyan que la triple terapia, combinando tratamiento

hormonal, inhibidores de CDK4/6 e inhibición de PI3K α , podría prevenir el desarrollo de resistencia adquirida a los inhibidores de CDK4/6 (279). Actualmente diferentes estudios se encuentran en marcha estudiando la viabilidad y utilidad de esta combinación (NCT02684032, NCT03377101, NCT04191499) en contraposición con la estrategia consistente en exponer a las pacientes a estos agentes de forma secuencial, reservando la inhibición de PI3K α para aquellos que albergan una mutación después de la exposición a la inhibición de CDK4/6.

Otras interesantes combinaciones de inhibidores de CDK4/6 con fármacos que actúan sobre vías de resistencia se encuentran en estudio, como la asociación con inhibidores de *AKT1* (NCT03959891), con inhibidores de *FGFR1* (NCT03238196, NCT04024436) o con inhibidores de PARP (NCT03685331), para las que tendremos resultados en los próximos años.

Dado el amplio y creciente abanico de opciones terapéuticas con el que nos encontramos será fundamental disponer de claros biomarcadores que permitan seleccionar de una forma personalizada la mejor opción de tratamiento para cada paciente.

Otro aspecto importante, además de la comentada heterogeneidad interindividual que caracteriza al cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo, es la heterogeneidad intraindividual, con diferencias dentro de un mismo tumor y/o entre las diversas lesiones metastásicas de un mismo paciente; y la heterogeneidad temporal, por la cual el tumor va adquiriendo nuevas alteraciones a lo largo de la evolución de la enfermedad (96,99,100,336,337). Este aspecto pone en relevancia la trascendencia de la rebiopsia tisular que aporta información de las características del tumor en el momento actual. Lamentablemente no siempre es factible realizar biopsias de tejido y la repetición de estas conlleva riesgos para el paciente. En este sentido, la biopsia líquida puede aportar gran información sin la necesidad de someter al paciente a una cruenta biopsia de tejido. La biopsia líquida ha comenzado a emplearse en la práctica clínica para el diagnóstico molecular, como, por ejemplo, para la detección de mutaciones de *PIK3CA* que permite el empleo de alpelisib, y, además, también puede resultar muy útil para el análisis de los cambios en la dinámica del ctDNA en el tiempo, lo que es objeto de análisis de esta tesis doctoral.

Aunque la biopsia líquida tiene indudables ventajas, todavía no es el “*gold standard*” para el diagnóstico anatomopatológico del tumor y no puede sustituir completamente a la biopsia de tejido. Por otro lado, el empleo de la biopsia líquida en los diferentes centros sanitarios no está regulado de la misma manera que lo está la utilización de fármacos y lamentablemente el acceso a este recurso no está disponible por igual en todos los pacientes en el escenario nacional, un aspecto que la comunidad científica deberá abordar en el futuro.

Finalmente, para poder entender el cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo de una forma más holística y ofrecer un mejor abordaje terapéutico a nuestras pacientes probablemente resulte clave la integración de todo el conocimiento derivado de los estudios genómicos, transcriptómicos, proteómicos, de datos del microambiente tumoral, como la infiltración inmune, así como de la información derivada del ctDNA, más que el análisis, quizá reduccionista, de cada uno de estos aspectos por separado, incapaz de explicar la complejidad total de la enfermedad (338).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Existen dos puntos clave para la optimización del tratamiento de las pacientes con cáncer de mama avanzado RH positivo y HER2 negativo mediante la mejor predicción de beneficio terapéutico:

- 1) La dinámica precoz del ctDNA, analizada a las 4 semanas tras el inicio del tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y terapia endocrina mediante un panel de secuenciación dirigida, constituye un biomarcador temprano de beneficio terapéutico y de supervivencia.
- 2) Existe un alto porcentaje de pacientes con mutaciones en *PIK3CA* que no son detectadas por el panel theascreen® aprobado por la FDA, por lo que se trata de un biomarcador subóptimo para detectar a las pacientes que podrán beneficiarse del tratamiento con inhibidores de PI3K α .

Objetivos:

- 1) Objetivo 1 general: Determinar si la dinámica precoz de ctDNA tras el inicio de tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y terapia endocrina (a las 4 semanas), analizada con un panel de secuenciación dirigida de 74 genes, se asocia a supervivencia libre de progresión en una cohorte de pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo tratadas en el Hospital Clinic de Barcelona.

Objetivos específicos:

- Objetivo 1.1: Determinar si la ratio entre los niveles de ctDNA tras 4 semanas de tratamiento y los niveles basales se asocia a supervivencia libre de progresión.
- Objetivo 1.2: Determinar si los niveles de ctDNA tras 4 semanas de tratamiento se asocian a supervivencia libre de progresión.
- Objetivo 1.3: Determinar si los cambios absolutos en los niveles ctDNA tras 4 semanas de tratamiento se asocian a supervivencia libre de progresión.

Objetivos secundarios:

- Objetivo S1.1: Determinar si los niveles de ctDNA basales se asocian a supervivencia libre de progresión.
- Objetivo S1.2: Determinar si la dinámica de ctDNA tras 4 semanas del inicio del tratamiento se asocia a supervivencia global.
- Objetivo S1.3: Determinar si los niveles del marcador tumoral CA 15-3 basales, a las 4 semanas de tratamiento y la ratio entre ambos momentos se asocia a supervivencia libre de progresión.
- Objetivo S1.4: Validar los resultados anteriores en una segunda cohorte multicéntrica independiente de pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo tratadas en el Hospital Clinic de Barcelona, Hospital Germans Trias i Pujols, Hospital de Cremona en Italia y Hospital Universitario 12 de Octubre.
- Objetivo S1.5: Determinar si la dinámica de ctDNA tras 2 semanas de tratamiento se asocia a supervivencia libre de progresión y a supervivencia global en la segunda cohorte.

- Objetivo S1.6: Determinar si la dinámica de ctDNA tras 4 semanas del inicio del tratamiento se asocia con el subtipo intrínseco determinado por PAM50 en ambas cohortes combinadas.
 - Objetivo S1.7: Describir la presencia de mutaciones y CNV detectados en pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo en ambas cohortes.
- 2) Objetivo 2 general: Evaluar la proporción de mutaciones en *PIK3CA* en cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo y el porcentaje que no sería detectado por el panel theascreen®.

Objetivos específicos:

- Objetivo 2.1: Evaluar el espectro de mutaciones de *PIK3CA in silico* en 10 estudios disponibles públicamente con datos de pacientes con cáncer de mama y la proporción de mutaciones que capturaría el panel theascreen® en estas pacientes.
- Objetivo 2.2: Explorar la distribución de mutaciones de *PIK3CA* y la proporción que no detectaría theascreen® en las dos cohortes de pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo empleadas para la consecución del objetivo 1, estudiadas mediante análisis de ctDNA con un panel de secuenciación dirigida de 74 genes.

MÉTODOS Y RESULTADOS

Tesis en formato de compendio de artículos:

1. Primer trabajo:

Circulating tumor DNA dynamics in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy.

Olga Martínez-Sáez, Tomás Pascual, Fara Brasó-Maristany, Nuria Chic, Blanca González-Farré, Esther Sanfeliu, Adela Rodríguez, Débora Martínez, Patricia Galván, Anna Belén Rodríguez, Francesco Schettini, Benedetta Conte, Maria Vidal, Barbara Adamo, Antoni Martínez, Montserrat Muñoz, Reinaldo Moreno, Patricia Villagrasa, Fernando Salvador, Eva M. Ciruelos, Iris Faull, Justin I. Odegaard and Aleix Prat.

npj Breast Cancer 2021; 7:8; <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00218-8>

Área conocimiento: Oncología

Factor de impacto: 6.923 (2020)

Cuartil: Primero

Otras métricas:

- *Attention score* 39 (percentil 94%, puntuación alta en comparación con otros artículos de la misma edad).
- Accesos al artículo: 2158
- Citaciones: 1 (*Web of Science*), 1 (*Google scholar*)

2. Segundo trabajo: No publicado

Independent validation of circulating tumor DNA dynamics to predict survival in advanced hormone receptor positive/HER2-negative breast cancer treated with CDK4/6 inhibitors and endocrine therapy in a multicentric cohort

3. Tercer trabajo:

Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer

Olga Martínez-Sáez, Nuria Chic, Tomás Pascual, Barbara Adamo, Maria Vidal, Blanca González-Farré, Esther Sanfeliu, Francesco Schettini, Benedetta Conte, Fara Brasó-Maristany, Adela Rodríguez, Débora Martínez, Patricia Galván, Ana Belén Rodríguez, Antonio Martinez, Montserrat Muñoz and Aleix Prat.

Breast Cancer Research 2020; <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01284-9>

Área conocimiento: Oncología

Factor de impacto: 6.466 (2020)

Cuartil: Primero

Otras métricas:

- *Attention score* 31 (percentil 91%, puntuación alta en comparación con otros artículos de la misma edad).
- Accesos al artículo: 8344
- Citaciones: 25 (*Web of Science*), 37 (*Google scholar*)

Primer trabajo: *Circulating tumor DNA dynamics in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy*

BRIEF COMMUNICATION

OPEN



Circulating tumor DNA dynamics in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy

Olga Martínez-Sáez^{1,2,3}, Tomás Pascual^{1,2,3,4}, Fara Brasó-Maristany^{1,2,3}, Nuria Chic^{1,2,3}, Blanca González-Farré^{1,3,5}, Esther Sanfeliu^{1,3,5}, Adela Rodríguez², Débora Martínez^{1,2,3}, Patricia Galván^{1,2,3}, Anna Belén Rodríguez^{1,2,3}, Francesco Schettini^{1,3,6}, Benedetta Conte^{1,3,7}, Maria Vidal^{1,2,3}, Barbara Adamo^{1,2,3}, Antoni Martínez^{1,2,3}, Montserrat Muñoz^{1,2,3}, Reinaldo Moreno^{1,2,3}, Patricia Villagrasa¹, Fernando Salvador¹, Eva M. Ciruelos^{1,8}, Iris Faull^{1,9}, Justin I. Odegaard⁹ and Aleix Prat^{1,2,3,10}✉

Circulating tumor DNA (ctDNA) levels may predict response to anticancer drugs, including CDK4/6 inhibitors and endocrine therapy combinations (CDK4/6i+ET); however, critical questions remain unanswered such as which assay or statistical method to use. Here, we obtained paired plasma samples at baseline and week 4 in 45 consecutive patients with advanced breast cancer treated with CDK4/6i+ET. ctDNA was detected in 96% of cases using the 74-gene Guardant360 assay. A variant allele fraction ratio (VAFR) was calculated for each of the 79 detected mutations between both timepoints. Mean of all VAFRs (mVAFR) was computed for each patient. In our dataset, mVAFR was significantly associated with progression-free survival (PFS). Baseline VAF, on-treatment VAF or absolute changes in VAF were not associated with PFS, nor were CA-15.3 levels at baseline, week 4 or the CA-15.3 ratio. These findings demonstrate that ctDNA dynamics using a standardized multi-gene panel and a unique methodological approach predicts treatment outcome. Clinical trials in patients with an unfavorable ctDNA response are needed.

npj Breast Cancer (2021)7:8; <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00218-8>

In hormone receptor positive (HR+)/HER2-negative advanced breast cancer (BC), CDK4/6i plus ET have remarkably improved survival outcomes and are now considered a standard treatment for most patients¹. Although this is good news for patients suffering from metastatic BC, improving the efficacy of CDK4/6i and ET using novel treatment strategies might be challenging. On the one hand, no predictive biomarker exists to date to select patients who are going to progress early². On the other hand, improving survival outcomes with new or additional therapies when the control arm has a median PFS of 25–27 months in the first-line setting will require huge personal, physical, and economic resources as well as long periods of follow-up^{3–5}. This issue is not restricted to advanced BC but also other cancer types such as lung cancer.

Detection of ctDNA levels before and during therapy might improve CDK4/6i plus ET efficacy, stratify patients, and help design future trials with novel treatment strategies^{6,7}. O’Leary and colleagues evaluated early ctDNA dynamics in patients with *PIK3CA*-mutated HR+/HER2-negative metastatic BC treated with palbociclib and fulvestrant in PALOMA-3 trial⁸. A multiplex digital PCR assay was used and hotspot *PIK3CA* mutations in exons 9 and 20 were evaluated in plasma⁸. *PIK3CA* mutation levels from baseline to day 15 of therapy were associated with PFS independently of the treatment received. However, only 22% of patients with HR+/HER2-negative advanced BC had detectable *PIK3CA* mutations in plasma. To circumvent this problem, others argue that individualized gene panels according to each patient’s tumor’s genetic profile should be prioritized⁹.

We hypothesized that a standardized plasma-based sequencing assay that analyzes multiple genes simultaneously at baseline and after 4 weeks (cycle 2 day 1 [C2D1]) of CDK4/6i plus ET can identify patients with HR+/HER2-negative advanced disease with different treatment outcomes. To accomplish this, we undertook a prospective study from May/2016 to June/2019 of 50 consecutive pre and postmenopausal patients with metastatic HR+/HER2-negative BC treated as per standard practice with CDK4/6i and ET (Fig. 1a). Plasma samples were sequenced using the standardized Guardant360 assay v2.11, which can identify single nucleotide variants (SNV) and indels from 74 genes (Fig. 1b)¹⁰. Among 50 patients, 2 patients (4%) had insufficient plasma volume, 2 patients (4%) had missing samples and 1 patient (2%) was treated in the adjuvant setting after resection of a supraclavicular lymph node and was excluded. Finally, 45 patients (90%) were evaluable of whom 43 (96%) had ctDNA detectable at some level. Of those 45, 31 (69%) had ctDNA-positive disease (i.e. highest VAF detected \geq VAF 0.4% at some timepoint) and 14 (31%) were considered to have ctDNA-low disease (i.e. highest VAF detected $<$ 0.4% or non-detected at both timepoints). Of the 31 ctDNA-positive patients, 30 had ctDNA-positive disease at baseline and 1 had ctDNA-low at baseline but ctDNA-positive at cycle 2 (Fig. 1c and Table 1). Mutations in 42 genes were identified at baseline and the 4 most frequent altered genes were *PIK3CA*, *ESR1*, *TP53*, and *ATM* (Fig. 1d); ≥ 1 mutation with \geq VAF 0.4% in any of these 4 genes was found in 24 patients (53.3%). We had available tissue samples collected from archival biopsies before treatment with CDK4/6i plus ET in 26 patients. As shown in previous studies, all intrinsic molecular

¹SOLTI Cancer Research Group, Barcelona, Spain. ²Department of Medical Oncology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain. ³Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ⁴Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA. ⁵Department of Pathology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Naples Federico II, Naples, Italy. ⁷Department of Medical Oncology U.O. Oncologia Medica 2, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italy. ⁸Department of Medical Oncology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. ⁹Guardant Health, Inc., Redwood City, CA, USA. ¹⁰Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ✉email: alprat@clinic.cat

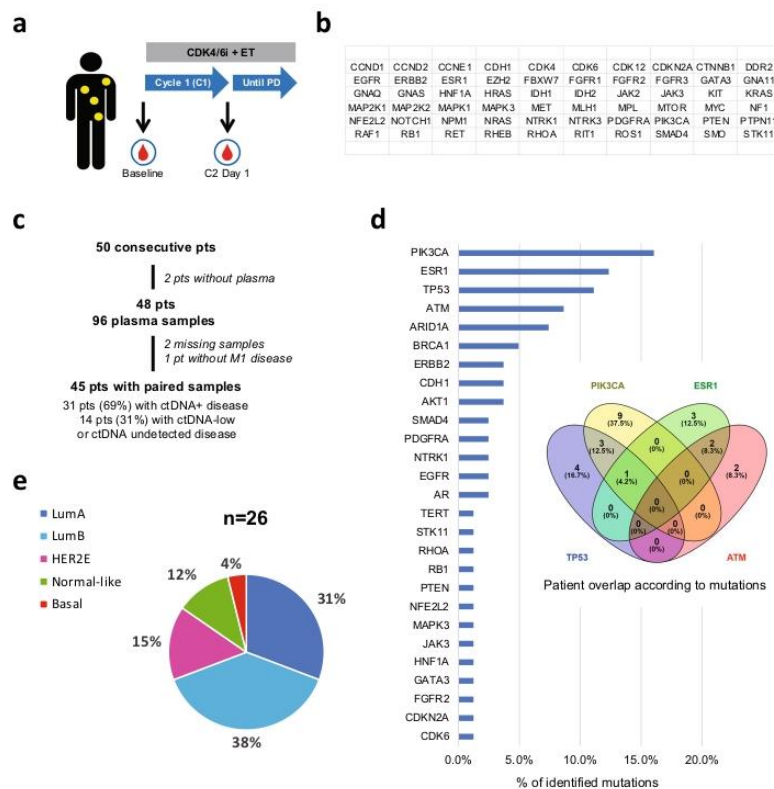


Fig. 1 Description of the study. **a** Blood samples were extracted at baseline and after 1 cycle (i.e. 4 weeks) in patients with metastatic HR+/HER2-negative BC treated with CDK4/6i plus ET. **b** The list of 74 genes analyzed by Guardant360. **c** CONSORT diagram. **d** Frequency of gene mutations with \geq VAF 0.4% at baseline identified in the patient dataset and Venn diagram with the 4 most frequent mutations. **e** PAM50 distribution (LumA = Luminal A, LumB = Luminal B, HER2E = HER2-enriched). *PD Progressive disease, pts patients, M1 metastatic.

subtypes were identified using the PAM50 subtype predictor, although Luminal A and B subtypes predominated (Fig. 1e)^{11,12}.

A total of 159 mutations (SNV and indels) were found at baseline; of them, 93 were detected in C2D1. From the 159 mutations in baseline, 79 had a VAF \geq 0.4% in 31 patients (mean of 2.6 alterations per patient), 60 of these mutations were detected at some level in C2D1. 31 mutations were detected in C2D1 and not in baseline, but only 3 mutations with VAF \geq 0.4% were detected at C2D1 and not in baseline (Supplementary Fig. 3 and Fig. 4). Mean VAF (mVAF) of the 79 mutations was 6.2 at baseline and 5.1 at C2D1 (p -value=0.040) (Fig. 2a). Any decrease in VAF at C2D1 compared to baseline was observed in 71% (56/79) of the tracked mutations. To capture the magnitude of ctDNA response, a VAFR from C2D1 to baseline was calculated for each genetic mutation and a mVAFR was computed for each patient (Fig. 2b and Methods). 35% of patients had mVAFR of \leq 0.3 (mVAFR-low), 29% had mVAFR of 0.31–0.99 (mVAFR-medium) and 35% had a mVAFR of \geq 1.0 (mVAFR-high) (Fig. 2c). Finally, no clinical features were found specific of a particular ctDNA group (Table 1).

With a median follow-up of 20.4 months, a significant association between the various ctDNA groups and PFS was observed across all patients (p -value=0.02) (Fig. 2d, e). Compared to the mVAFR-high group, the mVAFR-low group was associated with better PFS (not reached (NR) (95% confidence interval [CI] 5.40-NR) vs. 4.2 months (95% CI 2.41–11.60); adjusted hazard ratio [aHR]=0.31, 95% CI 0.09–1, p -value=0.049). Similarly, the mVAFR-low and ctDNA-low groups combined was associated with better PFS compared to the mVAFR-high group (33.7 (95% CI 5.3–33.7)

vs. 4.2 months; aHR=0.25, 95% CI 0.09–0.7, p -value=0.008). The results in ctDNA-low group are in line with what was previously described in other metastatic tumors, as low ctDNA levels seem to be a good prognostic feature. In addition, mVAFR as a continuous variable was also found significantly associated with PFS (aHR per 1-unit increase=2.07, 95% CI 1.2–3.5, p -value=0.008) (Supplementary Table 2). Of note, mVAF at baseline, or mVAF at C2D1 or absolute changes in mVAF (delta-VAF) were not found associated with PFS when evaluated as continuous variables (Fig. 2f and Supplementary Table 1). These results are in consonance with different studies that assessed ctDNA dynamics and have showed that higher pretreatment VAF acts as poorer prognostic factor but has no predictive value^{13,14}. On the other hand, there is not a standard method yet to assess ctDNA dynamics; several studies have used the delta-VAF or a ratio between the two time-points^{8,13,15–17}. However, while delta-VAF is able to stratify patients similarly to on-treatment VAF, it only assesses absolute VAF changes and equates patients with low VAF who had a significant decrease in ctDNA level and patients with a higher VAF and smaller decrease in ctDNA level. Interestingly, no patient with non-luminal tumors was identified as high ctDNA responder (i.e. mVAFR-low), consistent with previous reports in advanced HR+/HER2-negative disease associating the Luminal phenotype with better prognosis and response to ET compared to non-luminal tumors (Fig. 2g)^{18,19}.

At baseline, median CA-15.3 value was 45 U/mL (7–6,672), and 26 patients (61%) had high CA-15.3 values ($>$ 35 U/mL). At C2D1, median CA-15.3 value was 42 U/mL (range 8–9,868), and 19

Table 1. Clinical features of the patient dataset according to ctDNA levels and dynamics.

	All patients N = 45	ctDNA-low N = 14	mVAFR-low N = 11	mVAFR- med/high N = 20
Age				
Median (range) yr	61.4 (39–87)	59.7 (39–87)	56.9 (45–72)	64 (42–75)
<65 yr—no. (%)	28 (62%)	8 (57%)	9 (82%)	11 (55%)
≥65 yr—no. (%)	17 (38%)	6 (43%)	2 (18%)	9 (45%)
Line—no. (%)				
First	21 (47%)	8 (57%)	5 (45%)	9 (45%)
Second	16 (36%)	5 (36%)	5 (45%)	5 (25%)
Third or more	8 (18%)	1 (7%)	1 (9%)	6 (30%)
ECOG-PS^a—no. (%)				
0	17 (38%)	5 (36%)	5 (45%)	7 (35%)
1	27 (60%)	9 (64%)	6 (55%)	12 (60%)
2	1 (2%)	0	0	1 (5%)
Endocrine therapy—no. (%)				
Aromatase inhibitor	15 (33%)	4 (29%)	3 (27%)	8 (40%)
Fulvestrant	26 (58%)	9 (64%)	7 (64%)	10 (50%)
Tamoxifen	4 (9%)	1 (7%)	1 (9%)	1 (5%)
Type of CDK4/6 inhibitor—no. (%)				
Palbociclib	40 (89%)	12 (86%)	10 (91%)	18 (90%)
Ribociclib	5 (11%)	2 (14%)	1 (9%)	2 (10%)
Disease site—no. (%)				
Visceral	2 (64%)	10 (71%)	7 (64%)	12 (60%)
Non visceral	16 (36%)	4 (29%)	4 (36%)	8 (40%)
Bone-only	10 (22%)	1 (7%)	4 (36%)	5 (25%)
Number of metastatic locations—no. (%)				
<3	23 (51%)	8 (57%)	7 (64%)	8 (40%)
≥3	22 (49%)	6 (43%)	4 (36%)	12 (60%)
“De novo” metastasis—no. (%)				
No	33 (73%)	10 (71%)	7 (64%)	15 (75%)
Yes	12 (27%)	4 (29%)	4 (36%)	5 (25%)
Prior hormone sensitivity—no. (%)				
Sensitivity	31 (69%)	9 (64%)	7 (64%)	15 (75%)
Resistance ^b	14 (31%)	5 (36%)	4 (36%)	5 (25%)
Histology—no. (%)				
Ductal	32 (71%)	11 (79%)	8 (73%)	13 (65%)
Lobular	9 (20%)	3 (21%)	3 (27%)	3 (15%)
Other	4 (9%)	0	0	4 (20%)
Grade—no. (%)				
1	5 (11%)	2 (14%)	2 (18%)	1 (5%)
2	19 (42%)	5 (36%)	6 (55%)	8 (40%)
3	12 (27%)	5 (36%)	2 (18%)	5 (25%)
Unknown	9 (20%)	2 (14%)	1 (9%)	6 (30%)
Ki67 (%)—no. (%)				
1–14	9 (20%)	4 (29%)	2 (18%)	3 (15%)
15–20	3 (7%)	1 (7%)	0	2 (10%)
>20	25 (56%)	7 (50%)	6 (55%)	12 (60%)
Unknown	8 (18%)	2 (14%)	3 (27%)	3 (15%)

^aPS: performance status.^bHormone resistance defined as relapse while on the first 2 years of adjuvant ET, or progression of disease within first 6 months of first-line ET for advanced BC, while on ET.

patients (51%) had high CA-15.3 values. No significant differences in CA-15.3 levels were observed between baseline and C2D1 (p -value=0.350). The median ratio of CA-15.3 between C2D1 and baseline was 1.05 (range 0.4–1.6). No correlation was observed between CA-15.3 ratio and ctDNA mVAFR (correlation coefficient = −0.021). The levels of CA-15.3 at baseline or C2D1, and the CA-15.3 ratio, were not found associated with PFS (data not shown).

Our study has limitations worth noting. First, the limited sample size, which precludes more in-depth analysis within subgroups of patients. For example, identification of an optimal mVAFR cutoff to define prognosis will require a larger sample set. Second, there is not yet a standardized method to assess the ctDNA dynamics. We are aware that the arithmetic mean of VAFs could result in overestimation of the average ctDNA change due to the nonadditive nature of the ratios and the small number of detected mutations per patient. To address this, we assigned fixed VAF values of 10 or 0.1 (Methods). As this mitigation strategy could not cover all potential cases, we have studied other possibility taking the logarithm of each ratio, and then taking the mean of logarithms. The correlation coefficient between both scores (i.e. simple arithmetic mean ratio and logarithm mean ratio) was 0.94 and the Kappa concordance score between mVAFR-based groups of patients and mVAFR_log-based groups of patients, 0.88. As expected, this scoring method was also found associated with PFS (Supplementary Section). The best method to assess ctDNA dynamics should be determined in future studies. Third, the short follow-up time does not allow associations with overall survival. Fourth, we did not explore if tracking ctDNA levels of particular genes is better than tracking any detected altered gene in plasma. Nonetheless, a strong argument in favor of our approach is that it does not rely on specific genes but rather on the dynamic changes of the altered genes identified before initiating treatment. Fifth, it is unclear if this approach and methods will be applicable for other therapies or other cancer types. Lastly, we cannot completely exclude that some of the alterations identified are from clonal hematopoiesis (CH). However, we try to correct for clinical CH in two ways. First, we excluded any variant present at <0.4% since the vast majority of CH variants are present below this level and this excludes them from contributing to the assessment. Second, our method averages all variants present, which dilutes the impact of any atypical CH variant that may have exceeded the VAF threshold. In such cases, the CH variant would remain unaffected by therapy and remain at a static VAF and, as such, would not contribute to any changes in tumor ctDNA fraction, although it could dilute somewhat any changes observed in true tumor ctDNA. Finally, our findings will require further validation in patients with advanced BC treated with CDK4/6i plus ET.

Our findings have several potential clinical implications. Most importantly, they suggest that early ctDNA dynamics using a multi-gene assay and a particular statistical methodology serve as a general biomarker to identify patients with advanced BC who are at high risk of progression during standard therapy with CDK4/6i and ET, giving the opportunity to intervene and change the treatment or add another treatment early. Notably, the biomarker seems independent of baseline clinical features, tumor marker CA-15.3 and the clinical setting, and the relationship of low ctDNA-responders with the non-luminal subtypes is weak. It will be important to also assess its value on the outcome of additional therapies and cancer types. Overall, our findings support the notion that monitoring ctDNA should be an integral part during drug development and should allow the design of novel clinical trials in key patient populations, such as those patients with an unfavorable ctDNA response.

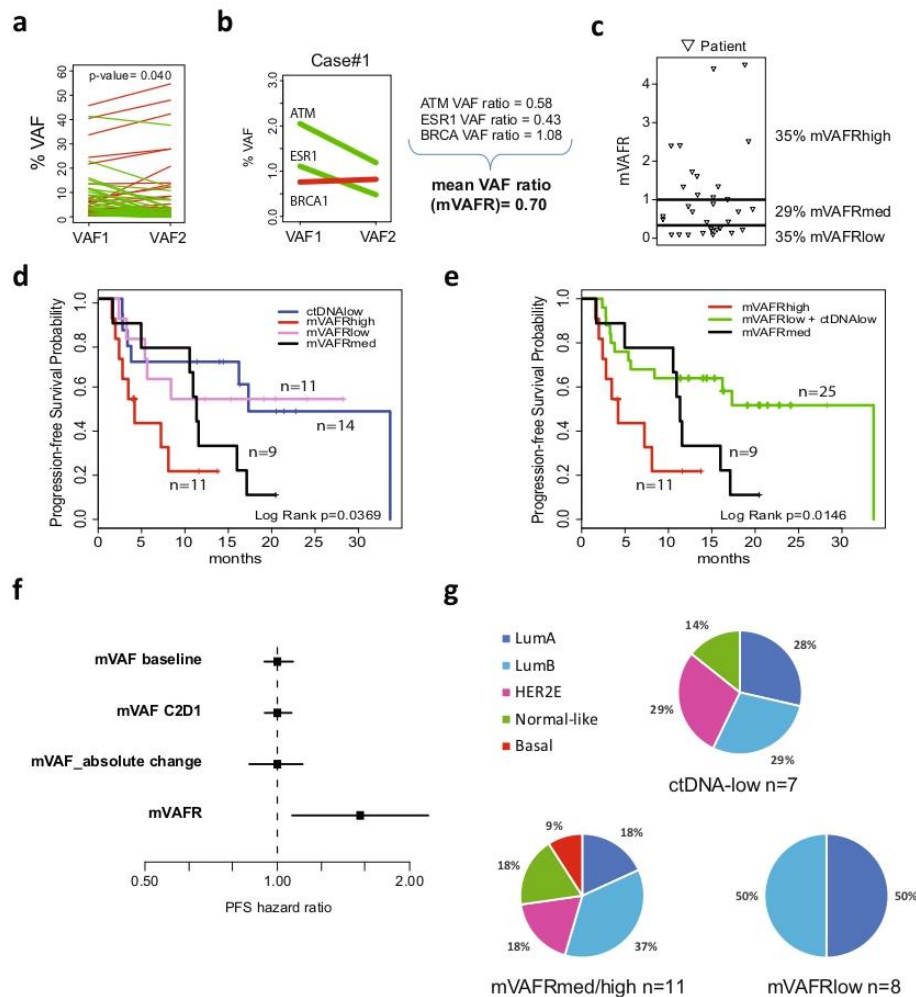


Fig. 2 ctDNA dynamics and survival outcome. **a** VAF changes of 79 detected mutations from baseline to C2D1. p -value was calculated with Wilcoxon rank sum test. **b** Illustration of a case and its mVAFR. **c** Distribution plot of patients with mVAFR-low (mVAFR of ≤ 0.3), mVAFR-medium [mVAFR of 0.31–0.99] and mVAFR-high (mVAFR of ≥ 1.0). **d** PFS based on ctDNA dynamics. **e** PFS based on ctDNA dynamics after combining the VAFR-low and ctDNA-low groups. **f** PFS hazard ratio forest plots across 4 different methods of assessing mVAF as a continuous variable: mVAF baseline, mVAF at C2D1, absolute change of mVAF between baseline and C2D1 and mVAFR of all mutations with a VAF ≥ 0.4 at baseline or C2D1. **g** Distribution of the intrinsic subtypes in the mVAFR-low group (n = 4 Luminal A [LumA], n = 4 Luminal B [LumB], n = 3 non-available tissue [NA]), mVAFR-medium/high group (n = 2 LumA, n = 4 LumB, n = 2 HER2-Enriched [HER2E], n = 2 Normal-like, n = 1 Basal-like, n = 9 NA) and ctDNA-low group (n = 2 LumA, n = 2 LumB, n = 2 HER2E, n = 2 Normal-like, n = 7 NA).

METHODS

Study design and patients

This is a prospective, single-center study in 50 consecutive patients with advanced BC. Eligible patients were ≥ 18 years of age with histologically confirmed HR+/HER2-negative inoperable or metastatic BC treated with a CDK4/6i and ET. Blood samples for sample collection were obtained at baseline and at C2D1. Clinical data, results of computed tomography (CT) imaging, and serial blood samples were collected as per standard practice. The study was performed in accordance with Good Clinical Practice guidelines and the World Medical Association Declaration of Helsinki. The study was approved by the local institutional research ethics committee, and all patients provided written informed consent.

Plasma samples

Approximately 30 mL of venous blood was extracted at each timepoint and collected in EDTA tubes. Blood was processed within 2 h after the collection. Centrifugation at 1600g for 10 minutes at 4 °C was performed to separate the plasma from the peripheral-blood cells. We obtained approximately 12 mL of plasma per patient and timepoint, and plasma was immediately aliquoted in 1.5 mL tubes and then we centrifuged them at 16,000g at 4 °C for another 10 minutes to remove the residual supernatant and any remaining contaminants including cells. Separated plasma was aliquoted in a 1.5 mL tube and immediately stored in a deep freezer at -80°C .

Cell-free DNA (cfDNA) was extracted from 1.5 mL aliquots of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen), concentrated using

Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter), and quantified by Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All cfDNA isolation and sequencing was performed at Guardant Health (Redwood City, CA, USA).

DNA sequencing

Genomic alterations (SNV, insertions and deletions (indels) and amplifications) were detected from cfDNA extracted from plasma samples using a broad targeted NGS-based 74-gene panel (Guardant360), including coverage of the most prevalent tumor suppressor genes in human cancers (Fig. 1b). After isolation of cfDNA by hybrid capture, the assay was performed using molecular barcoding and proprietary bioinformatics algorithms with massively parallel sequencing on an Illumina Hi-Seq 2500 platform in a CLIA/CAP accredited laboratory (Guardant Health; Redwood City, CA, USA).

ctDNA response definition

We filtered somatic mutations with VAF $\geq 0.4\%$ either at baseline (C1D1) or C2D1, based on 95%–100% limits of detection for this technology. Those patients with VAF $< 0.4\%$ at both timepoints were considered low-shedding tumors. We calculated the proportional change for all variants detected between the 2 timepoints (VAF ratio [VAFR] = VAF_C2D1/VAF_C1D1). For variants detected at 1 timepoint but not the other, VAF was set to 0. We considered all undetected variants at C2D1, or variants with a VAF $< 0.4\%$ at C2D1, to have a VAFR of 0.1 as minimum. The reason is to prevent skewing of the average by variance introduced by quantitation variability below 0.4% VAF. We considered all new variants detected at C2D1 but not at baseline to have a VAFR of 10 as maximum. The reason is to prevent skewing of the average by variance introduced by quantitation variability below 0.4% and by dividing by numbers that approach zero. Finally, a mVAFR was calculated per patient taking the average of all VAFR.

CA-15.3 determination

The CA-15.3 assay was performed by the BRAHMS Kryptor Plus compact controller using TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission) technology. CA-15.3 was considered elevated when it was above the normal upper limit (35 U/mL).

PAM50 subtype determination

A minimum of ~ 125 ng of total RNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor samples was used to measure the expression of the 50 PAM50 subtype predictor genes and 5 housekeeping genes using the nCounter platform (Nanostring Technologies, Seattle, USA).

Response evaluation by image

CT scan and bone scintigraphy were performed as per standard practice. RECIST 1.1 was used to evaluate tumor responses.

Statistical analysis

The primary objective was to evaluate the association of ctDNA dynamics from baseline to C2D1 and PFS. PFS was defined as the time from initiation of treatment until progression or death. Univariate and multivariate Cox proportional hazard regression analysis was used to investigate the association of each variable with PFS. VAF changes between timepoints were calculated with Wilcoxon Rank Sum Test. The significance level was set to a 2-sided alpha of 0.05. *p*-value was calculated with Wilcoxon Rank Sum Test. All analyses were performed with R code 3.6.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The data generated and analyzed during this study are described in the following data record: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13365521>²⁰. The ctDNA and clinical data are available in two separate tabs in the Excel spreadsheet “ctDNA and clinical dataset.xlsx”, which is openly available and shared as part of the figshare data record²⁰. The “CDK series - ctDNA and clinicopathological dataset” is not publicly available in order to protect patient privacy. Requests for access to this dataset can be made to the corresponding author.

Received: 29 July 2020; Accepted: 7 January 2021;
Published online: 03 February 2021

REFERENCES

- Schettini, F. et al. Overall survival of CDK4/6-inhibitors-based treatments in clinically relevant subgroups of metastatic breast cancer: systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **112**, 1089–1097 (2020).
- Schoningher, S. F. & Blain, S. W. The ongoing search for biomarkers of CDK4/6 inhibitor responsiveness in breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **19**, 3–12 (2020).
- Hortobagyi, G. N. et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* **29**, 1541–1547 (2018).
- Rugo, H. S. et al. Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05125-4> (2019).
- Johnston, S. et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *npj Breast Cancer* <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0097-z> (2019).
- Heitzer, E., Ulz, P. & Geigl, J. B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin. Chem.* <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.222679> (2015).
- Wan, J. C. M. et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer* <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7> (2017).
- O’Leary, B. et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).
- Vandeputte, C. et al. Circulating tumor DNA in early response assessment and monitoring of advanced colorectal cancer treated with a multitargeted kinase inhibitor. *Oncotarget* <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24879> (2018).
- Lanman, R. B. et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS ONE* **10**, 1–27 (2015).
- Cejalvo, J. M. et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.015> (2018).
- Prat, A. et al. Ribociclib plus letrozole versus chemotherapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative, luminal B breast cancer (CORALLEN): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30786-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30786-7) (2020).
- Zhang, Q. et al. Prognostic and predictive impact of circulating tumor DNA in patients with advanced cancers treated with immune checkpoint blockade. *Cancer Discov.* **CD-20-0047** <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-20-0047> (2020).
- Goodall, J. et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) dynamics associate with treatment response and radiological progression-free survival (rPFS): analyses from a randomized phase II trial in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.5508 (2020).
- Raja, R. et al. Early reduction in ctDNA predicts survival in patients with lung and bladder cancer treated with durvalumab. *Clin. Cancer Res.* **24**, 6212–6222 (2018).
- Parkinson, C. A. et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed high-grade serous ovarian carcinoma: a retrospective study. *PLoS Med.* **13**, 1–25 (2016).
- Garlan, F. et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clin. Cancer Res.* **23**, 5416–5425 (2017).
- Finn, R. S. et al. Biomarker analyses of response to cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition and endocrine therapy in women with treatment-naïve metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **26**, 110–121 (2020).
- Ma, C. X. et al. NeopAlAna: Neoadjuvant palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, and anastrozole for clinical stage 2 or 3 estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3206> (2017).
- Martínez-Sáez, O. et al. Metadata record for the manuscript: Circulating tumor DNA dynamics using a standardized multi-gene panel in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy. figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13365521> (2020).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Instituto de Salud Carlos III (PI19/01846) (to A.P.), Instituto de Salud Carlos III (PI18/01408) (to E.C.), Breast Cancer Research Foundation (to A.P.), Phd4MD (to N.C.), Fundació La Marató TV3 (to A.P.), RESCUE Horizon 2020 (to A.P.), Save the Mama (to A.P.), Pas a Pas (to A.P.), Asociación Cáncer de Mama Metastásico (to A.P.), Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer (to F.B.M.) and Fundación SEOM (SEOM 2018 Grant: Fellowship for Training in Research in Reference

Centers) (to T.P.). The study was designed by investigators from Hospital Clinic. Funding sources had no role in the design and conduction of this study, and in the analysis and interpretation of data. Guardant Health provided the assay. All authors had full access to all data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors made substantial contributions to the conception or design of the work or the acquisition, analysis, or interpretation of the data. All authors drafted the work or revised it critically for important intellectual content and gave final approval of the completed version. All authors have accountability for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00218-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.P.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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

© The Author(s) 2021

Segundo trabajo: *Independent validation of circulating tumor DNA dynamics to predict survival in advanced hormone receptor positive/HER2-negative breast cancer treated with CDK4/6 inhibitors and endocrine therapy in a multicentric cohort*

Title: Independent validation of circulating tumor DNA dynamics to predict survival in advanced hormone receptor positive/HER2 negative breast cancer treated with CDK4/6 inhibitors and endocrine therapy in a multicentric cohort

Methods

Study design and patients

This is a prospective, international, multicentric study (Hospital Clinic of Barcelona, Hospital Germans Trias i Pujols, Cremona Hospital and Hospital 12 de Octubre) in 128 consecutive patients with advanced breast cancer. Eligible patients were ≥ 18 years of age with histologically confirmed hormone receptor positive (HR+)/HER2 negative inoperable or metastatic breast cancer treated with a CDK4/6 inhibitor (CDK4/6i) and endocrine therapy (ET). Blood samples for sample collection were obtained at baseline and at cycle 1 day 15 (C1D15) and/or cycle 2 day 1 (C2D1). Clinical data, results of computed tomography (CT) imaging, and serial blood samples were collected as per standard practice. The study was performed in accordance with Good Clinical Practice guidelines and the World Medical Association Declaration of Helsinki. The study was approved by the local institutional research ethics committees, and all patients provided written informed consent.

Plasma samples

Approximately 30 mL of venous blood was extracted at each timepoint and collected in EDTA tubes. Blood was processed within 2 hours after the collection. Centrifugation at 1600g for 10 minutes at 4 °C was performed to separate the plasma from the peripheral-blood cells. We obtained approximately 12 mL of plasma per patient and timepoint, and plasma was immediately aliquoted in 1.5 mL tubes and then we centrifugated them at 16000g at 4 °C for another 10 minutes to remove the residual supernatant and any remaining contaminants including cells. Separated plasma was aliquoted in a 1.5 mL tube and immediately stored in a deep freezer at -80 °C.

Cell-free DNA (cfDNA) was extracted from 1.5 mL aliquots of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen), concentrated using Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter), and quantified by Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All cfDNA isolation and sequencing was performed at Guardant Health (Redwood City, CA, USA).

DNA sequencing

Genomic alterations (single nucleotide variants [SNV], insertions and deletions (indels) and copy number variations [CNV]) were detected from cfDNA extracted from plasma samples using a broad targeted NGS-based 74-gene panel (Guardant360), including coverage of the most prevalent tumor suppressor genes in human cancers (**Table 1**). After isolation of cfDNA by hybrid capture, the assay was performed using molecular barcoding and proprietary bioinformatics algorithms with massively

parallel sequencing on an Illumina Hi-Seq 2500 platform in a CLIA/CAP accredited laboratory (Guardant Health; Redwood City, CA, USA).

Table 2. The list of 74 genes analyzed by Guardant360.

AKT1	ALK	APC	AR	ARAF	ARID1A	ATM	BRAF	BRCA1	BRCA2
CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	CDK4	CDK6	CDK12	CDKN2A	CTNNB1	DDR2
EGFR	ERBB2	ESR1	EZH2	FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3	GATA3	GNA11
GNAQ	GNAS	HNF1A	HRAS	IDH1	IDH2	JAK2	JAK3	KIT	KRAS
MAP2K1	MAP2K2	MAPK1	MAPK3	MET	MLH1	MPL	MTOR	MYC	NF1
NFE2L2	NOTCH1	NPM1	NRAS	NTRK1	NTRK3	PDGFRA	PIK3CA	PTEN	PTPN11
RAF1	RB1	RET	RHEB	RHOA	RIT1	ROS1	SMAD4	SMO	STK11
TERT	TP53	TSC1	VHL						

ctDNA response definition

We filtered somatic mutations with variant allele frequency (VAF) $\geq 0.4\%$ either at baseline (C1D1), C1D15 or C2D1, based on 95%–100% limits of detection for this technology. Those patients with VAF $< 0.4\%$ at all timepoints were considered low-shedding tumors. We calculated the proportional change for all variants detected between the 2 timepoints (VAF ratio [VAFR] = VAF_C2D1 or VAF_C1D15/VAF_C1D1). For variants detected at 1 timepoint but not the other, VAF was set to 0. We considered all undetected variants at C1D15 or C2D1 to have a VAFR of 0.1 as minimum. We considered all new variants detected at C1D15 or C2D1 but not at baseline to have a VAFR of 10 as maximum (**Table 2**). Finally, a mean VAFR (mVAFR) was calculated per patient taking the average of all VAFR (*Martínez-Sáez. npj Breast. 2021*).

Table 2. Derivation of the mVAFR metric for ctDNA dynamics in gene panel-based ctDNA assay.

Baseline VAF	C1D15 or C2D1	VAFR value	mVAFR calculation
<0.4%	nd	0	Exclude
<0.4%	<0.4%	0	Exclude
<0.4%	$\geq 0.4\%$	C1D15 or C2D1/baseline	Include
$\geq 0.4\%$	nd	0.1	Include
$\geq 0.4\%$	<0.4%	C1D15 or C2D1/baseline	Include
$\geq 0.4\%$	$\geq 0.4\%$	C1D15 or C2D1/baseline	Include
nd	$\geq 0.4\%$	10	Include
nd	<0.4%	0	Exclude

We also calculated the logarithm transformation of the mVAFR (mVAFR_log):

$$mVAFR_{log} = m\left(\log\left(\frac{VAF_{post}}{VAF_{pre}}\right)\right)$$

PAM50 subtype determination

A minimum of ~125 ng of total RNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor samples was used to measure the expression of the 50 PAM50 subtype predictor genes and 5 housekeeping genes using the nCounter platform (Nanostring Technologies, Seattle, USA).

Response evaluation by image

CT scan and bone scintigraphy were performed as per standard practice. RECIST 1.1 was used to evaluate tumor responses.

Statistical analysis

The primary objective was to evaluate the association of ctDNA dynamics from baseline to C2D1 and progression free survival (PFS). PFS was defined as the time from initiation of treatment until progression or death. The secondary objectives were to evaluate the association of ctDNA dynamics from baseline to C1D15 and PFS; to evaluate the association of ctDNA dynamics from baseline to C1D15 and C2D1 and overall survival (OS); to analyze the association of PAM50 subtypes and clinical features with ctDNA dynamics, and to describe the molecular alterations detected at baseline.

For analyses of PFS and OS, Kaplan–Meier curves were plotted, and groups compared using the log-rank test. Hazard ratios (HR) and associated 95% confidence intervals (CI) were obtained from Cox proportional hazards regression models. VAF in the different timepoints were compared using Wilcoxon Rank Sum Test. In order to determine the optimal cut-point of the mVAFR and the mVFAR_log in relation to PFS, the maximally selected rank statistics (MSRS) methodology was used (Lausen, B. & Schumacher. *Biometrics*. 1992).

For all analyses performed a p-value of <0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed with R vers.3.6.

Results

In our previous work we showed that plasma-based sequencing assay (Guardant360) that analyzes multiple genes simultaneously at baseline and after 4 weeks (C2D1) of CDK4/6i plus ET could identify patients with HR+/HER2 negative advanced disease with different treatment outcomes (training cohort). Here, we aim to validate our previous results in an independent cohort (validation cohort) and to analyze the results in the combined dataset (training and validation cohorts together). We also investigate if the standardized plasma-based sequencing assay at baseline and after 2 weeks (C1D15) of CDK4/6i plus ET can identify patients with HR+/HER2 negative advanced disease with different treatment outcomes. Moreover, we aim to describe the validation cohort in terms of SNV,

indels and CNV detected at baseline, and to determine if ctDNA dynamics at 4 weeks is associated to the intrinsic subtype determined by PAM50 in the combined cohort.

To accomplish these objectives, we undertook a prospective study from August/2017 to October/2020 of 128 consecutive pre and postmenopausal patients with metastatic HR+/HER2 negative breast cancer treated as per standard practice with CDK4/6i and ET (**Fig.1**). Plasma samples were sequenced using the standardized Guardant360 assay v2.11, which can identify SNV and indels from 74 genes (**Table 2**). Among 128 patients, 5 patients (3.9%) had possible contaminations, 2 patients had second malignancies (1.6%) and 1 patient (0.8%) had unpair plasma samples (C1D15 missing sample) and were excluded (**Fig.2**). Finally, 120 patients (93.8%) were evaluable of whom 113 (94.2%) had ctDNA detectable at some level. Of those 120, 90 (75.0%) had ctDNA-positive disease (i.e., highest VAF detected \geq VAF 0.4% at some timepoint) and 30 (25.0%) were considered to have ctDNA-low disease (i.e., highest VAF detected $<$ 0.4% or non-detected at both timepoints).

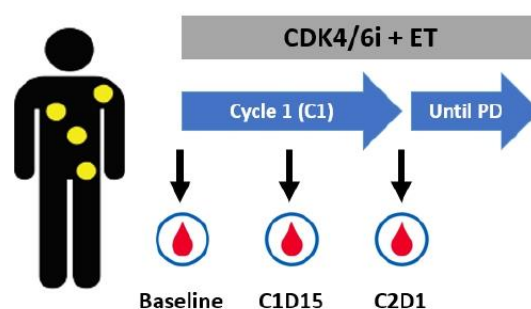


Fig. 1. Description of the study. Blood samples were extracted at baseline, after 2 weeks (C1D15) and after 1 cycle (i.e., 4 weeks, C2D1) in patients with metastatic HR+/HER2 negative breast cancer treated with CDK4/6i plus ET. PD, Progression disease.

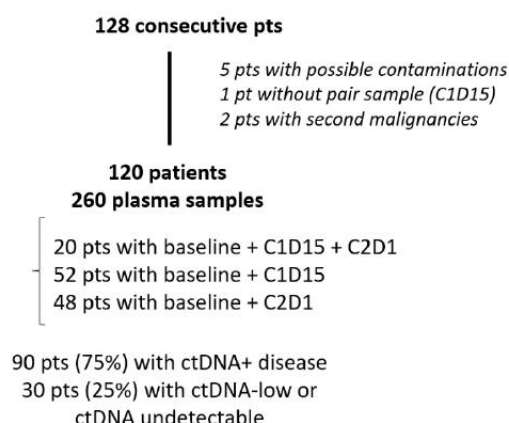


Fig 2. CONSORT diagram. Pts, patients.

Of the 90 ctDNA-positive patients with baseline and C1D15 or C2D1 samples, 89 had ctDNA-positive disease at baseline and 1 had ctDNA-low at baseline but ctDNA-positive at C2D1. Mutations (SNV and indels) in 63 genes were identified at baseline and the 4 most frequent altered genes were *TP53*, *PIK3CA*, *ESR1*, and *ARID1A* (**Fig.3**). CNV in 29 different genes were detected in 37 patients at baseline. The median number of CNV per patient (in patients with CNV) was 5 (range 13-1). The most frequent amplifications were seen in *CCND1* (13.3%), *FGFR1* (12.5%), *MYC* (10.8%), *GNAS* (9.2%), *BRAF* (8.3%) and *EGFR* (8.3%) (**Fig.4 and Fig.5**).

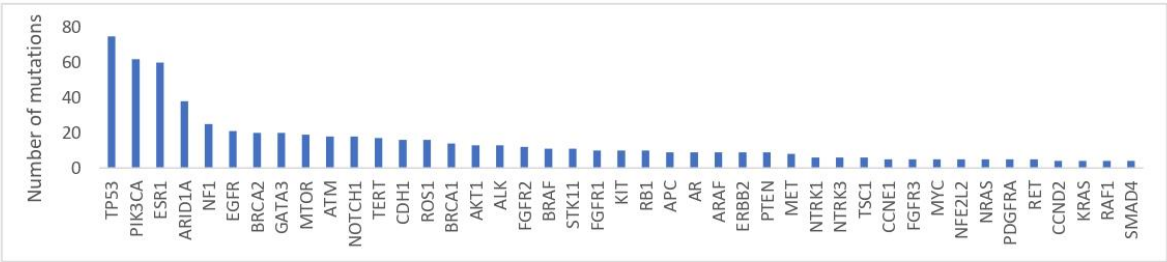


Fig 3. Frequency of gene mutations at baseline identified in the patient dataset. Only mutations with frequency ≥ 4 are shown.

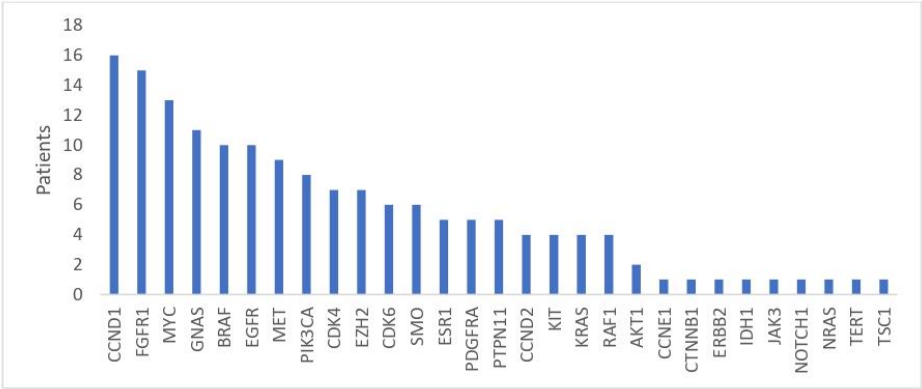


Fig 4. Frequency and distribution of gene copy number variations identified at baseline in the patient dataset.

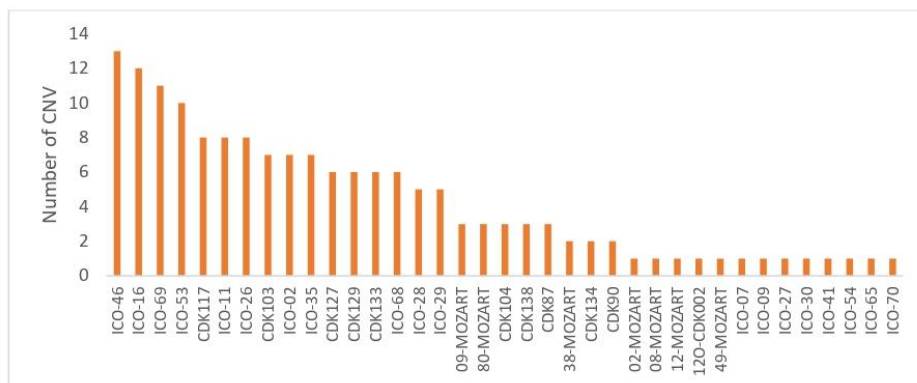


Fig 5. Number of copy number variations across all the patients at baseline in the patient dataset.

A total of 528 mutations were found at baseline; of them, 298 were detected in C1D15 and/or C2D1. The 528 baseline mutations were detected in 108 patients (mean 4.89 alterations per patient). From the 528 mutations in baseline, 276 had a VAF $\geq 0.4\%$ in 89 patients (mean of 3.1 alterations per patient), and 196 of these mutations were detected at some level in C1D15 and/or C2D1. 174 mutations were detected at C1D15 and/or C2D1 and not at baseline, but only 20 mutations with VAF $\geq 0.4\%$ were detected at C1D15 and/or C2D1 and not at baseline. Mean VAF (mVAF) of those mutations with VAF $\geq 0.4\%$ was 5.9 at baseline, 2.6 at C1D15 ($P < 0.001$) and 2.4 at C2D1 ($P < 0.001$).

We had available tissue samples collected from archival biopsies before treatment with CDK4/6i plus ET in 57 patients. As we showed in our previous study, all intrinsic molecular subtypes were identified using the PAM50 subtype predictor, although, again, Luminal A and B subtypes predominated (**Fig.6**).

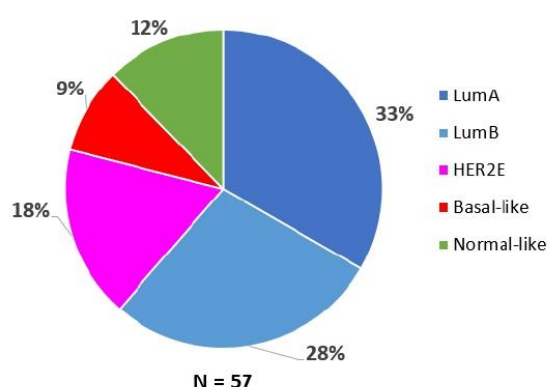


Fig 6. PAM50 distribution. LumA, luminal A; LumB, luminal B; HER2E, HER2-enriched.

To capture the magnitude of ctDNA response, a VAFR from C1D15 and C2D1 to baseline was calculated for each genetic mutation and a mVAFR was computed for each patient (see **methods**). From the 68 patients with C2D1 and baseline samples, 29% of patients had mVAFR of ≤ 0.3 (mVAFR-low), 21% had mVAFR of 0.31–0.99 (mVAFR-medium), 25% had a mVAFR of ≥ 1.0 (mVAFR-high) (**Fig.7** and **table 3**) and 25% were ctDNA-low.

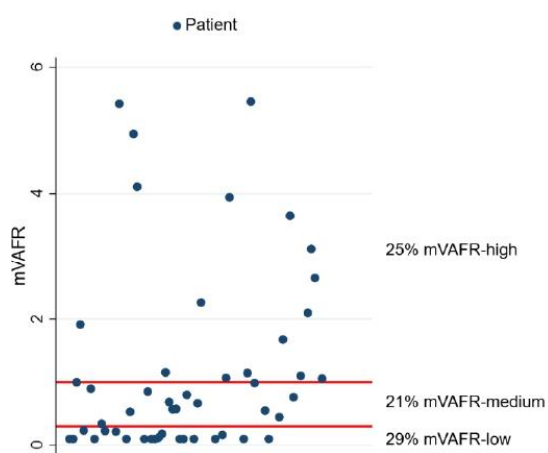


Fig. 7. Distribution plot of patients with mVAFR-low (mVAFR of ≤ 0.3), mVAFR-medium (mVAFR of 0.31–0.99) and mVAFR-high (mVAFR of ≥ 1.0) at C2D1.

Table 3. Clinical features of the patient dataset according to ctDNA levels and dynamics at C2D1.

	All patients N = 68	ctDNA-low N = 17	mVAFR-low N = 20	mVAFR-medium/high N = 31	p-value
Age					ns
Median (range) yr	66.4 (34-85)	61.2 (34-83)	65.6 (37-75)	69 (49-85)	
< 65 yr – no. (%)	32 (47%)	10 (59%)	10 (50%)	12 (39%)	
≥ 65 yr – no. (%)	36 (53%)	7 (41%)	10 (50%)	19 (61%)	
Line – no. (%)					ns
First	49 (72%)	14 (82%)	14 (70%)	21 (68%)	
Second	9 (13%)		3 (15%)	6 (19%)	
Third or more	10 (15%)	3 (18%)	3 (15%)	4 (13%)	
ECOG-PS^a – no. (%)					0.042
0	38 (56%)	12 (71%)	14 (70%)	12 (39%)	
1	26 (38%)	4 (24%)	6 (30%)	16 (52%)	
2	4 (6%)	1 (6%)		3 (10%)	
Endocrine therapy – no. (%)					ns
Aromatase inhibitor	36 (53%)	12 (71%)	11 (55%)	13 (42%)	
Fulvestrant	29 (43%)	5 (29%)	8 (40%)	16 (52%)	
Tamoxifen/SERD	3 (4%)		1 (5%)	2 (6%)	
Type of CDK4/6 inhibitor – no. (%)					ns
Palbociclib	18 (26%)	6 (35%)	6 (30%)	6 (19%)	
Ribociclib	37 (54%)	9 (53%)	9 (45%)	19 (61%)	
Abemaciclib	13 (19%)	2 (12%)	5 (25%)	6 (19%)	
Disease site – no. (%)					ns
Visceral	29 (43%)	7 (41%)	6 (30%)	16 (52%)	
Non visceral	39 (57%)	10 (59%)	14 (70%)	15 (48%)	
Number of metastatic locations – no. (%)					ns
<3	51 (75%)	15 (88%)	14 (70%)	22 (71%)	
≥3	17 (25%)	2 (12%)	6 (30%)	9 (29%)	
Prior hormone sensitivity – no. (%)					0.035
Sensitivity	54 (79%)	17 (100%)	16 (80%)	21 (68%)	
Resistance ^b	14 (21%)		4 (20%)	10 (32%)	

^aPS: performance status.

^bHormone resistance defined as relapse while on the first 2 years of adjuvant ET, or progression of disease within first 6 months of first-line ET for advanced BC, while on ET.

ns, non-significative

From the 72 patients with C1D15 and baseline samples, 27% of patients had mVAFR-low, 29% mVAFR-medium, 25% mVAFR-high (Fig.8 and table 4) and 19% were ctDNA-low.

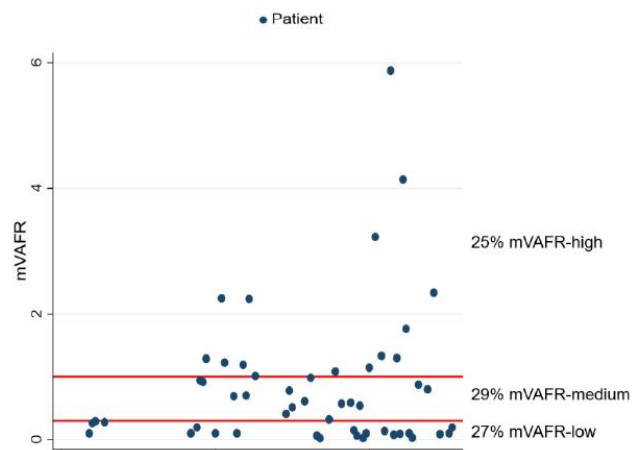


Fig. 8. Distribution plot of patients with mVAFR-low (mVAFR of ≤ 0.3), mVAFR-medium (mVAFR of 0.31–0.99) and mVAFR-high (mVAFR of ≥ 1.0) at C1D15.

Table 4. Clinical features of the patient dataset according to ctDNA levels and dynamics at C1D15.

	All patients N = 72	ctDNA-low N = 13	mVAFR-low N = 20	mVAFR-medium/high N = 39	p-value
Age					ns
Median (range) yr	61.9 (38-86)	53.4 (42-82)	65.7 (45-78)	61.4 (38-86)	
< 65 yr – no. (%)	46 (64%)	10 (77%)	9 (45%)	27 (69%)	
≥ 65 yr – no. (%)	26 (36%)	3 (23%)	11 (55%)	12 (31%)	
Line – no. (%)					ns
First	39 (54%)	9 (69%)	9 (45%)	21 (54%)	
Second	8 (11%)	1 (8%)		7 (18%)	
Third or more	25 (35%)	3 (23%)	11 (55%)	11 (28%)	
ECOG-PS^a – no. (%)					ns
0	23 (32%)	8 (62%)	4 (20%)	11 (28%)	
1	44 (61%)	5 (38%)	16 (80%)	23 (59%)	
2	5 (7%)			5 (13%)	
Endocrine therapy – no. (%)					ns
Aromatase inhibitor	40 (56%)	9 (69%)	11 (55%)	13 (42%)	
Fulvestrant	29 (40%)	4 (31%)	7 (35%)	16 (52%)	
Tamoxifen/SERD	3 (4%)		2 (10%)	1 (3%)	
Type of CDK4/6 inhibitor – no. (%)					ns
Palbociclib	38 (53%)	7 (54%)	13 (65%)	18 (46%)	
Ribociclib	26 (36%)	5 (38%)	4 (20%)	17 (44%)	
Abemaciclib	8 (11%)	1 (8%)	3 (15%)	4 (10%)	
Disease site – no. (%)					ns
Visceral	41 (57%)	6 (46%)	12 (60%)	23 (59%)	
Non visceral	31 (43%)	7 (54%)	8 (40%)	16 (41%)	
Number of metastatic locations – no. (%)					ns
<3	40 (56%)	9 (69%)	9 (45%)	22 (56%)	
≥3	32 (44%)	4 (31%)	11 (55%)	17 (44%)	
Prior hormone sensitivity – no. (%)					ns
Sensitivity	41 (57%)	8 (61%)	8 (40%)	25 (64%)	
Resistance ^b	31 (43%)	5 (38%)	12 (60%)	14 (36%)	

^aPS: performance status.

^bHormone resistance defined as relapse while on the first 2 years of adjuvant ET, or progression of disease within first 6 months of first-line ET for advanced BC, while on ET.

ns, non-significative

With a median follow-up of 16.5 months (95% CI 15.1-18.3), a significant association between the ctDNA groups at C2D1 and PFS was observed across all patients (**Fig.9**). Compared to the mVAFR-low, the mVAFR-high group was associated with worse PFS (11.2 months (95% CI 3.14-not reached [NR]) vs. NR (95% CI 15.67-NR)); HR=4.62 (95% CI 1.54–13.82, $p=0.006$). Similarly, the mVAFR-high and mVAFR-medium combined were associated with worse PFS compared to the mVAFR-low and ctDNA-low groups (14.12 months (95% CI 4.10–NR) vs NR (95% CI 19.34–NR)); HR=4.23 (95% CI 1.72–10.42, $p=0.002$). mVAFR groups also showed statistically significant association with OS ($p=0.001$) (**Fig.10**). Median OS was only reached in the mVAFR-high and mVAFR-medium groups, with 16.50 (14.68-NR) and 17.29 (13.49-NR) months, respectively.

We also calculated the logarithm transformation of the mVAFR (mVAFR_log), as we did in our previous work, and we divided the population with ctDNA-positive in tertiles according to the mVAFR_log.

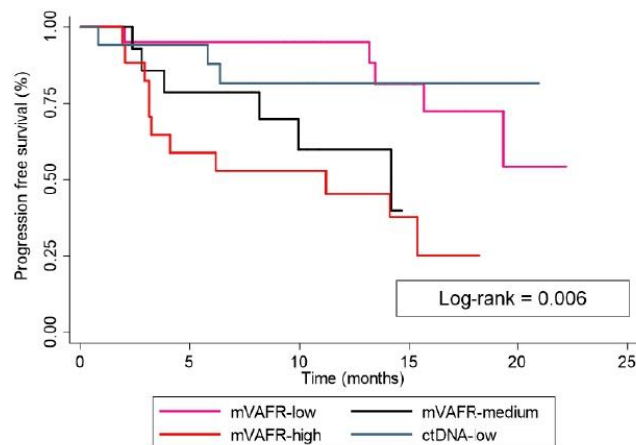


Fig. 9. Progression free survival based on ctDNA dynamics at C2D1. Patients are classified according to the mVAFR.

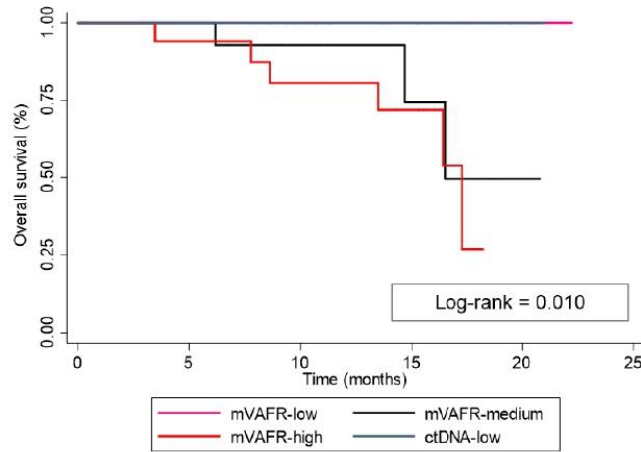


Fig. 10. Overall survival based on ctDNA dynamics at C2D1. Patients are classified according to the mVAFR.

Since the mVAFR is a ratio, its values are unstable for mutations with low baseline VAF (small denominators); thus, a small absolute increase in the VAF of such a C1D15 or C2D1 mutation (which can occur due to temporal variations of the ctDNA not related to disease) could provide an arithmetic mean biased towards a high mVAFR, especially in patients with a small number of detected mutations. Although this pattern of mutation behavior only occurred in 5 of the 120 patients, to address this potential issue we assigned an upper and lower limit of 10 and 0.1 to mVAFR values when the denomination was very high or low, respectively (**table 1**). Furthermore, the exclusion of cases with VAF < 0.4% at the two time points partially limited this problem. However, these mitigation strategies do not cover all possible cases and another potentially more equitable way of assessing ctDNA changes is to calculate the logarithm of each ratio and then the mean of the logarithms (mVAFR_log).

The correlation coefficient between both scores (i.e., simple arithmetic mean ratio and logarithm mean ratio) was 0.96 ($p < 0.001$) (**Fig.11**). The Kappa concordance score between mVAFR-based groups of patients and mVAFR_log-based groups of patients was 0.86 ($p < 0.001$).

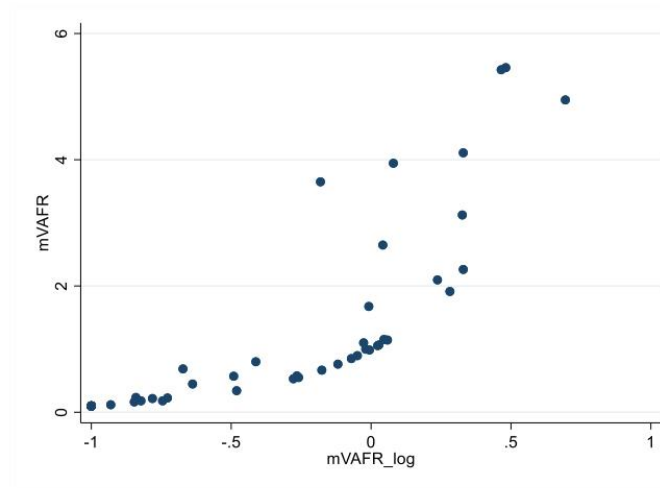


Fig. 11. Spearman correlation between mVAFR and mVAFR_log.

As expected, this method was also statistically significantly associated with PFS. The group of patients with ctDNA-low was considered again as an independent group. We consider then 4 groups, mVAFR_log-low (first tertile), mVAFR_log-medium (second tertile) and mVAFR_log-high (third tertile). mVAFR_log as a continuous variable was significantly associated with PFS when adjusting for treatment line and hormone-sensitivity (adjusted HR [aHR]=2.24, CI 95% 1.01-4.98, $p=0.047$), as well as mVAFR_log groups (aHR=4.95 for mVAFR_log-high group compared to mVAFR_log-low, CI 95% 1.49-16.45, $p=0.009$). A similar association with OS was observed (mVAFR_log as a continuous variable: $p=0.033$; mVAFR_log groups: $p<0.001$).

In our first work, the division into prognostic groups determined by the mVAFR cutoffs of 1 and 0.3 was arbitrary. Since mVAFR was found to be associated with PFS as a continuous variable, the cut-off points were chosen for the purposes of visualization and to facilitate the understanding of the data. The first study, with only 45 patients, did not attempt to define optimal thresholds. In the present study, with a larger group of 68 patients with C2D1 samples, the best cut-off point in C2D1 was explored using the MSRS methodology to define two prognostic groups based on PFS. The best cut-off point according to the mVAFR was found to be 0.22 (**Fig. 12 and Fig.13**) and -0.75 according to the mVAFR_log (**Fig.14 and Fig.15**).

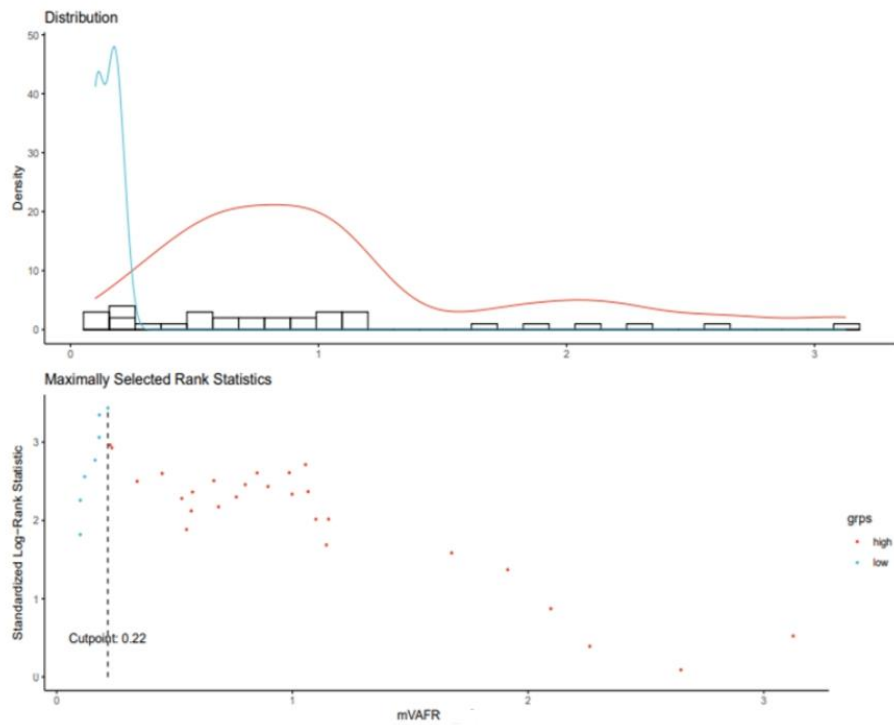


Fig.12. Analysis of the best cut-off point for the mVAFR in C2D1 using the MSRS methodology to define two prognostic groups based on PFS.

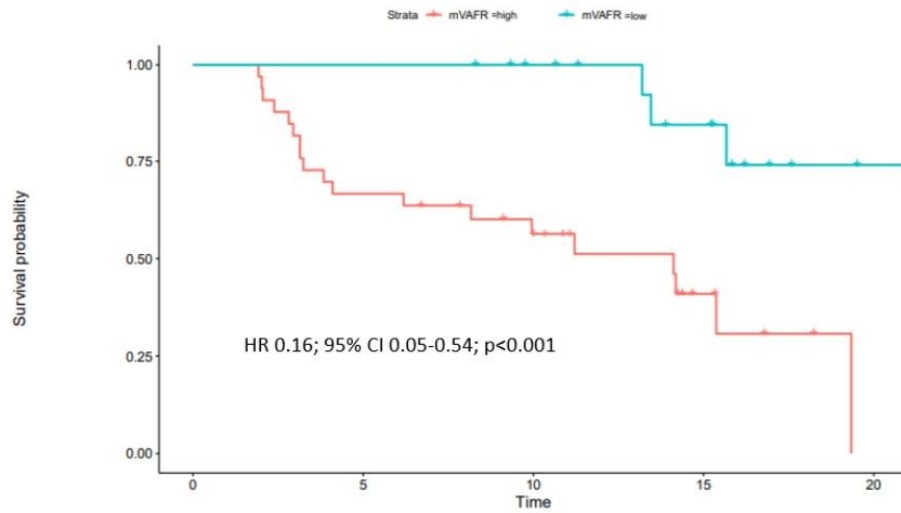


Figure 13. PFS according to the mVAFR groups based on the best cut-off point estimated with MSRS methodology.

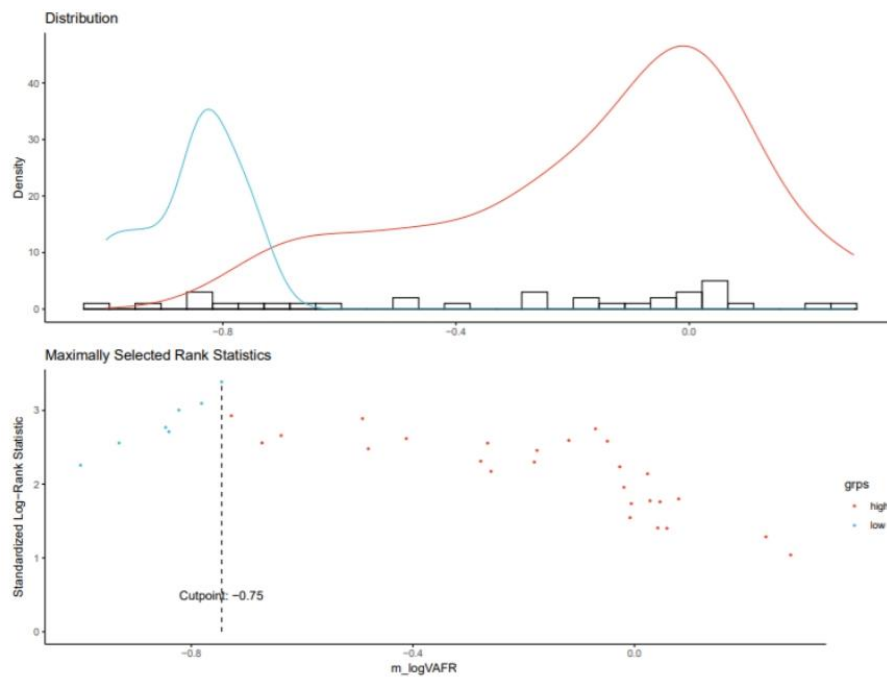


Fig.14. Analysis of the best cut-off point for the m_logVAFR in C2D1 using the MSRS methodology to define two prognostic groups based on PFS.

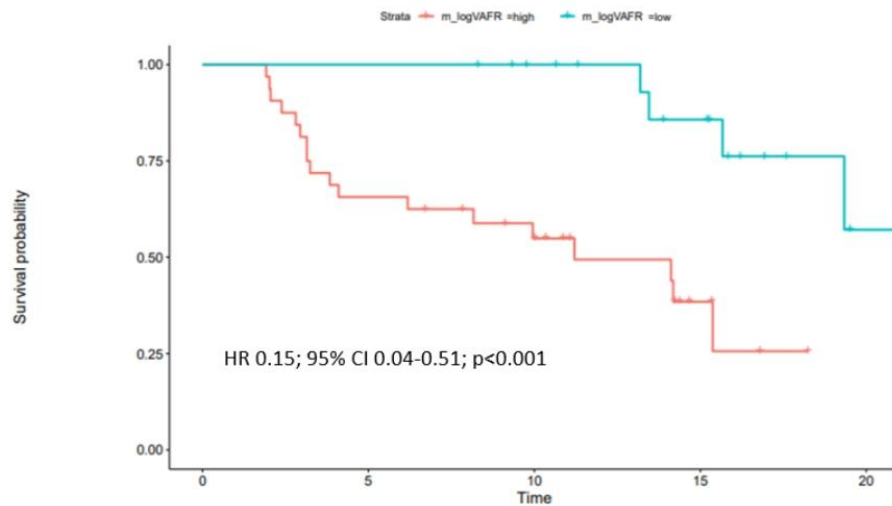


Figure 15. PFS according to the m_logVAFR groups based on the best cut-off point estimated with MSRS methodology.

We explored the results in the combined cohort (training [Martínez-Sáez. *npj Breast.* 2021] and validation datasets). We did not observe statistically significant differences between the clinical variables across the mVAFR or mVAFR_log groups, except for ECOG-PS ($p=0.02$).

We analyzed the association between the mVAFR_log at C2D1 with the intrinsic subtypes. The information regarding the molecular subtype was available for 54 patients. A statistically significant association with mVAFR_log and intrinsic subtypes ($p=0.022$) was observed (**Fig.16**). The distribution of mVAFR_log groups within each subtype is shown in **Fig.17**.

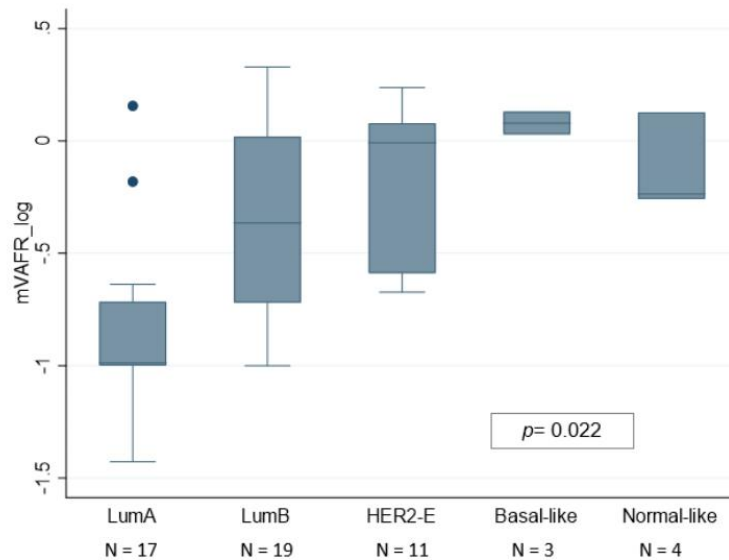


Fig. 16. Box plot with mVAFR_log values according to the intrinsic subtype. Differences in mVAFR_log levels among the subtypes were tested for significance using Kruskal-Wallis test. For each box plot, median and ranges are indicated. LumA, luminal A; LumB, luminal B; HER2E, HER2-enriched.

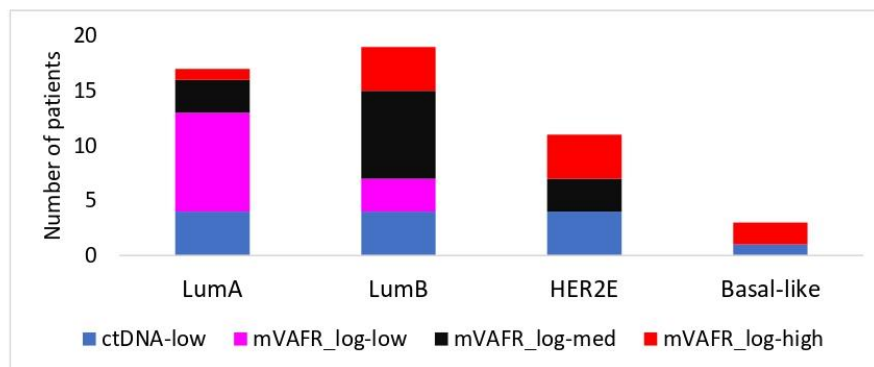


Fig. 17. Distribution of mVAFR_log groups within each intrinsic subtype. LumA, luminal A; LumB, luminal B; HER2E, HER2-enriched.

Finally, we studied the ctDNA dynamics in C1D15. We did not observe a significant association between the ctDNA dynamics at C1D15 with PFS or OS. mVAFR or the mVAFR_log as continuous variables, and mVAFR and mVAFR_log groups were not statistically associated with survival in the univariate analysis (data not shown).

Tercer trabajo: *Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Frequency and spectrum of *PIK3CA* somatic mutations in breast cancer



Olga Martínez-Sáez^{1,2,3}, Nuria Chic^{1,2,3}, Tomás Pascual^{1,2,3}, Barbara Adamo^{1,2,3}, Maria Vidal^{1,2,3}, Blanca González-Farré^{1,2,3,4}, Esther Sanfeliu^{1,2,3,4}, Francesco Schettini^{1,2,3,5}, Benedetta Conte^{1,2,3}, Fara Brasó-Maristany^{1,2,3}, Adela Rodríguez¹, Débora Martínez², Patricia Galván², Ana Belén Rodríguez¹, Antonio Martínez⁵, Montserrat Muñoz^{1,2,3} and Aleix Prat^{1,2,3*}

Abstract

Purpose: The therascreen *PIK3CA* mutation assay and the alpha-specific PI3K inhibitor alpelisib are FDA-approved for identifying and treating patients with advanced *PIK3CA*-mutated (*PIK3CA*mut) breast cancer (BC). However, it is currently unknown to what extent this assay detects most *PIK3CA* mutations in BC. This information is critical as patients and clinicians are using this and other genomic assays to indicate alpelisib.

Methods: Data from 6338 patients with BC was explored across 10 publicly available studies. The primary objective was to evaluate the proportion and distribution of *PIK3CA* mutations in BC. Secondary objectives were (1) to evaluate in silico the spectrum of *PIK3CA* mutations in BC that would be captured by the therascreen panel; (2) to evaluate the proportion and distribution of *PIK3CA* mutations in hormone receptor-positive/HER2-negative (HR+/HER2-), HER2+, and triple-negative BC (TNBC); and (3) to explore the identification of *PIK3CA* mutations in a cohort of 48 HR+/HER2- advanced BC patients by the Guardant B360 circulating tumor DNA (ctDNA) assay.

Results: Patients with *PIK3CA*mut tumors represented 35.7% (2261/6338). Five *PIK3CA* mutations comprised 73% of all *PIK3CA* mutations: H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), N345K (6%), and H1047L (4%). Therascreen gene list would capture 72% of all *PIK3CA* mutations and 80% of patients with a known *PIK3CA*mut BC. Among patients with double *PIK3CA*mut tumors (12% of all *PIK3CA*mut), the therascreen panel would capture 78% as harboring 1 single *PIK3CA* mutation, 17% as *PIK3CA*mut undetected, and 5% as *PIK3CA* double-mut. *PIK3CA* mutation rates were lower in TNBC (16%) compared to HR+/HER2 (42%) and HER2+ (31%) BC; however, the distribution of the 4 main *PIK3CA* mutations across subtypes was similar. Finally, 28% of *PIK3CA* mutations identified in ctDNA in 48 patients with advanced HR+/HER2- BC were not part of the therascreen panel.

(Continued on next page)

* Correspondence: alprat@clinic.cat

¹Department of Medical Oncology, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, 08035 Barcelona, Spain

²Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08035 Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



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

(Continued from previous page)

Conclusion: *PIK3CA* mutations in BC are heterogenous and ~ 20% of patients with a known *PIK3CA* mutation, and 95% with a known double *PIK3CA*mut tumor, would not be captured by the theascreen panel. Finally, the clinical utility of *PIK3CA* mutations not present in the theascreen companion diagnostic assay or identified by other sequencing-based assays needs further investigation.

Keywords: Breast cancer, *PIK3CA*, Mutations, Alpelisib, Companion diagnostic, Hotspot mutations, Therascreen, ctDNA

Introduction

Activating mutations in the *PIK3CA* are found in approximately 30–40% of patients with cancer and induce hyperactivation of the alpha isoform (p110 α) of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [1–3]. In patients with HR+/HER2– BC, mTOR/mTOR pathway has been associated with endocrine therapy resistance [4]. In addition, the role of this pathway is becoming increasingly important in HER2+ and TNBC [5–7]. Thus, inhibition of PI3K in *PIK3CA*-mutated BC has been a major focus in the last decade [3].

Alpelisib is an orally bioavailable, small-molecule, α -specific PI3K inhibitor that inhibits p110 α approximately 50 times as strongly as other isoforms [8]. Following successful preclinical and phase 1 data [4, 9], the SOLAR-1 phase III randomized trial evaluated the efficacy of alpelisib plus fulvestrant in 572 patients with HR+/HER2– advanced BC who had received prior endocrine therapy [10]. A clinically relevant treatment benefit was only observed in the cohort of patients with *PIK3CA*-mut disease. In May 2019, the FDA approved alpelisib for the treatment of patients with advanced *PIK3CA*mut HR+/HER2– BC.

Together with alpelisib, the FDA also approved the companion diagnostic theascreen® *PIK3CA* test (QIAGEN Manchester, Ltd.) used in SOLAR-1 to select patients who had *PIK3CA* mutations in tumor tissue specimens and/or in circulating tumor DNA (ctDNA) isolated from plasma specimens [11]. Therascreen *PIK3CA* detects 11 *PIK3CA* hotspot mutations, mostly found in exons 9 and 20 [11]. In SOLAR-1, the type of *PIK3CA* mutation did not seem to impact the main results [10].

In this context, patients and physicians might choose not to use the theascreen *PIK3CA* test and use other available tests, which provide a more comprehensive mutational analysis of *PIK3CA* as well as other genes. This might lead to the clinical situation where *PIK3CA* mutations not detected by the theascreen *PIK3CA* assay, and thus not evaluated in SOLAR-1, are used to indicate alpelisib. To define the potential frequency of this clinical situation, here we aimed to evaluate the distribution of *PIK3CA* mutations in BC in relation to the theascreen *PIK3CA* panel.

Methods

Datasets

All non-overlapping publicly available breast datasets (i.e., 12 studies and 6477 samples) (<https://www.mbcproject.org/data-release> [1, 12–21]) with *PIK3CA* mutational status were interrogated from cBio Cancer Genomics Portal (<http://cbioportal.org>) [22] (Fig. 1 and Additional file 1). Among them, 2 studies focused on 117 patient-derived xenografts [16] and 22 fibroepithelial lesions of the breast [17] were removed. The remaining combined dataset included 6338 invasive tumor samples of which 5535 (87.3%) originated from the METABRIC ($n = 2509$), the Memorial Sloan-Kettering ($n = 1918$), and The Cancer Genome Atlas ($n = 1108$) datasets. All studies analyzed performed targeted or whole exome sequencing (Table A1 Additional file 1). Only single nucleotide variants, insertions, or short deletions in *PIK3CA* were analyzed.

Therascreen *PIK3CA* mutation assay

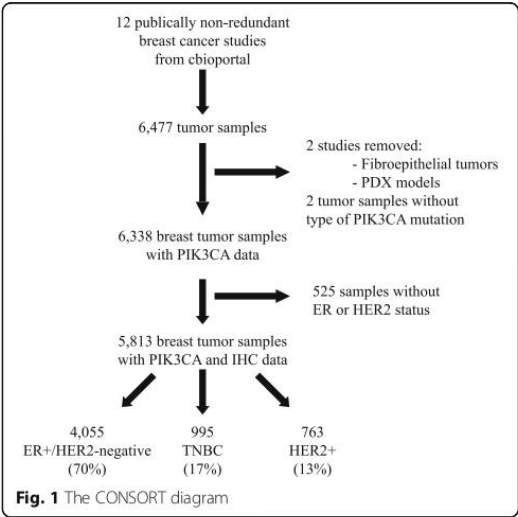
The theascreen® *PIK3CA* RGQ PCR Kit is a real-time qualitative PCR test for the detection of 11 mutations in *PIK3CA* gene (exon 7: C420R; exon 9: E542K, E545A, E545D, E545G, E545K, Q546E, and Q546R; and exon 20: H1047L, H1047R, and H1047Y) using genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumor tissue or ctDNA from plasma derived from K2EDTA anticoagulated peripheral whole blood taken from patients with BC [11].

Immunohistochemistry (IHC)-based subtypes

IHC data was available from 5813 patients (92%). Tumors were classified into the 3 main clinically relevant subtypes: (1) HR+/HER2–, (2) HER2+, and (3) TNBC. Tumors identified as progesterone receptor positive and HER2– were considered HR+ regardless of estrogen receptor (ER) status. Tumors identified as ER-negative and HER2– were considered TNBC when progesterone receptor status was not available.

Distribution of *PIK3CA* mutations in plasma

Frozen plasma samples from 48 patients with advanced HR+/HER2– BC were obtained before initiating a CDK4/6 inhibitor and endocrine therapy. Plasma samples were



sent to Guardant Health (California, USA), and the 74-gene standardized NGS-based assay, which includes all 21 exons from the *PIK3CA* gene, was performed.

Study end points

Primary objective was to evaluate the proportion and distribution of *PIK3CA* mutations in BC. Secondary objectives were (1) to evaluate in silico the spectrum of *PIK3CA* mutations in BC that would be captured by the theascreen panel; (2) to evaluate the proportion and distribution of *PIK3CA* mutations in HR+/HER2-, HER2+, and TNBC; and (3) to explore the identification of *PIK3CA* mutations in HR+/HER2- advanced BC by the Guardant B360 ctDNA assay.

Statistical analyses

Patient and tumor characteristics were analyzed using descriptive statistics.

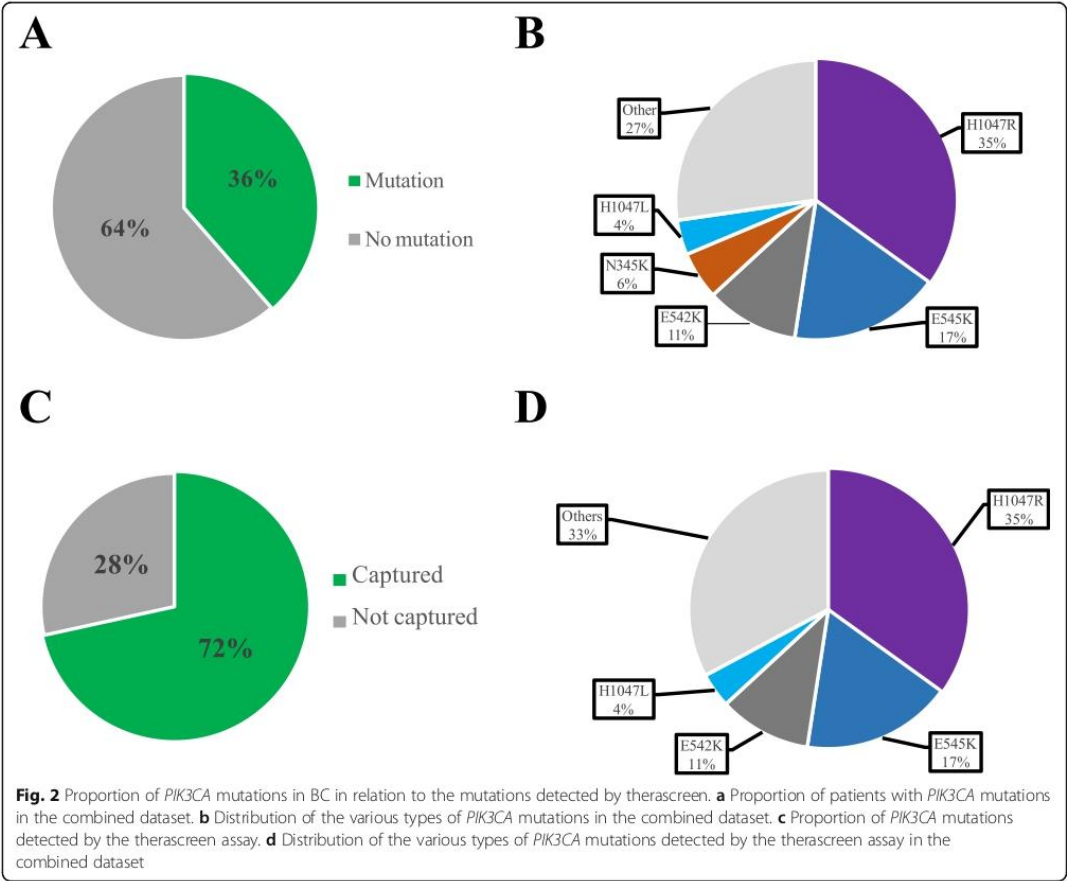


Table 1 The 20 most frequent *PIK3CA* mutations in BC

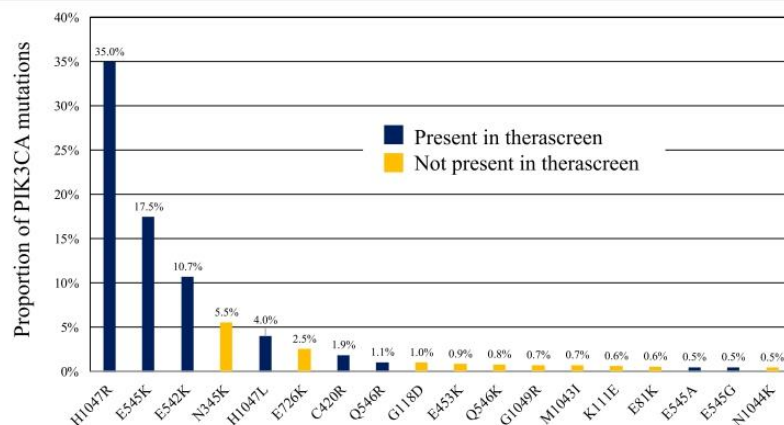
Type of <i>PIK3CA</i> mutation	Exon	Oncogenic by OncoKB ²⁴	Level of evidence to predict alpelisib benefit	Detected by therascreen	Number of mutations found in the combined dataset	Mutation frequency (%)
H1047R	20	Yes	1	Yes	895	35.0
E545K	9	Yes	1	Yes	447	17.5
E542K	9	Yes	1	Yes	274	10.7
N345K	4	Yes	Yes (preclinical only)	No	142	5.5
H1047L	20	Yes	1	Yes	103	4.0
E726K	13	Inconclusive. Probably oncogenic	Unknown	No	65	2.5
C420R	7	Yes	1	Yes	48	1.9
Q546R	9	Yes	1	Yes	27	1.1
G118D	1	Yes	Unknown	No	26	1.0
E453K	7	Yes	Unknown	No	22	0.9
Q546K	1	Yes	Yes (preclinical only)	No	21	0.8
G1049R	20	Yes	Yes (preclinical only)	No	19	0.7
M1043I	20	Yes	Unknown	No	19	0.7
K111E	1	Yes	Unknown	No	16	0.6
E81K	1	Inconclusive. Probably oncogenic	Unknown	No	15	0.6
E545A	9	Yes	1	Yes	13	0.5
E545G	9	Yes	1	Yes	13	0.5
N1044K	20	Yes	Unknown	No	12	0.5
E110del	1	Yes	Unknown	No	11	0.4
Q546P	9	Yes	Unknown	No	10	0.4

Results

Distribution of *PIK3CA* mutations in BC

In the combined dataset, 36% of patients had *PIK3CA*mut tumors (Fig. 2a). From a total of 2560 *PIK3CA* mutations, 205 *PIK3CA* mutations were unique. The most frequent *PIK3CA* mutations (i.e.,

frequency $\geq 4\%$ of all *PIK3CA*mut tumors) were found in exons 4, 9, and 20: H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), N345K (6%), and H1047L (4%) (Table 1, Fig. 2b). These 5 mutations comprised 73% of all *PIK3CA* mutations identified in the combined dataset.

**Fig. 3** Proportion of the 18 most frequent *PIK3CA* mutations in *PIK3CA*mut BC in the combined dataset

PIK3CA mutations captured by the therascreen panel

In the combined dataset, the proportion of *PIK3CA* mutations included in the therascreen panel was 72% (Fig. 2c). The most frequent types of *PIK3CA* mutation (i.e., frequency $\geq 4\%$ of all *PIK3CA*mut tumors) included in the therascreen panel were H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), and H1047L (4%) (Fig. 2d). These 4 mutations comprised 67% of all *PIK3CA* mutations detected in the dataset. Of note, N345K mutation in exon 4, which represents 6% of all tumor samples with a *PIK3CA* mutation, is not part of the therascreen panel (Fig. 3). Although the clinical utility of non-therascreen-detected *PIK3CA* mutations is currently unknown, the N345K lies within the C2 PI3K-type domain of the protein and confers a gain of function on PI3K, as does C420R (a tested mutation by therascreen assay) [23]. Moreover, N345K mutation has shown increased sensitivity to PI3K pathway inhibition in preclinical models [24]. Interestingly, Q546E *PIK3CA* mutation included in the therascreen panel was not found in the combined dataset.

Detection of multiple *PIK3CA* mutations in a tumor sample

Among 2261 patients with *PIK3CA*mut tumors, 1979 (87.5%) had 1 single mutation, 267 (11.8%) had 2 mutations, and 15 (0.7%) had 3 or more mutations. Overall, patients with tumors harboring double *PIK3CA* mutations represented 4% of all BC (Fig. 4a). Among patients with 1 single *PIK3CA* mutation, 80% would have mutations represented in the therascreen mutational panel (Fig. 4b). Among patients with 2 or more *PIK3CA* mutations, 78% would have 1 mutation represented in the therascreen panel; 17%, no mutation represented in the therascreen panel; and 5%, 2 or more mutations represented in the therascreen panel (Fig. 4c).

PIK3CA mutational distribution according to subtypes in the BC dataset

Among 5813 patients with IHC data, 4055 (70%) had HR+/HER2- disease, 995 had TNBC (17%), and 763

(13%) had HER2+ disease. *PIK3CA* mutations were less frequent in TNBC (16%) than in HR+/HER2- (42%) or HER2+ disease (31%) (Fig. 5a–c). However, the distribution of *PIK3CA* mutations was similar across subtypes (Fig. 5d–f). Seventy-one percent of mutations in HR+/HER2- BC, 75% in HER2+ BC, and 72% in TNBC would be represented in the therascreen panel.

Distribution of *PIK3CA* mutations in plasma ctDNA

Therascreen assay is approved for detecting *PIK3CA* mutations in ctDNA from plasma samples [25]. To evaluate the distribution of *PIK3CA* mutations in ctDNA using a highly sensitive assay that sequences all 21 *PIK3CA* exons, we tested plasma samples from 48 consecutive patients with metastatic HR+/HER2- BC from the Hospital Clinic of Barcelona using the Guardant B360 standardized assay [26]. All patients had recurred or progressed to prior lines and were about to initiate a CDK4/6 inhibitor and endocrine therapy. A *PIK3CA* mutation was detected in 17 patients (37%), and 1 patient (6%) had double *PIK3CA* mutation. The spectrum of *PIK3CA* mutations was similar to the one found in the previous in silico population analysis (Table A2 Additional file 1). More importantly, 5 patients (28%) had *PIK3CA* mutations not represented in the therascreen mutational panel.

Discussion

PIK3CA mutations have recently reached level 1 evidence for predicting benefit from alpelisib, an alpha-specific PI3K inhibitor, in combination with fulvestrant in patients with advanced HR+/HER2- BC previously treated with endocrine therapy [10]. In addition, several trials are now evaluating alpelisib and other alpha-specific PI3K inhibitors in other BC subtypes harboring *PIK3CA* mutations [27]. Thus, there is a need to better understand the heterogeneity of the mutational landscape of *PIK3CA* and, at the same time, relate this heterogeneity with the recently introduced therascreen

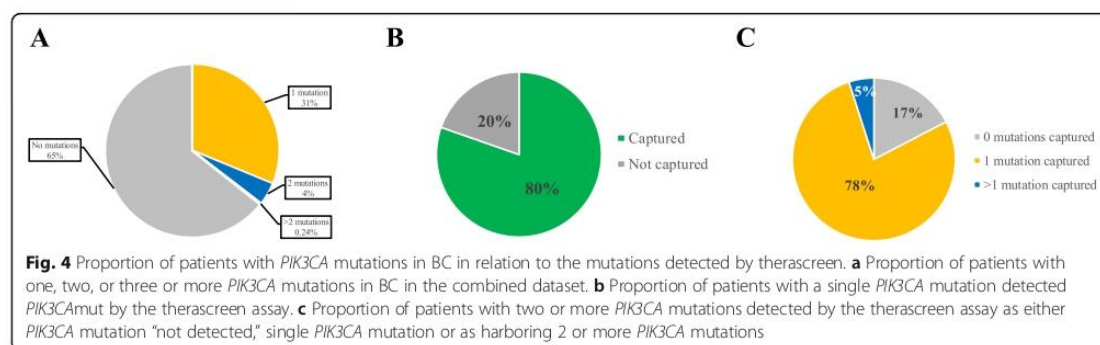
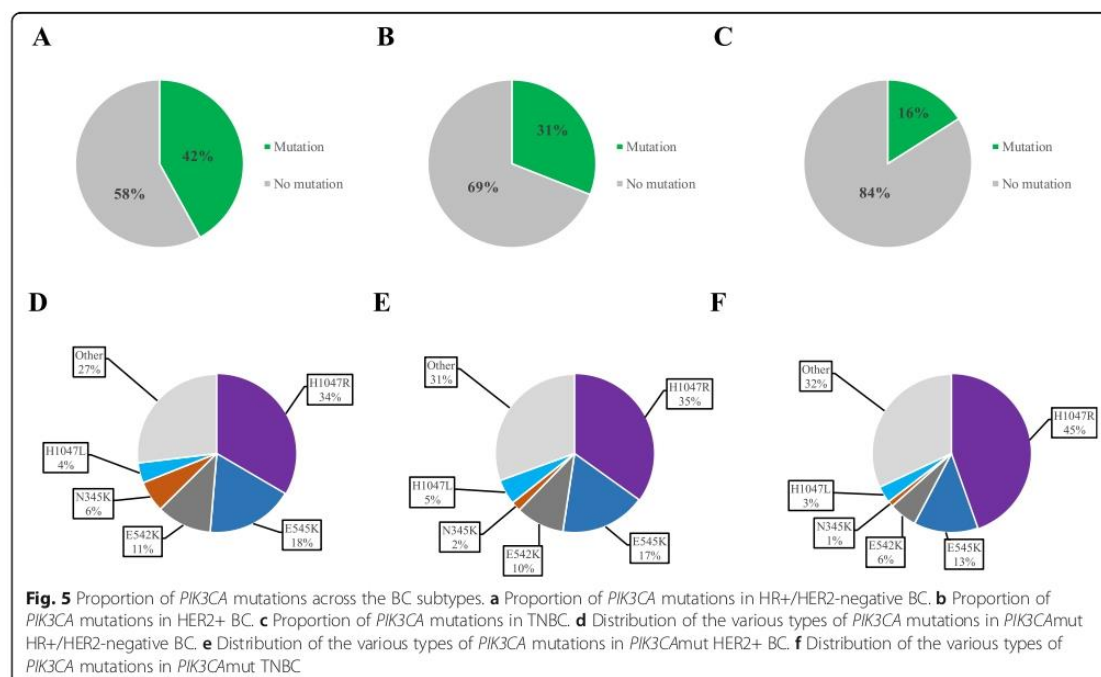


Fig. 4 Proportion of patients with *PIK3CA* mutations in BC in relation to the mutations detected by therascreen. **a** Proportion of patients with one, two, or three or more *PIK3CA* mutations in BC in the combined dataset. **b** Proportion of patients with a single *PIK3CA* mutation detected by the therascreen assay. **c** Proportion of patients with two or more *PIK3CA* mutations detected by the therascreen assay as either *PIK3CA* mutation “not detected,” single *PIK3CA* mutation or as harboring 2 or more *PIK3CA* mutations



PIK3CA companion diagnostic assay approved to indicate alpelisib.

To address this topic, we performed a comprehensive evaluation of the distribution of *PIK3CA* mutations in BC and made the following observations. First, although *PIK3CA* mutations are highly heterogeneous, 5 mutations (H1047R, E545K, E542K, N345K, and H1047L) represented ~70% of all known types of *PIK3CA* mutations in the dataset. Second, the therascreen *PIK3CA* mutational panel would represent 72% of all the known *PIK3CA* mutations and 80% of all patients with a known *PIK3CA* mutation. Third, 83% of patients with 2 or more *PIK3CA* known mutations would have mutations found in the therascreen panel; however, in 78% of the cases, only 1 single *PIK3CA* mutation would be represented in the therascreen assay. Finally, the proportion of *PIK3CA* mutations differed by BC subtype with HR+/HER2- disease having the highest proportion, followed by HER2+ disease and TNBC. Although less frequent in the HER2+ and TNBC, the proportion is not negligible and several studies, including pivotal or registrational clinical trials, are focusing on these two populations [5–7]. To our knowledge, this is the first report to perform a comprehensive analysis of *PIK3CA* mutations in BC and to relate these findings with the type of mutations captured by the therascreen *PIK3CA* assay across the three main subtypes of BC.

The SOLAR-1 phase III trial that led to the approval of alpelisib used the therascreen *PIK3CA* 11-mutation assay in tumor tissue to identify *PIK3CA* mutations [10]. From a total of 1173 patients tested for *PIK3CA* mutation status that had interpretable results, 341 (29%) patients had *PIK3CA*mut disease [10], a proportion which is very similar (28%) to our predicted results if the assay would have been performed in our combined dataset. More importantly, mutations in exon 9 versus exon 20 predicted similarly the degree of benefit to alpelisib in SOLAR-1 [10]. Thus, based on these results, the FDA approved the use of this assay in tumor and plasma samples as a companion diagnostic to indicate alpelisib. The approval of therascreen in plasma samples is based on a subanalysis of the SOLAR-1 trial which showed that *PIK3CA* mutations identified in plasma samples were also associated with treatment benefit [28].

Our results have important considerations for patients and physicians. In certain parts of the world, determination of *PIK3CA* status is commonplace using various types of sequencing-based assays. Some of these widely used assays such as Foundation One CDx or Guardant360 cover most or all exons of the *PIK3CA* gene. Thus, it is highly likely that mutations which are not part of the therascreen *PIK3CA* 11-mutation assay will be identified with other assays and treatment decisions will be made. In other parts of the world that have not yet implemented somatic genetic testing in BC, the fact

that the therascreen panel misses ~20–30% of patients with known *PIK3CA* mutations might be a reason to choose more comprehensive *PIK3CA* panels.

Critical questions raised by our results are if patients with *PIK3CA* mutations which are not part of the therascreen panel, or hotspot and non-hotspot *PIK3CA* mutations identified using sequencing-based assays with higher sensitivities than therascreen, will benefit from alpelisib. For example, mutation N345K represented 5.5% of all *PIK3CA* mutations in the analyzed dataset and is not captured by the therascreen assay. This mutation was the fourth most frequent *PIK3CA* mutation in the BC dataset, and COSMIC [29] and OncoKB [30] datasets consider it pathogenic (score 0.95) and oncogenic. Moreover, N345K confers a gain of function and it has shown to increase sensitivity to PI3K inhibitors in preclinical models [23, 24]. A similar situation exists for the sixth most frequently observed *PIK3CA* mutation, E726K, although OncoKB [30] states that there is conflicting and/or weak data describing the oncogenic function of this mutation, it has been shown that as a single mutation it is weakly activating but as a double mutation (with E545K or H1047R) it is synergistically activating [31]. It is important to notice that the vast majority of E726K mutations are found precisely as double mutants in BC [31]. On the other hand, some less frequent mutations, as G1049R, have demonstrated strong driver activity in a mutation assessment platform. G1049R exhibited activity levels similar to the E542K variant with 20-fold higher frequency [24]. Thus, better functional characterization of these and other non-hotspot *PIK3CA* mutations together with clinical evidence that predict benefit to alpelisib and other alpha-specific PI3K inhibitors is now of uttermost importance. At the end of the day, each type of *PIK3CA* mutation should be considered a biomarker by itself.

Another interesting observation is that ~4% of all BC, or ~12% of all patients with *PIK3CA*mut BC, have double *PIK3CA* mutations. Preclinically, double compound *PIK3CA* mutations result in increased PI3K activity and downstream signaling compared to single hotspot mutants in nontransformed cells and in HR+ BC cells [31]. More importantly, these compound mutations seem to predict for increased sensitivity to PI3K alpha-specific inhibitors compared to single hotspot mutants in both preclinical models and also in selected patients with BC treated in early phase 1 trials [31]. According to our results, the therascreen panel would not capture well double *PIK3CA* mutations since only 5% of patients known to harbor 2 or more *PIK3CA* mutations would have mutations represented in the therascreen panel. Thus, if double mutations are confirmed to be a biomarker of ultra-high sensitivity to alpelisib, the therascreen assay might not be ideal for this purpose.

Our study has limitations worth noting. First, we did not evaluate the actual analytical concordance of the therascreen assay versus other sequencing assays. In other words, we assumed that the results of the combined dataset using various sequencing-based strategies was the gold standard and that the therascreen assay would identify 100% of all the *PIK3CA*-wild-type tumors as “no *PIK3CA* mutation detected” and 100% of all the *PIK3CA*mut tumors in the combined dataset as “*PIK3CA*mut” if the type of mutation was on the therascreen mutation panel. However, the differences in the sensitive and specificity of the various sequencing assays will affect the concordance rates among them [32, 33]. According to the FDA therascreen *PIK3CA* assay specification sheet, the overall percent agreement between the therascreen assay and an NGS-based assay in SOLAR-1 was 94.7%. Second, the next-generation sequencing assays and the methods used across the 10 studies evaluated in our study are highly heterogeneous and most are not standardized. Third, the analyzed datasets were mostly from primary tumor samples and acquisition of new *PIK3CA* mutations has been described in the metastatic setting in 8–10% of the cases [34]. Whether the frequency and spectrum of *PIK3CA* mutations would change if metastatic-only samples had been analyzed is currently unknown.

Conclusion

PIK3CA somatic mutations in BC are highly heterogeneous, and the currently validated therascreen companion diagnostic test, which covers 11 hotspot mutations, might not capture up to 20% of patients with *PIK3CA* mutations. Thus, there is an urgent need to better understand if patients with *PIK3CA* mutations not detected by the therascreen assay, and predicted to be oncogenic and activating, can benefit from alpelisib or other PI3K inhibitors. Better functional characterization of these and other non-hotspot *PIK3CA* mutations together with further clinical studies in tumor and plasma samples from SOLAR-1 and other studies will help to better determine the population of patients who benefit from alpelisib or other alpha-specific PI3K inhibitors.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01284-9>.

Additional file 1: Table A1. Main features of the 10 publicly available studies analyzed. **Table A2.** *PIK3CA* mutations found in plasma ctDNA (Guardant B360 assay) in a cohort of patients from Hospital Clinic of Barcelona.

Acknowledgements

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III - PI16/00904 (to A.P.), PI19/01846 (to A.P.), Pas a Pas (to A.P.), Save the Mama (to A.P.), American Association of Cancer Research Career Development Awards for

Translational Breast Cancer Research – Breast Cancer Research Foundation (Grant ID: 19-20-26-PRAT) (to A.P.), Fundación Mutua Madrileña (to A.P.), Breast Cancer Now (Grant ID: 2018NovPCC1294) (to A.P.), Fundación Quirón-Salud (to A.P.), Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer (Ayuda Postdoctoral AECC 2017) to F. B-M, PhD4MD (Ayuda Predoctoral) to N.C., European Union's Horizon 2020 and innovation programme under grant agreement No. 847912 (to A.P.), and Fundació La Marató TV3 under Grant ID 201935-30 (to A.P.).

Authors' contributions

OM-S and AP have made substantial contributions to the conception and design of the work and acquisition, analysis, and interpretation of data. OM-S, NC, TP, BA, MV, BG, ES, FS, BC, FB-M, AR, DM, PG, ABR, AM, MM, and AP have drafted the work or substantially revised it. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors received no specific funding for this work.

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available in <http://cbioportal.org>.

Ethics approval and consent to participate

The study was performed in accordance with Good Clinical Practice guidelines and the World Medical Association Declaration of Helsinki. Patients provided written informed consent. Approvals for the study protocol were obtained from independent ethics committees.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

AP reports that his institution received research funding from Nanostring Technologies, Roche, and Novartis. AP reports consulting and lecture fees from Nanostring Technologies, Roche, Novartis, Pfizer, Oncolytics Biotech, Amgen, Lilly, MSD, and PUMA.

Author details

¹Department of Medical Oncology, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, 08035 Barcelona, Spain. ²Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08035 Barcelona, Spain. ³SOLTI Breast Cancer Research Group, Barcelona, Spain. ⁴Pathology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08035, Spain. ⁵University of Naples Federico II, Naples, Italy.

Received: 19 November 2019 Accepted: 24 April 2020

Published online: 13 May 2020

References

1. Curtis C, et al. The Cancer Genome Atlas network. *Nature*. 2012;490(7418):61–70.
2. Mollon L, Aguilar A, Anderson E, et al. Abstract 1207: a systematic literature review of the prevalence of PIK3CA mutations and mutation hotspots in HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2018;78:1207.
3. Goncalves MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase, growth disorders, and cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2052–62.
4. Bosch A, Li Z, Bergamaschi A, Ellis H, Toska E, Prat A, et al. PI3K inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer. *HHS Public Access*. 2016;7(283).
5. Sharma P, Abramson VG, O'Dea A, et al. Clinical and biomarker results from phase I/II study of PI3K inhibitor BYL 719 (alpelisib) plus nab-paclitaxel in HER2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):1018.
6. Kim PS, Korea S, Dent R, Centre NC, Im S, Korea S, et al. *HHS Public Access*. 2018;18(10):1360–72.
7. Saura C, Bendell J, Jerusalem G, Su S, Ru Q, De Buck S, et al. Phase Ib study of buparlisib plus trastuzumab in patients with HER2-positive advanced or metastatic breast cancer that has progressed on trastuzumab-based therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1935–45.
8. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the novel and specific PI3Ka inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(5):1117–29.
9. Juric D, Janku F, Rodón J, Burris HA, Mayer IA, Schuler M, et al. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-altered and PIK3CA-wild-type estrogen receptor-positive advanced breast cancer: a phase 1b clinical trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(2):1–9.
10. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929–40.
11. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190001C.pdf. Accessed 02 Oct 2019.
12. Martelotto LG, De Filippo MR, Ng CK, Natrajan R, Fuhrmann L, Cyta J, et al. Genomic landscape of adenoid cystic carcinoma of the breast. *J Pathol*. 2015;237(2):179–89.
13. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell*. 2015;163(2):506–19.
14. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollen HKM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2433 breast cancers defines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016;7:11479.
15. Razavi P, Chang MT, Xu G, Bandlamudi C, Dara S, Vasan N, et al. *HHS Public Access*. 2019;34(3):427–38.
16. Erew P, Steif A, Khattri J, Ha G, Yap D, Biele J, et al. Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single cell resolution. *Nature*. 2016;518(7539):422–26.
17. Tan J, Ong CK, Lim WK, Ng CCY, Thike AA, Ng LM, et al. Genomic landscapes of breast fibroepithelial tumors. *Nat Genet*. 2015;47(11):1341–5.
18. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):395–9.
19. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012;486(7403):405–9.
20. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400–4.
21. Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, et al. Mutational profile of metastatic breast cancers: a retrospective analysis. *PLoS Med*. 2016;13(12):e1002201.
22. Cerami E, Gao J, Dogruoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401–4.
23. Gymnopoulou M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5569–74.
24. Dogruluk T, Tsang YH, Espitia M, Chen F, Chen T, Chong Z, et al. Identification of variant-specific functions of PIK3CA by rapid phenotyping of rare mutations. *Cancer Res*. 2015;75(24):5341–54.
25. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P190004>, (May 2019).
26. Guardant Health. Guardant 360. <http://www.guardant360.com/>.
27. Costa RL, Han HS, Gradishar WJ. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(3):397–406.
28. Juric D, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo H, et al. Abstract GS3-08: Alpelisib + fulvestrant for advanced breast cancer: subgroup analyses from the phase III SOLAR-1 trial. *Cancer Res February*. 2019;79:GS3-08.
29. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941–7.
30. Chakravarty D, Gao J, Phillips S, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: a precision oncology knowledge base. *JCO Precis Oncol*. 2017;1:1–16.
31. Vasan N, Razavi P, Johnson JL, Shao H, Shah H, Antoine A, et al. Double PIK3CA mutations in cis increase oncogenicity and sensitivity to PI3Ka inhibitors. *Science*. 2019;366(6466):714–23.
32. Supplee JG, Milan MSD, Lim LP, Potts KT, Sholl LM, Oxnard GR, et al. Sensitivity of next-generation sequencing assays detecting oncogenic fusions in plasma cell-free DNA. *Lung Cancer*. 2019;134:96–99.

33. Torga G, Pienta KJ. Patient-paired sample congruence between 2 commercial liquid biopsy tests. *JAMA Oncology*. 2018;4(6):868–70.
34. O’leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The genetic landscape and clonal evolution of breast cancer resistance to palbociclib plus fulvestrant in the PALOMA-3 trial. *Cancer Discov*. 2018;11:1390–403.

Publisher’s Note

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

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



DISCUSIÓN

El cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo representa aproximadamente el 70% de los nuevos diagnósticos de cáncer de mama y es la causa de la mayoría de las recurrencias y muertes por esta enfermedad (21). Aunque la mayoría de las pacientes se diagnostican en estadios localizados, aproximadamente un 20-30% de las pacientes con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo presenta una recaída metastásica (17,160). La supervivencia global en el escenario metastásico se sitúa alrededor de los 5 años, lo que refleja el gran impacto que la enfermedad tiene en la comunidad y, por lo tanto, la necesidad de mejorar nuestra comprensión de la biología de estos tumores y de identificar nuevas terapias o enfoques terapéuticos para aumentar la supervivencia y calidad de vida de las pacientes (209).

En los últimos años se han producido dos importantes mejoras en el panorama terapéutico de esta enfermedad; tres inhibidores de CDK4/6 han sido aprobados en primera línea, y en líneas sucesivas cuando no han sido administrados previamente, y también un inhibidor de PI3K α , alpelisib, en pacientes con tumores con mutaciones en *PIK3CA*, lo cual es relevante dada la alta frecuencia de estas mutaciones en cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo, especialmente tras haber recibido terapia endocrina (209,260).

Sin embargo, aunque los inhibidores de CDK4/6 se han convertido en el tratamiento estándar en primera línea, no todas las pacientes se benefician de esta terapia y la enfermedad finalmente progresa en todas ellas. Los mecanismos de resistencia son múltiples y a pesar de que actualmente existe un amplio desarrollo de investigación en este campo, no disponemos todavía de biomarcadores validados con la capacidad de identificar resistencias intrínsecas o tempranas, lo que representa un área de necesidad clínica no cubierta.

Se ha sugerido que la dinámica precoz del ctDNA después de 2-4 semanas de tratamiento con inhibidores de CDK4/6 podría ser un predictor temprano de beneficio terapéutico. Esta cuestión es abordada por el primer y segundo trabajos. El análisis de la dinámica precoz de ctDNA podría ayudar a estratificar a las pacientes en grupos pronósticos lo que resultaría útil para la selección de las pacientes candidatas a mantener o cambiar el tratamiento de forma temprana y también para el diseño de ensayos clínicos con nuevas estrategias terapéuticas.

Por otro lado, el análisis de ctDNA mediante secuenciación dirigida también puede detectar la presencia de mutaciones de *PIK3CA* que permitiría el empleo de un inhibidor de PI3K α en estas pacientes. Actualmente, el uso del inhibidor de PI3K α alpelisib está subordinado a la presencia de

mutaciones de *PIK3CA*, sin embargo, el test theascreen® aprobado por la FDA detecta solo 11 de estas mutaciones. El tercer trabajo analiza la distribución de las mutaciones de *PIK3CA* en cáncer de mama, tanto *in silico* como en las dos cohortes de pacientes con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo metastásico estudiadas en el primer y segundo trabajos, y evalúa el porcentaje de casos que no serían detectados por esta prueba y, por tanto, no podrían beneficiarse del tratamiento.

Primer y segundo trabajos: *“Circulating tumor DNA dynamics in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy”* y *“Independent validation of circulating tumor DNA dynamics to predict survival in advanced hormone receptor positive/HER2-negative breast cancer treated with CDK4/6 inhibitors and endocrine therapy in a multicentric cohort”*

Los resultados del primer y segundo trabajos confirman la primera hipótesis de esta tesis doctoral. La dinámica precoz de ctDNA, a las 4 semanas tras el inicio de tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y terapia endocrina, analizada con el panel de secuenciación dirigida de 74 genes Guardant360®, se asocia a supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo.

Como se comentó ya en la introducción, se han descrito muy diversas formas de medir los cambios en el ctDNA en distintos tumores tratados con diferentes terapias, sin que exista un método estandarizado para ello. En nuestro estudio optamos por utilizar un enfoque imparcial y analizar cualquier mutación somática detectada al inicio del estudio con una VAF por encima de 0.4% y seguir sus niveles durante la terapia. Para capturar la magnitud de la respuesta por ctDNA decidimos tomar la proporción o ratio de cada alteración detectada y calcular la media de las ratios (en pacientes con más de una alteración) para resumir todas las ratios potenciales entre el C2D1 y el C1D1, una metodología muy similar a la propuesta por otros estudios como el de Zhang et al. (139). De esta manera, nuestro enfoque no se basa en genes o mutaciones específicas, a diferencia de otros estudios que eligen solo una mutación o la mutación con mayor VAF, ya que consideramos que esta metodología pierde gran cantidad de información. De hecho, en el primer trabajo, aunque el VAFR analizado solo con la mutación más frecuente se asoció de forma estadísticamente significativa a la supervivencia libre de progresión, el índice C de Harrel fue considerablemente inferior al obtenido con el mVAFR y con el mVAFR_log (0.58, 0.66 y 0.63, respectivamente). El VAFR calculado solo con la mutación más frecuente no presentó asociación estadísticamente significativa con la supervivencia global, mientras que sí se observó esta asociación tanto con el mVAFR como con el mVAFR_log.

Un aspecto muy relevante de nuestra metodología es que el mVAFR se asoció significativamente con la supervivencia libre de progresión en variable continua, mientras que los otros métodos analizados

en el mismo conjunto de datos, como la VAF media basal, la VAF media en C2D1 o el cambio absoluto o delta de la VAF media entre ambos puntos no presentaron dicha asociación con la supervivencia libre de progresión en variable continua. Por lo tanto, en las dos series nuestro método basado en el mVAFR predice mejor la supervivencia libre de progresión en comparación con otros métodos utilizados en diferentes estudios para analizar la dinámica de ctDNA.

Sin embargo, la metodología utilizada con el mVAFR presenta también inconvenientes. Dado que es un cociente, sus valores son inestables para mutaciones con VAF basales bajas (denominadores pequeños); como tal, un pequeño aumento absoluto en la VAF de dicha mutación en C2D1 (que puede ocurrir debido a variaciones temporales del ctDNA no relacionadas con la enfermedad) podría proporcionar una media aritmética sesgada hacia un mVAFR alto sobre todo en pacientes con pequeño número de mutaciones detectadas. Por ejemplo, podríamos encontrar a un paciente con dos mutaciones (una mutación clonal: m1 y una mutación subclonal: m2) con VAF basales del 10% y 0.4% y VAF C2D1 del 0.5% y 0.8%, respectivamente. Esto correspondería a $VAFR_{m1}=0.05$ $[0.5 / 10]$ y $VAFR_{m2}=2$ $[0.4 / 0.8]$. El mVAFR de este paciente sería 1.025 $[(0.05 + 2) / 2]$ y este paciente sería clasificado en el grupo de mVAFR alto. Esta podría suponer una evaluación incorrecta de la respuesta del ctDNA considerando la marcada disminución que se ha producido en la VAF de la mutación clonal de 10 a 0.5%, lo cual probablemente sea mucho más relevante que el pequeño aumento absoluto en la VAF de la mutación subclonal de 0.4 a 0.8%. Si bien este patrón de comportamiento de mutaciones solo se produjo en 1 de los 45 pacientes del primer trabajo y en 5 de los 120 del segundo, para abordar el potencial problema asignamos valores de mVAFR límites de 10 y 0.1 cuando el denominador era muy alto o bajo, respectivamente, corrigiendo así las proporciones asimétricas. Además, la exclusión de casos con $VAF < 0.4\%$ en los dos momentos temporales limita parcialmente este problema. No obstante, estas estrategias de mitigación no cubren todos los casos posibles y otra posibilidad potencialmente más equitativa para valorar los cambios de ctDNA consiste en calcular el logaritmo de cada razón y luego la media de los logaritmos ($mVAFR_{log}$). De esta manera el valor de $VAFR=1$ se corresponde con el 0 en escala logarítmica. Así, para el ejemplo anterior tendríamos que el logaritmo de $0.5/10=-1.3$ y el logaritmo de $0.8/0.4=0.3$, con lo que el $mVAFR_{log}$ $[(-1.3 + 0.3) / 2]=-0.5$. A diferencia de lo que sucedía con el mVAFR este valor indica un descenso global en la media de las VAF tras un ciclo de tratamiento, dando más peso al gran descenso producido en la mutación clonal m1.

Dadas las ventajas del método logarítmico investigamos la posibilidad de emplear el $mVAFR_{log}$ y calculamos el coeficiente de correlación entre ambas puntuaciones ($mVAFR$ y $mVAFR_{log}$) que resultó del 0.94 en el primer trabajo y del 0.96 en el segundo. Como cabía esperar, este método de puntuación también se asoció con la supervivencia libre de progresión de forma estadísticamente

significativa. La puntuación de concordancia Kappa entre los grupos de pacientes clasificados según el mVAFR y los grupos de pacientes basados en el mVAFR_log fue de 0.88 en el primer trabajo y de 0.86 en el segundo. Por tanto, podríamos utilizar indistintamente el mVAFR o el mVAFR_log, que en realidad es una medida probablemente más equitativa para valorar tanto los ascensos como los descensos de VAF tras un ciclo de tratamiento.

Es importante señalar que la división en grupos pronósticos determinados por los puntos de corte del mVAFR de 1 y 0.3 es arbitraria. Dado que el mVAFR se encontró asociado con la supervivencia libre de progresión como una variable continua, los puntos de corte se eligieron con fines de visualización y facilitación de la comprensión de los datos. El primer trabajo, con solo 45 pacientes, no intenta definir los umbrales óptimos. En el segundo trabajo, con un grupo más grande, de 68 pacientes, se exploró *ad hoc* el mejor punto de corte mediante la metodología “*maximal selected rank statistics*” para definir dos grupos pronóstico en función de la supervivencia libre de progresión. Se objetivó que el mejor punto de corte según el mVAFR era 0.22, y de -0.75 según el mVAFR_log.

En el momento de la publicación del primer trabajo no se presentaron datos de supervivencia global debido al corto seguimiento, pero con un seguimiento de más de dos años se observa que la dinámica precoz de ctDNA se asocia a supervivencia global en la primera cohorte (primer trabajo) tanto en variable continua ($p=0.009$) como por grupos de mVAFR ($p=0.006$ cuando se compara el grupo mVAFR-high vs mVAFR-low) en el análisis multivariante ajustado por número de línea de tratamiento y hormonosensibilidad.

Los resultados de la cohorte 2 (segundo trabajo) validan los resultados observados en el primer trabajo, de manera que la dinámica precoz del ctDNA aporta un valor pronóstico más allá de las variables clínicas pronósticas conocidas en dos cohortes independientes de pacientes.

Un aspecto importante que cabe destacar es el alto porcentaje de pacientes, 96% (43 de 45) y 94% (113 de 120) en el primer y segundo trabajos, respectivamente, que presentaron ctDNA detectable en alguno de los dos momentos temporales. Estos datos superan incluso lo reportado por el estudio de Davis et al. en 2020 que incluyó 255 pacientes con cáncer de mama metastásico donde se analizó la presencia de ctDNA con el panel de Guardant360® de 73 genes y que detectó ctDNA en el 89% de las pacientes y coinciden con los datos del estudio plasmaMATCH publicados recientemente donde también se utilizó el panel de Guardant360® y se detectó ctDNA en el 93% de los casos (78,79). De igual manera, la detección resultó positiva en el 86% de las pacientes en el estudio de Bettgowda que incluyó 14 pacientes con cáncer de mama metastásico y donde también se analizó la presencia de ctDNA medida por secuenciación dirigida con un panel de 100 genes (71).

La capacidad de detección de ctDNA es mucho menor en estudios donde se utiliza PCR digital para analizar un número limitado de genes, como muestra el estudio de O'Leary que analizaba solo mutaciones en 4 “*hot spot*” de *PIK3CA* y en 7 de *ESR1*, y donde se detectó alguna mutación en *PIK3CA* en el 22% de las pacientes y en *ESR1*, en el 25.6%. El estudio de Darrigues en pacientes con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo metastásico tratadas con palbociclib y fulvestrant también presentó dificultades en la capacidad de analizar la dinámica de ctDNA en todas las pacientes, ya que solo se pudo analizar la presencia de ctDNA en el 41% de estas. Como se comentó en la introducción, en este estudio se utilizó PCR digital en las pacientes que presentaban alguna mutación en alguno de los 15 genes analizados previamente en tejido. Solo se disponía de tejido tumoral en 53 de las 61 pacientes y solo en 22 de estas 53 se encontró alguna alteración para elaborar la PCR personalizada. En 13 de las 31 pacientes en las que no se encontró ninguna alteración en tejido se realizó secuenciación en plasma analizando 39 genes, lo que detectó alguna alteración solo en 3 pacientes más (23%), una proporción de positividad sorprendentemente baja en comparación con los estudios previamente mencionados (142).

Como se observa, la estrategia de detección de solo un número limitado de mutaciones conocidas *a priori* en genes concretos mediante PCR digital limita de forma considerable la cantidad de pacientes en los que se detecta positividad de ctDNA y, por tanto, en los que es posible analizar su dinámica, dificultando la futura aplicación en la práctica clínica del estudio del ctDNA en la monitorización de los pacientes.

Un problema añadido que presentan las estrategias que utilizan PCR diseñadas según las alteraciones detectadas en tejido es que estas técnicas no tienen en cuenta la heterogeneidad tumoral. Esta heterogeneidad no queda recogida si se analiza una única lesión de tejido metastásico en un solo momento temporal, como muestra el estudio plasmaMATCH que detectó una correlación entre la PCR de tejido y la PCR en sangre del 98% cuando las muestras eran contemporáneas pero que bajaba al 85% en muestras de momentos temporales discordantes (100).

En conjunto, nuestra estrategia de secuenciación dirigida a los principales genes alterados en cáncer de mama permite detectar la presencia de alteraciones en casi todas las pacientes metastásicas sin necesidad de conocer *a priori* las mutaciones existentes en el tumor con lo que es posible realizar una monitorización de la gran mayoría de los pacientes. Además, la secuenciación con panel evita la necesidad de elaborar PCR dirigidas que no contemplan las mutaciones adquiridas en las diferentes lesiones metastásicas, sobre todo si están elaboradas con el tumor primario.

Por otro lado, es importante mencionar que, aunque en los dos trabajos la tasa de detección de ctDNA es alta, en ambos se detecta un grupo de pacientes en las que todas las mutaciones se presentan con una VAF inferior a 0.4% en los dos momentos temporales y que denominamos grupo “ctDNA-low”. Este grupo representa al 31% de las pacientes (14/45) en el primer trabajo y al 25% (17/68) en el segundo, considerando en este último solo las pacientes con plasma en C1D1 y C2D1 y no C1D15.

El punto de corte de 0.4% se ha elegido teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica (límite de detección de ~0.5-0.3% de VAF) y además permite mitigar parcialmente el problema que supone la hematopoyesis clonal (339).

Las mutaciones derivadas de la hematopoyesis clonal que se han descrito en la literatura con mayor frecuencia son las mismas mutaciones que se observan en las neoplasias mieloides hematológicas, como en la leucemia mieloide aguda o en los síndromes mielodisplásicos, e incluyen genes modificadores epigenéticos (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*), factores de *splicing* (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) y genes de vías de respuesta al daño del DNA (*TP53*, *CHEK2* y *PPM1D*). Los genes mutados con más frecuencia (*DNMT3A*, *ASXL1* y *TET2*) a menudo se detectan con VAF de 10-20% pero no están cubiertos por la mayoría de los paneles de secuenciación plasmática disponibles clínicamente, como el panel Guardant360®. Sin embargo, otros genes como *JAK2*, *TP53*, *GNAS*, *IDH2* y *KRAS* sí presentan importancia potencial para la biología del cáncer y son analizados en los diferentes paneles de secuenciación, aunque a menudo estas mutaciones son detectadas con una VAF mucho más baja (0.1–0.5%), por lo que la limitación del punto de corte de VAF en 0.4% ayuda a mitigar este problema (112,116,340,341).

La forma más clara de solventar el inconveniente que suponen las mutaciones derivadas de la hematopoyesis clonal consistiría en realizar un genotipado emparejado de cfDNA y de DNA de leucocitos aislados de la misma extracción de sangre pero esto aumentaría la complejidad y el costo del análisis de cfDNA y necesitaría de la preservación de los leucocitos, que no se conservan siempre de forma rutinaria al centrifugar el plasma (116).

Por otro lado, es importante señalar que no es posible analizar la dinámica de ctDNA en el grupo ctDNA-low (aquellas pacientes con VAF inferiores a 0.4% en los dos momentos temporales) lo cual podría suponer un problema para el objetivo del trabajo. Sin embargo, observamos que el hecho de presentar una VAF tan baja en los dos momentos temporales es *per se* un factor de buen pronóstico, asociado a mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global con el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 en comparación con los grupos de mVAFR medio y alto. Este grupo definido por la escasa detección de ctDNA identifica a pacientes con baja siembra de material genético del

tumor al torrente circulatorio lo que clásicamente se ha asociado a menor carga de enfermedad pero también a menor agresividad biológica (63,75–77,342,343). De hecho, una observación interesante es que en la cohorte conjunta de pacientes no se observan diferencias significativas en cuanto a la afectación visceral o el número de localizaciones metastásicas entre los grupos de mVAFR, lo que apoya el valor pronóstico de la dinámica del ctDNA independientemente de la carga tumoral.

Se conocen muchas variables que pueden influir en la diseminación de ctDNA además del número de sitios metastásicos o la presencia de enfermedad visceral, como la proliferación, la vascularización, la necrosis tumoral y la propia ubicación metastásica (63,75–77). Por lo tanto, probablemente la presencia de ctDNA refleje una combinación de estas variables que va más allá de la carga de enfermedad.

Otro aspecto relevante, y objetivo secundario de este trabajo de tesis doctoral, es que la dinámica de ctDNA analizada a los 15 días del inicio del tratamiento no se asoció a la supervivencia libre de progresión ni a la supervivencia global en la cohorte 2. Nuestros resultados coinciden con el estudio de Darrigues en pacientes tratadas con inhibidores de CDK4/6 y también con el estudio BEECH, en el que el día 28 se identificó como el mejor momento para determinar el cambio en el ctDNA en pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas con paclitaxel e ipatasertib (141).

Por otra parte, en el primer trabajo se estudió el valor pronóstico del marcador tumoral CA 15-3 que ya mostró en el trabajo de Dawson ser menos sensible y específico que la dinámica del ctDNA para monitorizar la enfermedad en pacientes con cáncer de mama metastásico (107). En nuestro estudio no se observó asociación entre los niveles basales de CA 15-3, los niveles en el C2D1, ni entre el ratio y la supervivencia libre de progresión, lo que apoya los resultados previamente observados por Dawson (107).

Otro aspecto que resulta interesante, y también objetivo secundario de esta tesis doctoral, es la relación observada entre la dinámica de ctDNA a las 4 semanas del inicio del tratamiento con el subtipo intrínseco determinado por PAM50. La asociación entre subtipo y log_mVAFR resultó estadísticamente significativa en la cohorte combinada a pesar de que solo en 54 pacientes se disponía de la información relativa al subtipo. Aunque solo 14 pacientes presentaban un tumor no-luminal, ninguno de ellos fue clasificado en el grupo de mVAFR_log-low, en comparación con el 53% de los luminales A y el 32% de los luminales B.

Estos datos encajan completamente con lo reportado hasta la fecha. Dentro de la enfermedad RH positivo y HER2 negativo los subtipos no luminales presentan un peor pronóstico, predicen

resistencia endocrina y, además, como se mencionó en la introducción, el subtipo basal-like parece no beneficiarse ni de palbociclib ni de ribociclib, mientras que el subtipo HER2-enriched podría obtener un beneficio de ribociclib pero no de palbociclib (286,303). El pequeño número de pacientes de nuestro estudio no permite observar si existen diferencias respecto al inhibidor utilizado en las pacientes con subtipo HER2-enriched. Sin embargo, sí observamos un peor pronóstico de manera global en las pacientes no lumbinales y una peor respuesta en términos de dinámica de ctDNA.

Finalmente, como último objetivo secundario del primer y segundo trabajos, se describen las dos cohortes en relación con las mutaciones y CNV detectados. En el primer trabajo encontramos mutaciones en 42 de los 74 genes analizados en C1D1. Los 4 genes más frecuentemente mutados fueron *PIK3CA*, *ESR1*, *TP53* y *ATM*. Observamos CNV en 17 genes diferentes en 15 pacientes (33% de las pacientes). Los genes que presentaron mayor frecuencia fueron por orden, *CCND1*, *MYC*, *FGFR1*, *PIK3CA* y *RAF1*. En el segundo trabajo encontramos mutaciones en 63 genes, siendo los 4 más frecuentes *TP53*, *PIK3CA*, *ESR1* y *ARID1A*. Se detectaron CNV en 29 genes diferentes en 37 pacientes (31% de las pacientes), destacando también en frecuencia las amplificaciones en *CCND1*, *FGFR1*, *MYC*, *GNAS*, *BRAF* y *EGFR*. Ambos trabajos presentan resultados similares, que coinciden con lo reportado previamente en la literatura (39,42,79).

El primer y segundo trabajos presentan ciertas limitaciones e invitan a las siguientes reflexiones:

- En primer lugar, hemos observado que la dinámica precoz del ctDNA evaluada mediante el mVAFR presenta valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo, HER2 negativo tratadas con inhibidores de CDK4/6, sin embargo, desconocemos el valor predictivo de esta herramienta. Para identificar un biomarcador predictivo generalmente es necesaria la realización de una comparación del tratamiento con un control en pacientes con y sin el biomarcador (344). Nuestros dos trabajos son observacionales e incluyen un solo brazo de tratamiento, por lo que no es posible extraer esta información. Serán necesarios, por tanto, estudios prospectivos diseñados específicamente para evaluar el valor predictivo, y no solo pronóstico, de esta herramienta en el escenario de pacientes tratadas con inhibidores de CDK4/6.
- En segundo lugar, es importante señalar que actualmente se desconoce la utilidad clínica del cambio precoz de tratamiento frente al cambio guiado por las pruebas de imagen convencionales, por lo que serán también necesarios estudios prospectivos que analicen la capacidad de esta estrategia de mejorar el pronóstico de las pacientes.

Los hallazgos obtenidos en estos dos trabajos y las cuestiones que dejan abiertas han motivado precisamente la concepción de una propuesta de ensayo clínico por parte del grupo SOLTI, el estudio VOLTARIE, que tratará de dar respuesta a estos interrogantes. El ensayo VOLTARIE es un estudio de prueba de concepto, prospectivo, multicéntrico, abierto, fase II, en pacientes con cáncer de mama RH positivo, HER2 negativo metastásico, que pueden haber recibido hasta una línea de hormonoterapia y dos de quimioterapia previa. Los pacientes iniciarán tratamiento con un inhibidor de CDK4/6 y terapia endocrina y se analizará la dinámica precoz de ctDNA a las 4 semanas del comienzo. En este estudio se empleará por primera vez la variable mVAFR_log para decidir qué pacientes continúan con el tratamiento (aquellos respondedores con mVAFR_log inferior a 0) y qué pacientes (aquellos no respondedores con mVAFR_log igual o superior a 0) serán aleatorizados a continuar con el mismo esquema terapéutico o cambiar a un tratamiento con capecitabina y nivolumab (**figura 31**). Los resultados de este estudio serán fundamentales para valorar la capacidad predictiva y la utilidad clínica real de la determinación precoz de la dinámica de ctDNA en pacientes con cáncer de mama tratadas con inhibidores de CDK4/6.

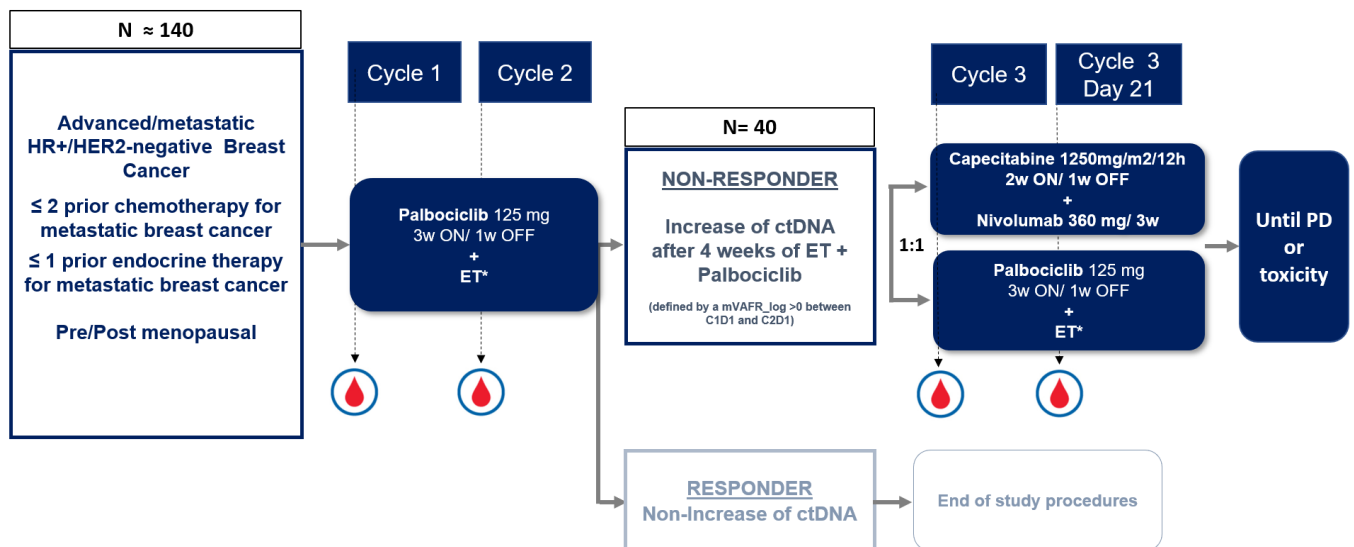


Figura 31. Esquema de la propuesta del ensayo clínico VOLTARIE.

- Tercero, actualmente no existe una metodología estándar para valorar la dinámica precoz del ctDNA y somos conscientes de que nuestra propuesta puede ser mejorada y perfeccionada en futuros estudios.
- Cuarto, desconocemos si los resultados obtenidos con la metodología expuesta en estos dos trabajos son aplicables a otras terapias y a otros tipos tumorales. De nuevo serán necesarios más estudios que analicen el valor del mVAFR en otros escenarios de manera que su utilización pueda ser generalizable a otras situaciones clínicas.

- Quinto, se ha descrito extensamente la limitación existente en relación con la hematopoyesis clonal. Nuestro punto de corte de VAF en 0.4% solventa parcialmente este problema, pero, además, cabe destacar que nuestro método promedia todas las variantes presentes, lo que diluye el impacto de cualquier variante atípica de hematopoyesis clonal que pueda haber superado el umbral de VAF. En tales casos, la variante de hematopoyesis clonal no se vería afectada por la terapia y permanecería en una VAF estática y, como tal, no contribuiría a ningún cambio en la fracción de esa mutación, aunque sí podría diluir en cierta manera los cambios totales observados en el mVAFR, sobre todo en los casos donde existan pocas mutaciones detectadas.
- Sexto, aunque se observa una asociación entre la dinámica precoz del ctDNA y el subtipo intrínseco, menos de la mitad de los pacientes en los dos trabajos dispone de muestra de tejido, ya que todas las biopsias se realizaron por práctica clínica asistencial y en ningún caso de modo expreso con la finalidad de participar en los estudios. Por otro lado, sabemos que el subtipo intrínseco es dinámico y que puede modificarse a lo largo de la evolución de la enfermedad y en función de los tratamientos recibidos, por lo que es importante disponer de una muestra de tejido metastásico lo más cercana posible al momento del estudio para analizar de forma correcta la asociación entre las variables (54). En nuestros trabajos se recoge información de tejido lo más próxima posible al inicio del estudio, pero no siempre se dispone de muestra reciente y en la mitad de los casos las biopsias pertenecen incluso al tumor primario. Serán necesarios estudios más grandes que tengan en cuenta estas consideraciones para corroborar las observaciones descritas en nuestros dos trabajos.
- Finalmente, una cuestión importante que cabría abordar, si se demostrara la utilidad clínica de la dinámica de ctDNA en el escenario del cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo tratado con inhibidores de CDK4/6, es el coste que supondría su aplicación en la práctica clínica. Es fundamental tener en cuenta lo que implicaría la realización de dos test Guardant360® comerciales por cada paciente que iniciara un tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y si estos pudieran ser asumibles por el sistema nacional de salud. Aunque la realización del test podría suponer un ahorro en pruebas de imagen y en tratamientos en aproximadamente un 20-25% de las pacientes que se estima que no presentarán beneficio, y que detendrían el tratamiento de manera temprana sin esperar a la reevaluación por imagen a los tres meses, la aplicación del test de manera generalizada a todas las candidatas con los precios actuales superaría este ahorro. Serían necesarios estudios de coste-efectividad y probablemente un abaratamiento de los costes para que esta propuesta pudiera convertirse en una futura realidad en nuestra práctica asistencial.

Tercer trabajo: *Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer*

Los resultados del tercer trabajo confirman la segunda hipótesis de esta tesis doctoral, ya que existe un porcentaje considerable de pacientes, alrededor del 20%, con mutaciones en *PIK3CA* que no sería detectado por el test theascreen® por lo que no podría beneficiarse del tratamiento con alpelisib. Estos resultados son observados tanto *in silico* como en las dos cohortes de pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo tratadas por práctica clínica habitual y coinciden con los datos de un estudio de práctica real posterior al nuestro presentado por Rugo et al. en ASCO de 2021 (264).

Los resultados de este tercer trabajo de tesis doctoral tienen consideraciones importantes para el tratamiento de las pacientes. Dada la posibilidad de recibir una terapia dirigida, oral, que retrasa el empleo de quimioterapia, que es superior al tratamiento endocrino en monoterapia y que además ha mostrado beneficio en un estudio de práctica real frente a otras terapias no dirigidas, es fundamental la correcta selección de las pacientes para ofrecer esta oportunidad terapéutica a todas las candidatas (264). Por ello es crucial adoptar la mejor metodología para evaluar todas las posibles mutaciones. El hecho de que el panel theascreen® no detecte aproximadamente el 20% de las pacientes con mutaciones de *PIK3CA* podría ser una razón para elegir paneles que analicen *PIK3CA* de forma más completa.

Por otro lado, en nuestro trabajo observamos también una alta frecuencia de mutaciones múltiples (dobles, triples y cuádruples) en *PIK3CA*, del 12% en el análisis *in silico*, del 6% en la primera serie de pacientes y que alcanza hasta el 30% en la segunda serie. Este aspecto resulta interesante ya que, como se describió en la introducción, las dobles mutaciones en *PIK3CA* parecen conferir mayor sensibilidad a los inhibidores de PI3K tanto en modelos preclínicos, como en xenografts y en estudios clínicos (314,345). La mayor frecuencia de estas dobles mutaciones en ctDNA en comparación con el tejido archivado (19 vs 12%) que se observó en el estudio SANDPIPER apoya que pudiera tratarse de mutaciones adquiridas a lo largo de la evolución de la enfermedad (314). Este punto pone en relevancia el valor de la repetición de las biopsias en el tiempo, pero, sobre todo, la importancia de la biopsia líquida que presenta la capacidad de recoger la potencial heterogeneidad tumoral espacial y temporal, así como de evitar la incomodidad de repetir las invasivas biopsias de tejido en el tiempo. Si bien es cierto que la biopsia líquida puede presentar un problema de sensibilidad en este escenario si el contenido de ctDNA es bajo, de manera que se imposibilite la detección de mutaciones en algunas pacientes. Por ello, ante un resultado negativo en el análisis de ctDNA, las pacientes deberán

repetir la determinación en sangre o, si es posible, realizar una biopsia de tejido para excluir resultados falsos negativos (223).

Aunque el papel de las dobles mutaciones debe ser estudiado de forma prospectiva en estudios amplios, de confirmarse la utilidad de las dobles mutaciones como biomarcador predictivo de beneficio, su determinación podría permitir ayudar en la selección de pacientes especialmente sensibles a la inhibición de PI3K. Sin embargo, nuestros análisis muestran que la gran mayoría de estas múltiples mutaciones no serían detectadas por therascreen®. Solo el 5% de todas las mutaciones múltiples en el estudio *in silico* y el 23% en la segunda serie de pacientes sería detectado con este test. Esta baja frecuencia coincide los datos reportados por estudios donde se analizan solo unos nucleótidos o unos pocos exones a lo largo del gen (315,316).

Cabe señalar que la proporción de mutaciones detectadas en el estudio *in silico* con tejido es similar a la observada en las dos cohortes de pacientes donde se analiza el plasma, lo que apoya el empleo de la biopsia líquida como herramienta muy útil para la detección de estas mutaciones en la práctica clínica.

Nuestros resultados plantean también preguntas críticas que suponen limitaciones a este trabajo:

- En primer lugar, actualmente desconocemos si las pacientes con mutaciones de *PIK3CA* que no forman parte del panel therascreen® se beneficiarían de alpelisib. Este aspecto es importante si se adopta la estrategia de generalizar el empleo de alpelisib para todas las pacientes en los que se detecta alguna mutación en *PIK3CA*. Aunque, si bien estas mutaciones no han sido incluidas en el SOLAR-1, existen datos que apoyan su probable valor como biomarcadores predictivos de beneficio a la inhibición de PI3K, como se describió en la introducción. Por ejemplo, la mutación N345K que representó el 5.5% de todas las mutaciones de *PIK3CA* analizadas *in silico*, y que no es capturada por el ensayo therascreen®, está considerada como patogénica y oncogénica, confiere una ganancia de función y ha demostrado aumentar la sensibilidad a los inhibidores de PI3K en modelos preclínicos (262,263). Existe una situación similar para la mutación E726K, la sexta mutación de *PIK3CA* en frecuencia en nuestro análisis *in silico*, que aunque no es informada como claramente oncogénica por OncoKB y supone un aumento débil de la actividad de la proteína como mutación única, como doble mutación (junto con E545K o H1047R) produce una activación sinérgica de la misma (314). Por otro lado, algunas mutaciones menos frecuentes, como la G1049R, han demostrado una fuerte actividad, similar a la variante “hot spot” E542K, en plataformas de evaluación de mutaciones (263). El estudio de vida real de Rugo et al. también pone el punto de mira en este aspecto y no descarta la existencia de beneficio en las pacientes con mutaciones no detectadas por el panel de therascreen®

(264). Serán necesarias, por lo tanto, una mejor caracterización funcional de estas mutaciones no “hot spot” para valorar su papel como biomarcadores, además de la recopilación de mayor evidencia clínica que prediga el beneficio de los inhibidores de PI3K en pacientes con este tipo de mutaciones.

- En segundo lugar, tanto en el análisis *in silico* como en las dos cohortes de pacientes, asumimos que los resultados proporcionados por las estrategias basadas en secuenciación son el “gold standard” en el diagnóstico de las mutaciones de *PIK3CA* y, sin embargo, existen diferencias en la sensibilidad y la especificidad de los diversos ensayos de secuenciación que afectan las tasas de concordancia entre ellos, por lo que nuestra asunción no tiene por qué ser cierta en la totalidad de los casos (79,91,346). Por otro lado, aceptando en este caso que el “gold standard” para el diagnóstico lo constituyen las estrategias de secuenciación, asumimos también que el test therascreen® identificaría todos los tumores sin mutación de *PIK3CA* por secuenciación como no mutados y todos los tumores con mutación de *PIK3CA* como mutados si el tipo de mutación detectada está recogida en el panel, lo cual tampoco tiene por qué ser así en todos los casos, ya que, como muestran los datos del SOLAR-1, el porcentaje de concordancia global reportado entre el test de therascreen® y los estudios de secuenciación fue del 94.7% (347).

- Tercero, el conjunto de datos analizados *in silico* deriva principalmente de muestras de tumores primarios y, sin embargo, se ha descrito la adquisición de nuevas mutaciones de *PIK3CA* en pacientes metastásicos hasta en el 8% de los casos (229,348). Desconocemos si el patrón de mutaciones en la enfermedad metastásica es diferente al que encontramos en la enfermedad primaria, aunque la evidencia existente parece apoyar un patrón similar en ambos contextos, como se observa, por ejemplo, en el estudio de O’Leary con muestras de pacientes tras tratamiento con fulvestrant y palbociclib, donde solo parece haber un enriquecimiento en E542K, manteniéndose similar la frecuencia del resto de mutaciones (229,255). Nuestras dos series de pacientes con enfermedad metastásica en los que se ha analizado el ctDNA muestran un patrón de mutaciones similar al de la cohorte *in silico*, si bien no idéntico, con discreta mayor frecuencia de mutaciones de E454K y menor de H1047R, aunque el pequeño número de pacientes no permite extraer conclusiones al respecto. Son necesarios estudios más grandes donde se comparen los escenarios primario y metastásico y que, idealmente, esta comparación se realice en la misma población de pacientes con muestras pareadas para poder establecer claramente si existen determinadas mutaciones que aparecen más habitualmente durante la evolución de la enfermedad o tras el empleo de tratamientos concretos.

- Finalmente, cabe mencionar que los análisis en las dos series de pacientes se han realizado a partir de ctDNA y no de tejido, lo cual puede limitar la capacidad de detección de mutaciones en

algunos pacientes, como muestra el estudio SANDPIPER donde en un 14% de las pacientes con mutación en tejido no se detectó mutación en plasma (349). En nuestro trabajo, un 4% (2 de 45) y un 6% (7 de 121) de las pacientes en la primera y segunda serie, respectivamente, no presentó ninguna positividad de ctDNA, por lo que no podemos descartar la existencia de mutaciones en este porcentaje de pacientes. Por ello, aunque la proporción total de mutaciones encontrada en ambas series encaja con los datos reportados en el estudio *in silico* y con lo publicado en la literatura, no podemos excluir que la proporción real pudiera ser incluso superior a la observada.

CONCLUSIONES

Dinámica de ctDNA como biomarcador predictivo de beneficio a inhibidores de CDK4/6 y terapia

endocrina: Primer y segundo trabajos.

- El panel de secuenciación dirigida de 74 genes permite detectar la presencia de ctDNA en casi todas las pacientes con cáncer de mama metastásico RH positivo y HER2 negativo en las dos cohortes independientes.
- La dinámica precoz de ctDNA, a las 4 semanas tras el inicio de tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y terapia endocrina, se asocia a supervivencia libre de progresión.
- El mVAFR o mVAFR_log es el mejor método para analizar la dinámica precoz de ctDNA en nuestro trabajo.
- La mVAF basal, la mVAF a las 4 semanas del inicio del tratamiento y la diferencia o delta entre ambas mVAF, no se asocian a supervivencia libre de progresión.
- El mVAFR y mVAFR_log se asocian a supervivencia global en las dos cohortes de pacientes.
- El grupo de pacientes que denominamos “ctDNA-low” identifica a pacientes con baja siembra de material genético y que presenta buen pronóstico de forma independiente de otras variables clínicas.
- La dinámica precoz de ctDNA, a las 2 semanas tras el inicio de tratamiento, analizada mediante el mVAFR y mVAFR_log, no se asocia a supervivencia libre de progresión ni supervivencia global.
- Los niveles de CA 15-3 basales y sus cambios no se asocian a supervivencia libre de progresión.
- La dinámica de ctDNA tras 4 semanas del inicio del tratamiento se asocia con el subtipo intrínseco determinado por PAM50.
- Los genes más frecuentemente mutados en estas dos cohortes son *PIK3CA*, *ESR1* y *TP53*. Los CNV más frecuentes se observan en *CCND1*, *MYC* y *FGFR1*, lo que coincide con lo reportado previamente en la literatura.

- En conjunto, la dinámica del ctDNA a las 4 semanas del inicio del tratamiento, analizada con la metodología propuesta, podría ser un biomarcador precoz de sensibilidad y resistencia a inhibidores de CDK4/6. La capacidad predictiva y utilidad clínica de este biomarcador requerirán validaciones prospectivas.

Detección de mutaciones de *PIK3CA* como biomarcador predictivo de beneficio a alpelisib:

Tercer trabajo

- El panel theascreen® aprobado por la FDA no es capaz de detectar aproximadamente un 20% de pacientes con cáncer de mama RH positivo y HER2 negativo con mutación de *PIK3CA*, por lo que estas pacientes no serán candidatas para recibir alpelisib.
- Es importante la caracterización funcional de las mutaciones de *PIK3CA* no “hot spot”, así como la recogida de evidencia clínica prospectiva para confirmar su capacidad predictiva como biomarcadores de beneficio a alpelisib. Si esto se confirma, serán necesarias estrategias, como la secuenciación dirigida, que analicen de forma más completa *PIK3CA*.
- La biopsia líquida con secuenciación dirigida permite detectar una proporción y distribución de mutaciones en *PIK3CA* similar a la descrita en estudios en tejido.
- La gran mayoría de mutaciones múltiples en *PIK3CA* no son detectadas por el panel theascreen®.
- Las mutaciones múltiples en *PIK3CA* podrían ser un biomarcador predictivo de beneficio a alpelisib. Si esto se confirma mediante validación prospectiva serán necesarias nuevamente estrategias de estudio más completo de *PIK3CA*.
- Las mutaciones múltiples parecen ser más frecuentes en tumores metastásicos que en primarios por lo que para su detección será importante el estudio a lo largo de la evolución de la enfermedad.

Conclusiones generales

En los últimos años se ha demostrado el beneficio de los inhibidores de CDK4/6 y de los inhibidores de PI3K en el tratamiento de las pacientes con cáncer mama metastásico RH positivo y HER2 negativo. Son imprescindibles biomarcadores que permitan identificar con precisión a las candidatas a estas terapias. La dinámica precoz de ctDNA a las 4 semanas del inicio del tratamiento mediante secuenciación con un panel de 74 genes se postula en esta tesis doctoral como posible un biomarcador de beneficio a inhibidores de CDK4/6. Por su parte, las mutaciones en *PIK3CA* constituyen unos de los pocos biomarcadores aprobados en cáncer de mama y permiten seleccionar a las pacientes candidatas a alpelisib, sin embargo, uno de los test utilizados actualmente para su determinación no es capaz de detectar a un quinto a de estas pacientes. Las estrategias de secuenciación permitirían descubrir estas mutaciones no “*hot spot*” ofreciendo una importante opción terapéutica a un gran número de pacientes. La biopsia líquida se presenta en ambos escenarios como una herramienta no invasiva que ofrece la oportunidad de estudiar la dinámica temprana del ctDNA así como de diagnosticar la presencia de mutaciones en *PIK3CA* en cualquier momento durante la evolución de la enfermedad.

ANEXOS

1. Material suplementario asociado al primer trabajo
2. Material no publicado asociado al primer trabajo
3. Material suplementario asociado al tercer trabajo
4. Material no publicado asociado al tercer trabajo

1. Material suplementario asociado al primer trabajo

Supplementary material

Logarithm transformation of mVAFR_log

The mVAFR_log was defined as the mean of the logarithm of all VAF ratios (VAF_{post}/VAF_{pre}) for all mutations in each time point:

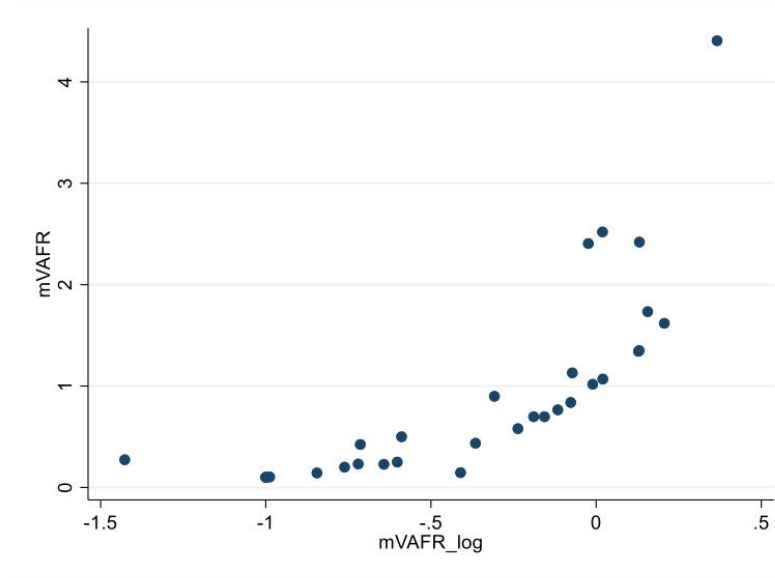
$$(1) \text{ mVAFR_log} = m(\log(\frac{VAF_{post}}{VAF_{pre}}))$$

We divided the population with ctDNA-positive in tertiles according to the mVAFR_log.

The group of patients with ctDNA low was consider again as an independent group. We consider then 4 groups, mVAFR_log-low (first tertile), mVAFR_log-medium (second tertile) and mVAFR_log-high (third tertile). Both mVAFR_log as a continuous variable (HR=2.85, CI 95% 1.00-8.20, p-value=0.05) and m VAFR_log groups (HR=3.99 for mVARF_log-high group compared to mVARF_log-low, CI 95% 1.24- 12.81, p-value=0.02) were associated to PFS.

Spearman correlation between mVAFR and mVAFR_log was 0.94 (figure 1).

Figure 1. Spearman correlation between mVAFR and mVAFR_log



The Kappa concordance score between mVAFR-based groups and mVAFR_log-based groups was 0.88.

found at baseline



Table 1: Univariate Cox regression analysis of progression free survival

	HR	95% CI	p-value
mVAF baseline	1.00	0.93-1.08	0.94
mVAF C2D1	1.01	0.95-1.07	0.77
mVAF_absolute change	1.03	0.90-1.20	0.62
mVAFR	1.57	1.10-2.23	0.012

Table 2. Multivariable Cox regression analysis of progression free survival considering mVAFR as continuous variable

	HR	95% CI	p-value
mVAFR	2.07	1.21-3.54	0.08
Visceral disease	0.28	0.04-1.85	0.19
≥3 metastatic locations	0.53	0.07-3.68	0.52
Hormone-resistance	3.57	0.84-15.18	0.09
Line of treatment			
Second	1.26	0.31-4.69	0.79
Third or more	6.86	1.24-38.02	0.03
Endocrine therapy			
Fulvestrant ¹	1.23	0.36-4.26	0.74
Tamoxifen ¹	2.54	0.25-25.45	0.43

¹ HR with respect to aromatase inhibitor

Table 3. Multivariable Cox regression analysis of progression free survival considering mVAFR by groups

	HR	95% CI	p-value
mVAFR groups			
mVAFR-med ¹	2.75	0.85-8.89	0.09
mVAFR-high ¹	3.58	1.26-10.24	0.02
Visceral disease	0.49	0.15-1.60	0.24
≥3 metastatic locations	1.15	0.36-3.71	0.82
Hormone-resistance	3.22	1.10-8.81	0.03
Line of treatment			
Second	1.26	0.38-2.85	0.64
Third or more	2.07	0.53-8.10	0.30
Endocrine therapy			
Fulvestrant ²	1.04	0.38-2.85	0.95
Tamoxifen ²	0.82	0.08-7.99	0.86

¹ HR with respect to low-ctDNA and mVAFR low group (reference category).

² HR with respect to aromatase inhibitor

Figure 3. SNV and indels found at baseline

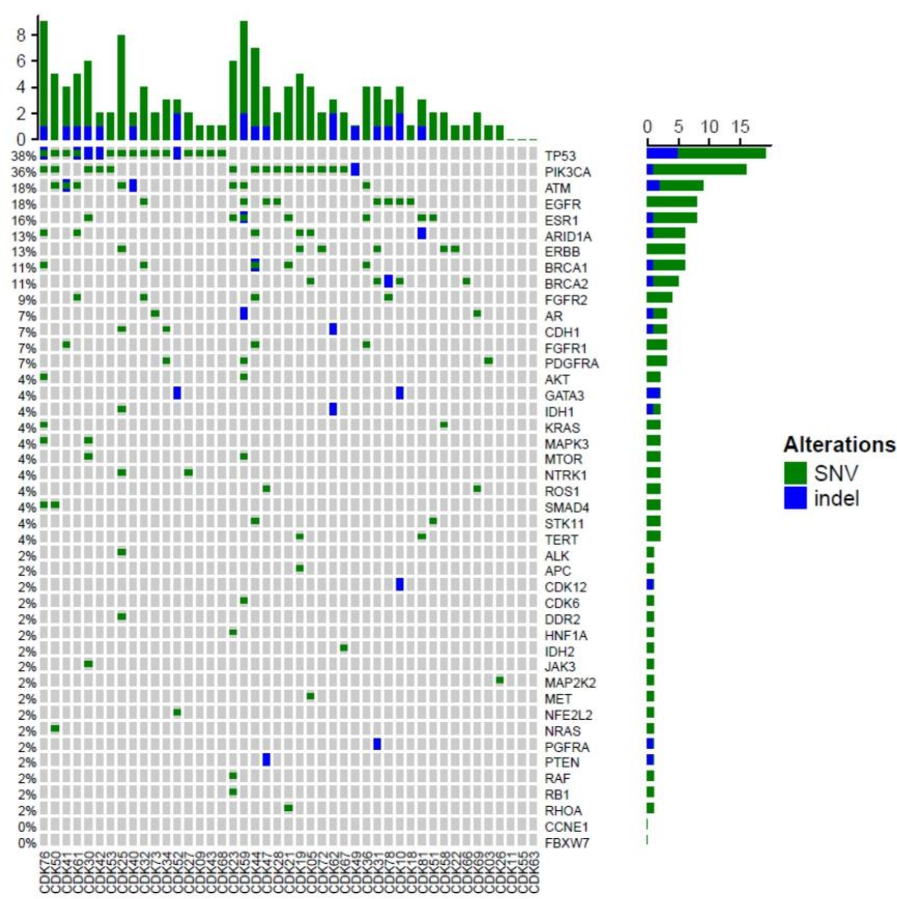
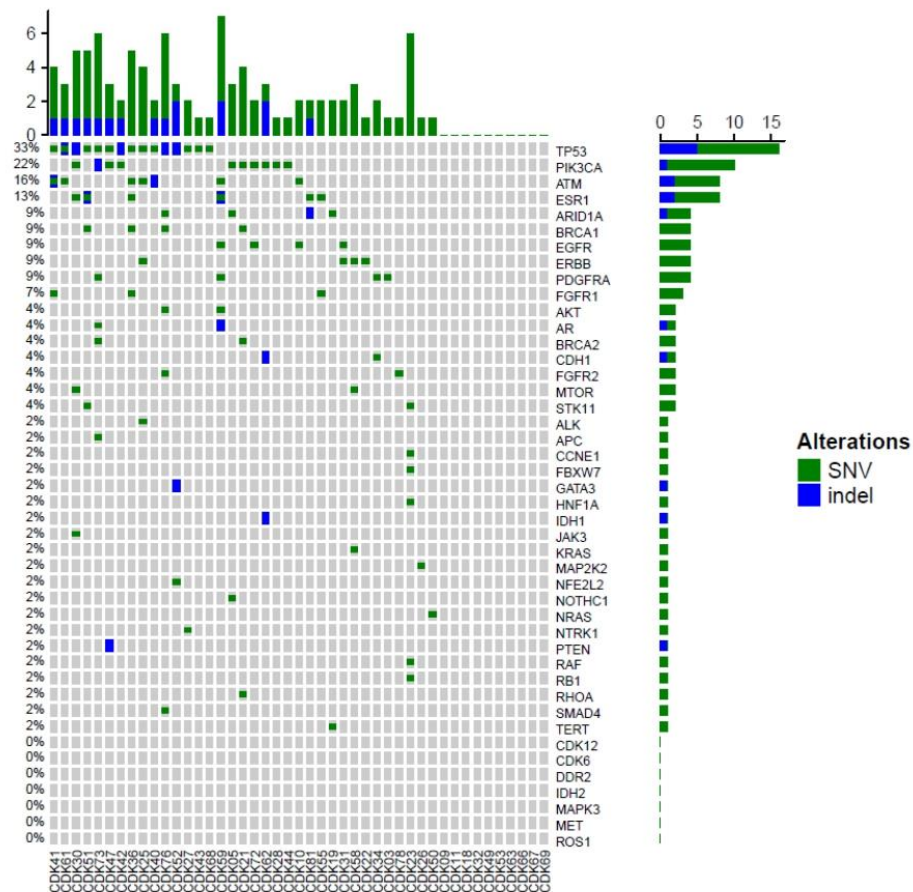


Figure 4. SNV and indels found at C2D1



ctDNA and clinical dataset. The ctDNA and clinical data analyzed during this study are described in two separate tabs in the Excel spreadsheet 'ctDNA and clinical dataset.xlsx', which is openly available and shared as part of the figshare data record in the following data record: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13365521>²⁰.

Table S4. List of all SNV and indels detected.

Gen	Variant_Type	Indel_Type	Chromosome	Position	Exon	Mut_aa	Mut_nt	Mut_cdna	Transcript	Splice_effect	COSMIC	dbSNP	
AKT1	SNV		14	105246551	4	E17K	C>T	c.49G>A	NM_001014432.1	splice_region_variant	COSM3765	rs121439592	
AKT1	SNV		14	105246427	4	A59V	G>A	c.173C>T	NM_001014432.1	splice_region_variant			
ALK	SNV		2	29446350	20	L1073L	G>A	c.3217C>T	NM_0043504.4				
APC	SNV		5	112157601	11	P441T	C>A	c.1321C>A	NM_000338.5				
APC	SNV		5	112090682	2	N32S	A>G	c.95A>G	NM_000338.5				
AR	Indel	Deletion	X	66943649	8	K911fs	GGAAAGTCAAGCCCTATTCTTCCACCAAGT>G c.2793_11delGTCAAGCCCATCTATTCCACCAAGTGA						rs593108537
AR	SNV		X	66941753	6	Q799H	A>T	c.239T>A	NM_000444.3				
AR	SNV		X	66961817	1	A400E	C>A	c.1199C>A	NM_000444.3				
ARID1A	SNV		1	271016354	20	R1989G	C>G	c.5965C>G	NM_006015.4				
ARID1A	Indel	Insertion	1	27105813	20	D1810fs	G>GT	c.5427dupT	NM_006015.4				
ARID1A	SNV		1	27101391	18	S158F	C>T	c.4673C>T	NM_006015.4				
ARID1A	SNV		1	27100927	18	O1403Q	G>A	c.4209G>A	NM_006015.4				
ARID1A	SNV		1	27097737	12	R1109Q	G>A	c.3326G>A	NM_006015.4				
ARID1A	SNV		1	27057901	3	Q37*	C>T	c.1698C>T	NM_006015.4				
ARID1A	SNV		1	27024008	1	Q37*	C>T	c.1114C>T	NM_006015.4				
ARID1A	Indel	Insertion	1	27023450	1	G19dup	A>AGGG	c.567_569dupCGG	NM_006015.4			rs776030168	
ATM	Indel	Deletion	11	108236099	63	R3012fs	G>G	c.9036delA	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108236087	63	R3008H	G>A	c.9023G>A	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108235817	62	L2953L	A>G	c.8859A>G	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108224583	60	T2921M	C>T	c.8762C>T	NM_000051.3				
ATM	Indel	Deletion	11	108216560	58	K2838fs	G>G	c.8514delA	NM_000051.3			rs790881329	
ATM	SNV		11	108206590	56	Q2724E	C>G	c.8170C>G	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108204696	54	S4	G>G	c.8101G>A	NM_000051.3	splice_donor_variant	COSM5341390		
ATM	SNV		11	108204652	54	L2656H	T>A	c.7967T>A	NM_000051.3			rs587781894	
ATM	SNV		11	108202285	51	L1088Q	G>A	c.7629A>G	NM_000051.3	splice_donor_variant	COSM4746032		
ATM	Indel	Insertion	11	108198425	48	W2344fs	C>CT	c.7030dupT	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108186756	42	H2038Q	C>G	c.6114C>G	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108172408	35	L1737L	G>A	c.5211G>A	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108151873	24	L1185*	T>G	c.354T>G	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108150057	23	L1108L	G>A	c.3324G>A	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	108143553	22	D1089N	G>A	c.3238G>A	NM_000051.3				
ATM	SNV		11	1081100948	4	R110X	G>A	c.328G>A	NM_000051.3	splice_region_variant	COSM1742334		
BRCA1	SNV		17	41251844	7	L165L	C>T	c.495G>A	NM_007294.3			rs745321499	
BRCA1	SNV		17	41244916	10	A678S	C>A	c.2632G>T	NM_007294.3				
BRCA1	SNV		17	41244699	10	S950C	G>C	c.2849C>G	NM_007294.3				
BRCA1	Indel	Deletion	17	41243512	10	E194fs	CTTC>TTT	c.4093_4036delGAGGAGAA	NM_007294.3				
BRCA1	SNV		17	41223029	15	R1634R	C>T	c.4902G>A	NM_007294.3				
BRCA1	SNV		17	412115903	17	V1714L	C>G	c.5140G>C	NM_007294.3				
BRCA1	SNV		17	41197760	23	A1843T	C>T	c.5527G>A	NM_007294.3				
BRCA1	SNV		17	32972686	27	L3346L	T>C	c.10036T>C	NM_000059.3				
BRCA2	SNV		13	32945134	20	N2843N	T>C	c.8529T>C	NM_000059.3				
BRCA2	SNV		13	32914663	11	G2057G	A>G	c.6171A>G	NM_000059.3				
BRCA2	SNV		13	32914271	11	E1927K	G>A	c.5779G>A	NM_000059.3				
BRCA2	SNV		13	32914102	11	F1870F	C>T	c.5610C>T	NM_000059.3				
BRCA2	SNV		13	32913676	11	F1728D	C>T	c.5184C>T	NM_000059.3				
BRCA2	Indel	Insertion	13	32907277	10	N556_P56dup	T>TCCAAATTATTAATGATGGAAGCTGG	c.1666_1692dupAATTATTAATGATGGAAGCTGGCCA	NM_000059.3				
CNN1	SNV		16	90314681	12	A106A	G>A	c.1230G>A	NM_001238.2			rs546106493	
CDH1	Indel	Deletion	16	68947263	9	L369fs	ACTGAAAGTGACTGACTGCTGATGCGCC>A	c.1187_121delTGAAGTGACTGACTGCTGATGCGCC	NM_004360.3				
CDH1	SNV		16	68937273	9	L369fs	C>T	c.314C>T	NM_004360.3				
CDH1	SNV		16	68935966	3	R63*	C>T	c.181C>T	NM_004360.3			rs58778047	
CDKL2	Indel	Deletion	17	97619313	1	S333_S341del	GGCGGTCCAGGACAGCCCTCTCTTGAGCAA>G	c.996_1028delGACAGCCCTCTCTTGAGCAAGCGGTC	NM_008507.3			rs776044022	
CDK6	SNV		7	92355008	4	G157R	C>T	c.469G>A	NM_001259.6				
CDKN2A	SNV		9	21971119	2	R80L	C>A	c.239G>T	NM_000077.4				
DDR2	SNV		1	162745262	15	H578Y	C>T	c.1732C>T	NM_001014796.1				
EGFR	SNV		7	55269462	26	I1050T	T>C	c.3149T>C	NM_005228.3			rs529174941	
EGFR	SNV		7	55269021	25	T1029T	C>G	c.3087G>A	NM_005228.3			rs141489713	
EGFR	SNV		7	55268094	24	Y978*	G>A	c.2934C>G	NM_005228.3				
EGFR	SNV		7	55249059	20	V786E	T>A	c.2357T>A	NM_005228.3				
EGFR	SNV		7	55249020	20	H773R	A>G	c.2318A>G	NM_005228.3			rs121913432	
EGFR	SNV		7	55240688	17	P644P	G>A	c.1932G>A	NM_005228.3			rs367908827	
EGFR	SNV		7	55232981	15	D577E	C>A	c.1731C>A	NM_005228.3				

Gen	Variant_type	Indel_type	Chromosome	Position	Exon	Mut_aa	Mut_nt	Mut_cdna	Transcript	Splice_effect	COSMIC	dbSNP
EGFR	SNV		7	55221710	7	R35C	C>T	c.75G>T	NM_005283.3		COSM485752	
EGFR	SNV		7	55214594	4	S174C	A>T	c.520A>T	NM_005283.3			rs374582814
EGFR	SNV		7	55211066	3	Y113Y	C>T	c.339C>T	NM_005283.3			
ERBB2	SNV		17	37883158	25	E102IK	G>A	c.3061G>A	NM_004448.2	splice_region_variant	COSM1251412	
ERBB2	SNV		17	37880061	19	D769Y	G>T	c.2305G>T	NM_004448.2		COSM14060	rs121913470
ERBB2	SNV		17	37880220	19	L755S	T>C	c.2264T>C	NM_004448.2			
ERBB2	SNV		17	37872182	12	E501E	G>A	c.1503G>A	NM_004448.2			
ERBB2	SNV		17	37866714	7	S294I	G>T	c.881G>T	NM_004448.2			rs748701236
ERBB2	SNV		17	37866358	6	A21IA	C>T	c.663C>T	NM_004448.2			rs775382058
ERBB2	SNV		17	37864607	3	A87T	G>A	c.259G>A	NM_004448.2			
ESR1	SNV		6	152419937	10	E542Q	G>C	c.1624G>C	NM_001122742.1		COSM494250	
ESR1	SNV		6	152419926	10	D538G	A>G	c.1613A>G	NM_001122742.1		COSM1074637	
ESR1	SNV		6	152419923	10	Y537C	A>G	c.1610A>G	NM_001122742.1		COSM1074639	
ESR1	SNV		6	152419923	10	Y537S	A>C	c.1610A>C	NM_001122742.1		COSM1074635	
ESR1	SNV		6	152419922	10	Y537N	T>A	c.1609T>A	NM_001122742.1			
ESR1	SNV		6	152419920	10	L536P	T>C	c.1607T>C	NM_001122742.1		COSM1074628	
ESR1	Indel	Deletion	6	152382151	8	V422del	ATGG>A	c.1265_1267delTGG	NM_001122742.1			
ESR1	Indel	Deletion	6	152382110	8	Q414_G117delInsR	CAGGGAAAT>C	c.1241_1249delAGGGAAAAAT	NM_001122742.1			
ESR1	SNV		6	152352852	7	E380Q	G>C	c.1138G>C	NM_001122742.1		COSM3825920	
ESR1	SNV		6	152265613	6	H560D	C>G	c.1066C>G	NM_001122742.1			
ESR1	SNV		6	152265613	6	H956Y	C>T	c.1066C>T	NM_001122742.1			
FBXW7	SNV		4	153247252	10	G517E	C>T	c.1505G>A	NM_033632.3		COSM732383	COSM732385
FGFR1	SNV		8	38287738	3	S107*	G>T	c.320C>A	NM_023110.2			
FGFR1	SNV		8	38279554	8	G348R	C>T	c.1042G>A	NM_023110.2			
FGFR1	SNV		8	38275496	11	K482E	T>C	c.1444A>G	NM_023110.2			
FGFR1	SNV		8	38274832	12	T552M	G>A	c.1655C>T	NM_023110.2			rs760702592
FGFR2	SNV		10	123325002	3	A109V	G>A	c.326C>T	NM_000141.4			
FGFR2	SNV		10	123279677	7	S252L	G>A	c.755C>T	NM_000141.4		COSM494845	rs79184941
FGFR2	SNV		10	123279528	7	G302R	C>T	c.904G>A	NM_000141.4			
FGFR2	SNV		10	123260350	11	K517K	C>T	c.1551G>A	NM_000141.4			
FGFR2	SNV		10	123259059	12	I541T	A>G	c.1627T>C	NM_000141.4			
GATA3	Indel	Deletion	10	8115898	6	S405fs	TCCTTGAGCCATCTCG>T	c.1212_1238delGAGCCATCTCGCCT	NM_001002995.1		COSM416811	COSM4174805
GATA3	Indel	Insertion	10	8111513	5	D336fs	T>TG	c.1006dupGG	NM_001002995.1			rs780877271
HNF1A	SNV		12	121432108	4	T385T	G>A	c.855G>A	NM_005453.5			
HNF1A	Indel	Deletion	11	534257	2	I21S	CTGG>A>C	c.62_65delTCA	NM_005453.2			
IDH1	Indel	Deletion	2	209113208	4	R100fs	G>C	c.236delC	NM_005896.2			
IDH1	SNV		2	209113144	4	V121V	C>G	c.363G>C	NM_005896.2			
IDH2	SNV		15	90631934	4	R140Q	C>T	c.319G>A	NM_002168.2		COSM41590	rs121915102
JAK3	SNV		19	17947940	13	D595G	T>C	c.1784A>G	NM_00215.3	splice_region_variant		
KRAS	SNV		12	25398285	2	G12C	C>A	c.34G>T	NM_004985.3		COSM516	rs121915330
KRAS	SNV		12	25398284	2	G12D	C>T	c.35G>A	NM_004985.3		COSM521	rs121915329
MAP2K2	SNV		19	4110544	3	Y138C	T>C	c.413A>G	NM_030662.3			rs775213593
MAPK3	SNV		16	30129088	5	I26I	G>A	c.678C>T	NM_002746.2			rs149920658
MAPK3	SNV		16	30128561	6	N274S	T>C	c.821A>G	NM_002746.2			
MET	SNV		7	116417480	16	D1099E	C>A	c.3297C>A	NM_000245.2			
MTOR	SNV		1	11298544	12	G639G	G>C	c.1917C>G	NM_004958.3			
MTOR	SNV		1	11298531	12	V644L	C>G	c.1906G>C	NM_004958.3			
MTOR	SNV		1	11291365	17	R881C	G>A	c.2641C>T	NM_004958.3		COSM4020689	
MTOR	SNV		1	11273609	21	M1044I	C>T	c.3137G>A	NM_004958.3		COSM1497747	rs532979867
NOTCH1	SNV		2	178098810	2	F79K	C>T	c.335G>A	NM_006164.4		COSM133851	
NOTCH1	SNV		9	18938662	34	S233S	C>T	c.756G>A	NM_017617.3		COSM4561	rs534623042
NRAS	SNV		1	115258748	2	G12R	C>G	c.34G>C	NM_002544.4			rs121913150
NTRK1	SNV		1	15644905	15	V653M	G>A	c.1987G>A	NM_002529.3			rs139731614
NTRK1	SNV		1	15644595	12	F480K	G>A	c.1486G>A	NM_002529.3			
PDGFRA	Indel	Deletion	4	55156550	22	D985fs	CAGACA>C	c.2951_2957delGAGCAA	NM_006206.4			
PDGFRA	SNV		4	55153633	19	I867V	A>G	c.2599A>G	NM_006206.4			
PDGFRA	SNV		4	55144592	15	N689T	A>C	c.2066A>C	NM_006206.4			
PDGFRA	SNV		4	55133805	7	R340W	C>T	c.1018C>T	NM_006206.4			rs376626935
PDGFRA	SNV		4	55133521	6	L75L	G>A	c.825G>A	NM_006206.4			
PDGFRA	SNV		4	55128884	4	V140M	G>A	c.418G>A	NM_006206.4		COSM1220051	rs574683248
PIK3CA	SNV		3	178952085	21	H1047R	A>G	c.3140A>G	NM_006218.2		COSM775	rs121913179

2. Material no publicado asociado al primer trabajo

Unpublished material work 1

Table U1. Hazard ratios for progression free survival and Harrell C index:

Variable	HR	95% CI	p-value	Harrell C index
mVAFR	1.59	1.12-2.27	0.010	0.663
mVAFR_log	1.74	1.13-2.86	0.012	0.631
VAFR most frequent mutation	1.68	1.06-2.66	0.026	0.575

Table U2. Hazard ratios for overall survival and Harrell C index:

Variable	HR	95% CI	p-value	Harrell C index
mVAFR	1.71	1.03-2.81	0.036	0.704
mVAFR_log	6.12	1.12-33.57	0.037	0.720
VAFR most frequent mutation	1.25	0.76-2.06	0.371	0.650

Overall survival analysis with a follow up of 26.3 months (95% CI 22.8-29.3):

Table U3. Multivariable Cox regression analysis of overall survival considering mVAFR as continuous variable:

	HR	95% CI	p-value
mVAFR	2.29	1.23-4.26	0.009
Hormone-resistance	13.71	2.02-93.02	0.006
Line of treatment			
Second	3.54	0.77-16.33	0.105
Third or more	2.70	0.41-17.92	0.305

Table U4. Multivariable Cox regression analysis of overall survival considering mVAFR groups:

	HR	95% CI	p-value
mVAFR groups			
mVAFR-medium ¹	4.53	0.70-29.30	0.113
mVAFR-high ¹	13.93	2.15-90.47	0.006
ctDNA-low ¹	0.65	0.09-4.89	0.673
Hormone-resistance	7.24	1.65-31.83	0.009
Line of treatment			
Second	2.79	0.67-11.65	0.160
Third or more	2.01	0.32-12.79	0.459

¹ HR respect to mVAFR-low group

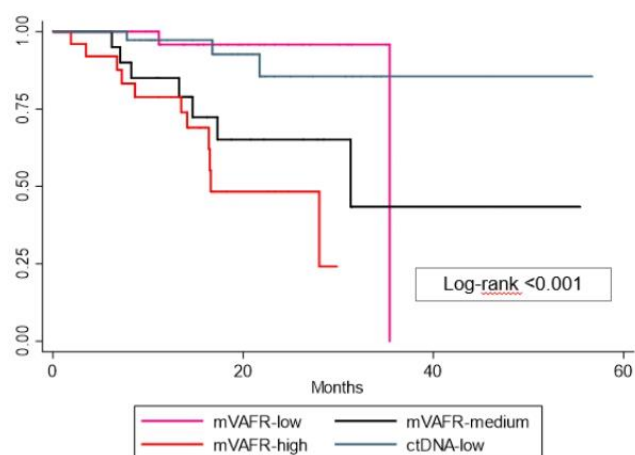


Figure U1. Kaplan-Meier curves of overall survival among patients in the four mVAFR groups.

Table U5. Median overall survival according to the mVAFR groups:

	Median overall survival	95% CI
mVAFR-low	35.40	NR-NR
mVAFR-medium	31.31	14.7-NR
mVAFR-high	16.60	14.12-NR
ctDNA-low	NR	NR-NR

*NR, non reached.

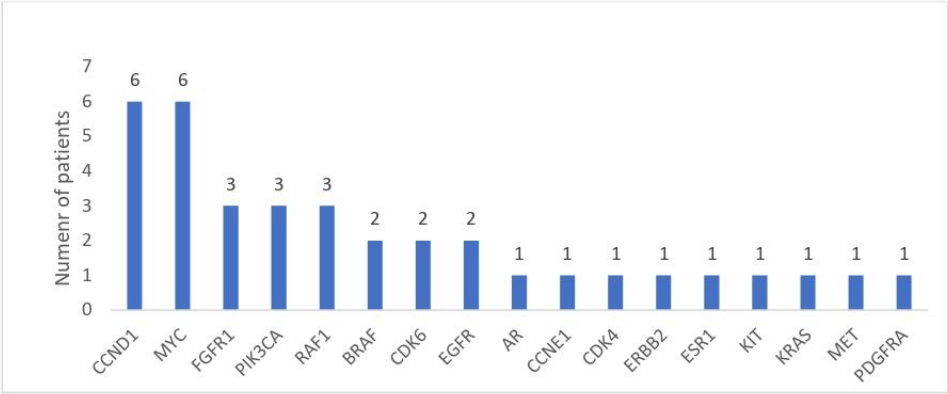


Figure U2. Frequency and distribution of gene copy number variations identified at baseline in the patient dataset.

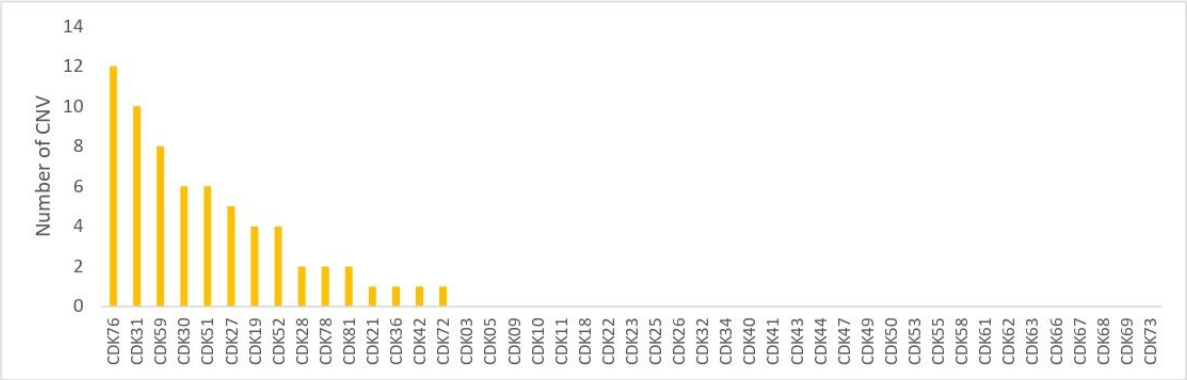


Figure U3. Number of copy number variations across all the patients at baseline in the patient dataset.

3. Material suplementario asociado al tercer trabajo

Table A1. Main features of the 10 publicly available studies analyzed.

	Authors	Year	Link	Title	Patients	Samples	Sequencing technique
Study1	Razavi et al.	2019	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30205045	The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers	1756	1918	MSK-IMPACT, a hybridization capture-based next-generation sequencing assay, which analyzes all protein-coding exons of between 341 and 468 cancer-associated genes
Study2	Pereira et al.	2016	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27161491	The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes	2509	2509	Targeted exome sequencing of 173 genes
Study3	MSK, unpublished	2019	MSK, unpublished	Targeted Sequencing of buparlisib + letrozole and alpelisib + letrozole-treated metastatic ER+ unmatched breast tumors	68	70	MSK-IMPACT, Targeted exome sequencing
Study4	Shah et al.	2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22495314	The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers	65	65	Genome/exome sequence
Study5	Banerji et al.	2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722202	Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes	103	103	Whole-exome sequencing
Study6	Stephens et al.	2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722201	The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer	100	100	Exome sequencing
Study7	TCGA	2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000897	Comprehensive molecular portraits of human breast tumours	1101	1108	Whole exome sequencing
Study8	Lefebvre et al.	2016	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28027327	Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis	216	216	Whole-exome sequencing
Study9	The Metastatic Breast Cancer Project	2018	unpublished	The Metastatic Breast Cancer Project	237	237	Whole Exome Sequencing
Study10	Martelotto et al.	2015	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26095796	Genomic landscape of adenoid cystic carcinoma of the breast	12	12	Whole Exome Sequencing

Table A2. PIK3CA mutations found in ctDNA from Hospital Clinic of Barcelona cohort

Type of <i>PIK3CA</i> mutation	Mutation frequency, n (%)	Detected by theascreen
E545K	6 (35%)	Yes
H1047R	4 (24%)	Yes
H1047L	1 (6%)	Yes
C420R	1 (6%)	Yes
E453_P458del	1 (6%)	No
E542K	1 (6%)	Yes
E726K*	1 (6%)	No
G364R	1 (6%)	No
H1047I	1 (6%)	No
P104_V105del	1 (6%)	No

*Doble mutation

4. Material no publicado asociado al tercer trabajo

Unpublished material work 3: Distribution of *PIK3CA* mutations in plasma in a second cohort

Methods

To evaluate the distribution of *PIK3CA* mutations in ctDNA using a highly sensitive assay we tested frozen plasma samples from August/2017 to October/2020 of 128 consecutive patients with metastatic hormone receptor positive/HER2 negative breast cancer from the Hospital Clinic of Barcelona, Hospital Germans Trias i Pujols, Cremona Hospital and Hospital 12 de Octubre. Plasma samples were sent to Guardant Health (California, USA), and the 74-gene standardized Guardant B360 NGS-based assay, which includes all 21 exons from the *PIK3CA* gene, was performed.

All patients had recurred or progressed to prior lines and were about to initiate a CDK4/6 inhibitor and endocrine therapy.

Statistical analyses

Patient and tumor characteristics were analyzed using descriptive statistics.

Distribution of *PIK3CA* mutations in plasma ctDNA

Among the 128 patients, 5 patients (3.9%) had possible contaminations and 2 patients had second malignancies (1.6%) and were excluded. Finally, 121 patients (94.5%) were evaluable of whom 114 (94.2%) had ctDNA detectable at some level.

A *PIK3CA* mutation was detected in 44 patients (36.4%), of them, 13 patients had more than 1 mutation (29.5%) (9 patients had double mutations, 3, triple and 1, quadruple mutations) (**Fig. U1**). The spectrum of *PIK3CA* mutations was similar to the one found in the previous *in silico* population analysis. Five *PIK3CA* mutations comprised 71% of all *PIK3CA* mutations: H1047R (27%), E545K (24%), E542K (11%), M1043I (5%), and E545A (3%) (**Fig. U2**). Therascreen® gene list would capture 68% of all *PIK3CA* mutations and 84% of patients with a known *PIK3CA* mutated breast cancer (**Fig. U3 and Fig. U4**). Among patients with multiple *PIK3CA* mutated tumors, the theerascreen® panel would capture 62% as harboring 1 single *PIK3CA* mutation, 15% as *PIK3CA* mutation undetected, and 23% as *PIK3CA* multiple-mutated (**Fig. U5**).

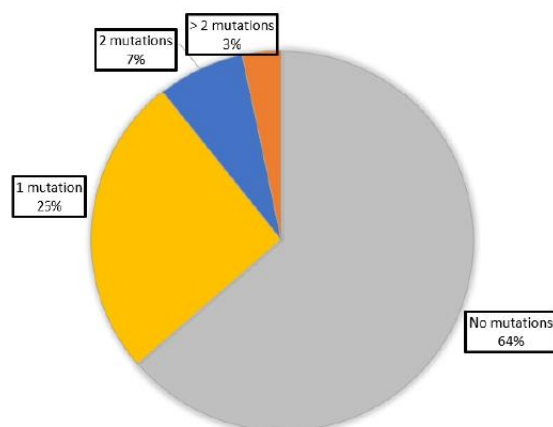


Fig. U1. Proportion of patients with one, two, or three or more *PIK3CA* mutations in the cohort.

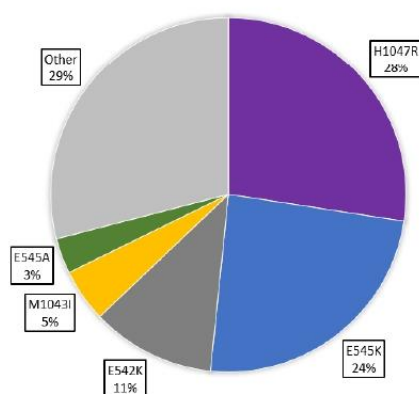


Fig. U2. Distribution of the various types of *PIK3CA* mutations in *PIK3CA* mutated tumors.

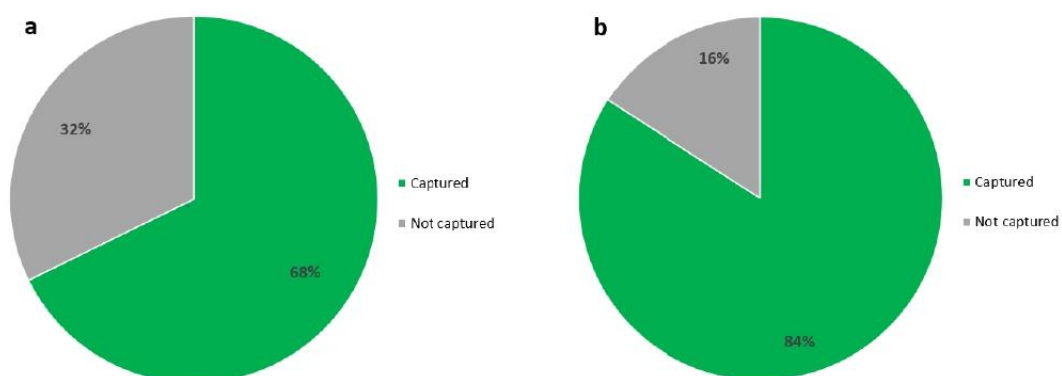


Fig. U3. a. Proportion of *PIK3CA* mutations that would have been captured by the theascreen® assay. **b.** Proportion of patients with *PIK3CA* mutations that would have been captured by the theascreen® assay.

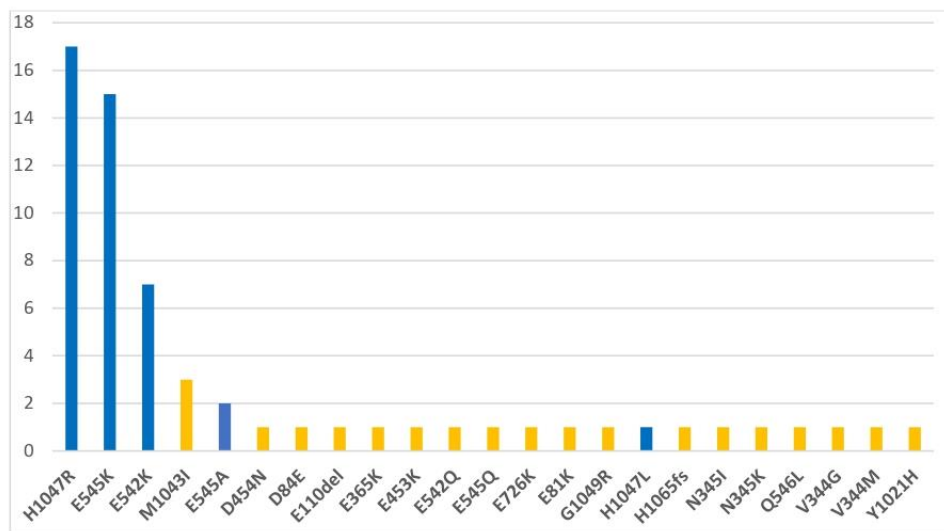


Fig. U4. Distribution of *PIK3CA* mutations. In blue, mutations detected by thetherascreen®, in yellow, not detected.

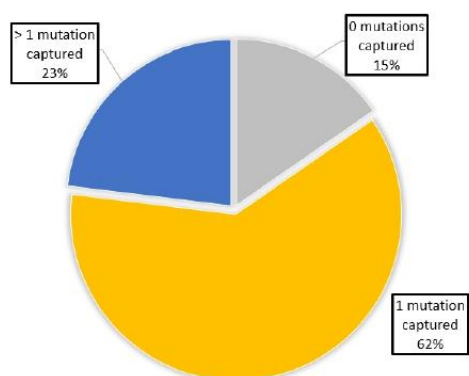


Fig. U5. Proportion of patients with two or more *PIK3CA* mutations detected by thetherascreen® assay as either *PIK3CA* mutation “not detected,” single *PIK3CA* mutation or as harboring 2 or more *PIK3CA* mutations.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;0(0):1–41.
2. SEOM. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España 2021. *Red Española Regist Cáncer*. 2020;1–21.
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. McTiernan A. Behavioral Risk Factors in Breast Cancer: Can Risk Be Modified? *Oncologist*. 2003.
5. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr>.
6. Coleman M, Allemani C. Global surveillance of cancer survival trends up to 2014 (CONCORD-3). *Eur J Public Health*. 2018.
7. Ayala de la Peña F, Andrés R, García-Sáenz JA, Manso L, Margelí M, Dalmau E, et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). *Clin Transl Oncol [Internet]*. 2019;21(1):18–30. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1973-6>
8. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194–220.
9. Gradishar WJ, Anderson BO, Abraham J, Aft R. Breast Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology in: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network Volume 18 Issue 4 (2020)*. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020.
10. Breast Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 2 WHO Classification of Tumours Editorial Board. 2019. In.
11. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*. 2017.
12. Wolff AC, McShane LM, Hammond MEH, Allison KH, Fitzgibbons P, Press MF, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2018.
13. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011.
14. Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: A study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER program. *Arch Pathol Lab Med*. 2014.
15. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsky P, Gnant M, Poortmans P, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: The St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Annals of Oncology*. 2019.

16. 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.
17. SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics [Internet]. Surveillance Research Program, National Cancer Institute. Available from <https://seer.cancer.gov/explorer/>. (Accessed: 5th April 2021).
18. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. National Cancer Institute. 2019.
19. Fisher B, Redmond CK, Wickerham DL, Rockette HE, Brown A, Allegra J, et al. Relation of estrogen and/or progesterone receptor content of breast cancer to patient outcome following adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 1983.
20. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Mar 15 [cited 2020 Nov 28];344(11):783–92. Available from: www.nejm.org
21. SEER*Stat Databases: NAACCR Incidence Data - CiNA Analytic File, 1995-2016, for NHIv2 Origin and for Expanded Races, Custom File With County, ACS Facts and Figures projection Project (which includes data from CDC's National Program of Cancer Registries).
22. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet*. 2017.
23. Reis-filho JS, Ph D. Triple-Negative Breast Cancer. 2010.
24. Hurvitz SA, Im S-A, Lu Y-S, Colleoni M, Franke FA, Bardia A, et al. Phase III MONALEESA-7 trial of premenopausal patients with HR+/HER2- advanced breast cancer (ABC) treated with endocrine therapy ± ribociclib: Overall survival (OS) results. *J Clin Oncol*. 2019.
25. Tripathy D, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Harbeck N, et al. Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018.
26. Swain SM, Miles D, Kim SB, Im YH, Im SA, Semiglazov V, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2020.
27. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2108–21.
28. G.N. Hortobagyi, S.M. Stemmer, H.A. Burris III, Y.S. Yap, G.S. Sonke, L. Hart, M. Campone, K. Petrakova, E.P. Winer, W. Janni, P.F. Conte, D. Cameron, F. André, C. Arteaga, J.P. Zarate, A. Chakravartty, T. Taran, F. Le Gac, P. Serra, J. O'Shaughnessy, Zar JO. LBA17_PR - Overall survival (OS) results from the phase III MONALEESA-2 (ML-2) trial of postmenopausal patients (pts) with hormone receptor positive/human epidermal growth factor receptor 2 negative (HR+/HER2-) advanced breast cancer (ABC) treated with en. *Ann Oncol*. 2021;32 (suppl_):S1283–346.
29. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
30. Sørle T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of

- breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003.
31. Bernard PS, Parker JS, Mullins M, Cheung MCU, Leung S, Voduc D, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009.
 32. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869–74.
 33. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Smith L V., et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008.
 34. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *J Am Med Assoc*. 2006.
 35. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010.
 36. Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: Use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*. 2009.
 37. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005.
 38. Prat A, Cortés J. *Perfiles de expresion génica en cáncer de mama*. Transworld Editors SL, editor. 2015.
 39. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors - The Cancer Genome Atlas Network. Supplementary information. *Nature*. 2012.
 40. Kuong KJ, Loeb LA. APOBEC3B mutagenesis in cancer. *Nature Genetics*. 2013.
 41. Kanu N, Cerone MA, Goh G, Zalmas LP, Bartkova J, Dietzen M, et al. DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer. *Genome Biol*. 2016.
 42. Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, et al. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Med*. 2016.
 43. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics*. 2015.
 44. Raison C. NanoString® launches its first commercial diagnostic product. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2013.
 45. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the consensus discussion. *Breast Care*. 2011.
 46. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013.
 47. Cheang MCU, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, et al. Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression. *Oncologist*. 2015.
 48. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic

significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):203–9.

49. 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;24:S26–35.
50. Prat A, Brase JC, Cheng Y, Nuciforo P, Paré L, Pascual T, et al. Everolimus plus Exemestane for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A PAM50 Intrinsic Subtype Analysis of BOLERO-2. *Oncologist*. 2019;24(7):893–900.
51. Fujii T, Kogawa T, Dong W, Sahin AA, Moulder S, Litton JK, et al. Revisiting the definition of estrogen receptor positivity in HER2-negative primary breast cancer. *Ann Oncol*. 2017.
52. Prat A, Ortega V, Villagrasa P, Paré L, Galván P, Oliveira M, et al. Abstract P1-09-09: Efficacy and gene expression results from SOLT11007 NEOERIBULIN phase II clinical trial in HER2-negative early breast cancer. In 2017.
53. Prat A, Galván P, Jimenez B, Buckingham W, Jeiranian HA, Schaper C, et al. Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Core Needle Biopsy Samples with the Prosigna Assay. *Clin Cancer Res*. 2016.
54. Cejalvo JM, Pascual T, Fernández-Martínez A, Brasó-Maristany F, Gomis RR, Perou CM, et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2018;67(April):63–70.
55. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME, et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol*. 2013.
56. VanderLaan PA, Yamaguchi N, Folch E, Boucher DH, Kent MS, Gangadharan SP, et al. Success and failure rates of tumor genotyping techniques in routine pathological samples with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014.
57. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med*. 2018.
58. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017.
59. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*. 2015.
60. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015.
61. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem*. 2010;56(8):1279–86.
62. Mouliere F, Robert B, Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011.
63. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001.
64. Sun K, Jiang P, Chan KCA, Wong J, Cheng YKY, Liang RHS, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015.
65. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A, et

- al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016.
66. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: Length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998.
67. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res*. 1977.
68. Breitbach S, Sterzing B, Magallanes C, Tug S, Simon P. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *J Appl Physiol*. 2014.
69. De Vlamincq I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C, et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015.
70. Dennis Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Magnus Hjelm N. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999.
71. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014.
72. Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, Biggs H, Hodgkin C, Addley H, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med*. 2016;13(12):1–25.
73. Gautschi O, Huegli B, Ziegler A, Gugger M, Heighway J, Ratschiller D, et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett*. 2007.
74. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, Micard S, Landi B, Blons H, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer*. 2002.
75. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. In: *Clinica Chimica Acta*. 2001.
76. Passiglia F, Rizzo S, Rolfo C, Galvano A, Bronte E, Incorvaia L, et al. Metastatic Site Location Influences the Diagnostic Accuracy of ctDNA EGFR- Mutation Testing in NSCLC Patients: a Pooled Analysis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018.
77. Cho MS, Park CH, Lee S, Park HS. Clinicopathological parameters for circulating tumor DNA shedding in surgically resected non-small cell lung cancer with EGFR or KRAS mutation. *PLoS One*. 2020.
78. Davis AA, Jacob S, Gerratana L, Shah AN, Wehbe F, Katam N, et al. Landscape of circulating tumour DNA in metastatic breast cancer. *EBioMedicine*. 2020;58:1–8.
79. Kingston B, Cutts RJ, Bye H, Beaney M, Walsh-Crestani G, Hrebien S, et al. Genomic profile of advanced breast cancer in circulating tumour DNA. *Nat Commun*. 2021.
80. Masfarré L, Vidal J, Fernández-Rodríguez C, Montagut C. Ctdna to guide adjuvant therapy in localized colorectal cancer (Crc). *Cancers*. 2021.
81. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human genomics*. 2019.
82. Croessmann S, Park BH. Circulating tumor DNA in early-stage breast cancer: New directions and potential clinical applications. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2021.

83. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999.
84. Filges S, Yamada E, Ståhlberg A, Godfrey TE. Impact of Polymerase Fidelity on Background Error Rates in Next-Generation Sequencing with Unique Molecular Identifiers/Barcodes. *Sci Rep*. 2019.
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.
86. Newman AM, Bratman S V., To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014.
87. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*. 2016.
88. <https://guardant360cdx.com/genelist/>.
89. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*. 2017.
90. Chae YK, Davis AA, Carneiro BA, Chandra S, Mohindra N, Kalyan A, et al. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA. *Oncotarget*. 2016.
91. Torga G, Pienta KJ. Patient-Paired sample congruence between 2 commercial liquid biopsy tests. *JAMA Oncology*. 2018.
92. Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS, Choudhury AD, Stover DG, Parsons HA, et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun*. 2017.
93. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisano D, Lopez R, Blau S, et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS One*. 2015;10(10):1–27.
94. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012.
95. Goyal L, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, Ahronian LG, et al. Polyclonal secondary FGFR2 mutations drive acquired resistance to FGFR inhibition in patients with FGFR2 fusion-positive cholangiocarcinoma. *Cancer Discov*. 2017.
96. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 2012.
97. Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, Corti G, Crisafulli G, Ahronian LG, et al. Tumor heterogeneity and Lesion-Specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2016.
98. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG, Parikh AR, Niedzwiecki D, Pereira AAL, et al. Genomic landscape of cell-free DNA in patients with colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2018.
99. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: A proof-of-principle. *Ann Oncol*. 2014.
100. 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.
101. Allouchery V, Beaussire L, Perdrix A, Sefrioui D, Augusto L, Guillemet C, et al. Circulating ESR1 mutations at the end of aromatase inhibitor adjuvant treatment and after relapse in breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2017.
 102. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(6):520–9.
 103. Zundeleovich A, Dadiani M, Kahana-Edwin S, Itay A, Sella T, Gadot M, et al. ESR1 mutations are frequent in newly diagnosed metastatic and loco-regional recurrence of endocrine-treated breast cancer and carry worse prognosis. *Breast Cancer Res.* 2020.
 104. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of Oncogene Mutations in Sputum Precedes Diagnosis of Lung Cancer. *Cancer Res.* 1994.
 105. Gormally E, Vineis P, Matullo G, Veglia F, Caboux E, Le Roux E, et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: A prospective study. *Cancer Res.* 2006.
 106. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012 May 30;4(136).
 107. Dawson SJ, Tsui DWY, 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;368(13):1199–209.
 108. Krimmel JD, Schmitt MW, Harrell MI, Agnew KJ, Kennedy SR, Emond MJ, et al. Ultra-deep sequencing detects ovarian cancer cells in peritoneal fluid and reveals somatic TP53 mutations in noncancerous tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016.
 109. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 2014.
 110. Chan HT, Chin YM, Nakamura Y, Low SK. Clonal hematopoiesis in liquid biopsy: From biological noise to valuable clinical implications. *Cancers.* 2020.
 111. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, Simon MS, Cheang G, Lee S, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* 2018.
 112. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 2019.
 113. Mead A, O’Sullivan J. Precision Medicine in Clonal Hematopoiesis: New Data on Risk for Transformation. *Hematol.* 2020.
 114. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related cancer mutations associated with clonal hematopoietic expansion. *Nat Med.* 2014;20(12):1472–8.
 115. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, Kishtagari A, Syed A, Jonsson P, et al. Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell.* 2017.
 116. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res.* 2018.
 117. 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.
 118. 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.
119. 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.
 120. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016.
 121. Olsson E, Winter C, George A, Chen Y, Howlin J, Tang ME, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease . *EMBO Mol Med*. 2015.
 122. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005.
 123. Fazel R, Krumholz HM, Wang Y, Ross JS, Chen J, Ting HH, et al. Exposure to Low-Dose Ionizing Radiation from Medical Imaging Procedures. *N Engl J Med*. 2009.
 124. Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget*. 2015.
 125. Melichar B. Biomarkers in the treatment of cancer: Opportunities and pitfalls. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013.
 126. Ayala de la Peña F, Ortiz-Muñoz B, Quintanar-Verdúñez T, Santotoribio JD, de la Cruz S, Trapé-Pujol J, et al. Consensus of the Spanish society of laboratory medicine and the Spanish society of medical oncology on the methodology and criteria for evaluation of circulating tumour markers in breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2021.
 127. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007.
 128. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol*. 2020.
 129. Lauro S, Trasatti L, Bordin F, Lanzetta G, Bria E, Gelibter A, et al. Comparison of CEA, MCA, CA 15-3 and CA 27-29 in follow-up and monitoring therapeutic response in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 1999.
 130. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2010.
 131. Husain H, Melnikova VO, Kosco K, Woodward B, More S, Pingle SC, et al. Monitoring daily dynamics of early tumor response to targeted therapy by detecting circulating tumor DNA in urine. *Clin Cancer Res*. 2017.
 132. Xi L, Pham THT, Payabyab EC, Sherry RM, Rosenberg SA, Raffeld M. Circulating tumor DNA as an early indicator of response to T-cell transfer immunotherapy in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2016.
 133. Cabel L, Bidard FC, Servois V, Cacheux W, Mariani P, Romano E, et al. HPV circulating tumor DNA to monitor the efficacy of anti-PD-1 therapy in metastatic squamous cell carcinoma of the anal canal: A case report. *Int J Cancer*. 2017.
 134. Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, Higgs BW, Gupta A, Dennis PA, et al. Early reduction in

ctDNA predicts survival in patients with lung and bladder cancer treated with durvalumab. *Clin Cancer Res.* 2018;24(24):6212–22.

135. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5416–25.
136. Ricciuti B, Jones G, Severgnini M, Alessi J V., Recondo G, Lawrence M, et al. Early plasma circulating tumor DNA (ctDNA) changes predict response to first-line pembrolizumab-based therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother cancer.* 2021.
137. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O’Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in egfrmutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res.* 2014.
138. Bratman S V., Yang SYC, Iafora MAJ, Liu Z, Hansen AR, Bedard PL, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer.* 2020.
139. Zhang Q, Luo J, Wu S, Si H, Gao C, Xu W, et al. Prognostic and predictive impact of circulating tumor dna in patients with advanced cancers treated with immune checkpoint blockade. *Cancer Discov.* 2020.
140. O’Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun.* 2018.
141. Hrebien S, Citi V, Garcia-Murillas I, Cutts R, Fenwick K, Kozarewa I, et al. Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression-free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial. *Ann Oncol.* 2019.
142. Darrigues L, Pierga JY, Bernard-Tessier A, Bièche I, Silveira AB, Michel M, et al. Circulating tumor DNA as a dynamic biomarker of response to palbociclib and fulvestrant in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2021.
143. 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.
144. Von Minckwitz G, Untch M, Nueesch E, Kaufmann M, Kuemmel S, Fasching PA, et al. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer subtypes: Pooled multilayer analysis of the German neoadjuvant chemotherapy trials. *J Clin Oncol.* 2010.
145. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2017.
146. von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019.
147. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Nomura Y, et al. Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet.* 1998.
148. Bradley R, Burrett J, Clarke M, Davies C, Duane F, Evans V, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet.* 2015;386(10001):1341–52.
149. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet.* 2013;381(9869):805–16.

150. Goss PE. Letrozole in the extended adjuvant setting: MA.17. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;105(S1):45–53.
151. Jin H, Tu D, Zhao N, Shepherd LE, Goss PE. Longer-term outcomes of letrozole versus placebo after 5 years of tamoxifen in the NCIC CTG MA.17 trial: Analyses adjusting for treatment crossover. *J Clin Oncol*. 2012;30(7):718–21.
152. Blok EJ, Kroep JR, Kranenbarg EMK, Duijm-De Carpentier M, Putter H, Van Den Bosch J, et al. Optimal duration of extended adjuvant endocrine therapy for early breast cancer; results of the IDEAL trial (BOOG 2006-05). *J Natl Cancer Inst*. 2018.
153. Gnant M, Steger G, Greil R, Fitzal F, Mlineritsch B, Manfreda D, et al. Abstract GS3-01: A prospective randomized multi-center phase-III trial of additional 2 versus additional 5 years of anastrozole after initial 5 years of adjuvant endocrine therapy – results from 3,484 postmenopausal women in the ABCSG-16 trial. In 2018.
154. Francis PA, Pagani O, Fleming GF, Walley BA, Colleoni M, Láng I, et al. Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(2):122–37.
155. Lambertini M. Tailoring adjuvant endocrine therapy. 2020;(May).
156. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet [Internet]*. 2011;378(9804):1707–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61629-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61629-2)
157. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):47–56.
158. Werkhoven E Van, Hart G, Tinteren H Van, Elkhuizen P, Collette L, Poortmans P, et al. Nomogram to predict ipsilateral breast relapse based on pathology review from the EORTC 22881-10882 boost versus no boost trial. *Radiother Oncol [Internet]*. 2011;100(1):101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2011.07.004>
159. Recht A, Comen EA, Fine RE, Fleming GF, Hardenbergh PH, Ho AY, et al. Postmastectomy radiotherapy: An American Society of clinical oncology, American society for radiation oncology, and society of surgical oncology focused guideline update. *J Clin Oncol*. 2016;34(36):4431–42.
160. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005.
161. Chacón López-Muñiz JI, de la Cruz Merino L, Gavilá Gregori J, Martínez Dueñas E, Oliveira M, Seguí Palmer MA, et al. SEOM clinical guidelines in advanced and recurrent breast cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019.
162. Rugo HS, Rumble RB, Burstein HJ. Endocrine therapy for hormone receptor positive metastatic breast cancer: American society of clinical oncology guideline summary. *Journal of Oncology Practice*. 2016.
163. Giuliano M, Schettini F, Rognoni C, Milani M, Jerusalem G, Bachelot T, et al. Endocrine treatment versus chemotherapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative, metastatic breast cancer: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2019.

164. Robertson JF, Paridaens R, Bogaerts J, Rukazenzov Y, Campbell C, Bradbury I. Abstract P1-13-02: Visceral metastases from hormone receptor positive breast cancer are as sensitive to endocrine therapy as non-visceral metastases. In 2015.
165. Joensuu H, Holli K, Heikkinen M, Suonio E, Aro AR, Hietanen P, et al. Combination chemotherapy versus single-agent therapy as first- and second-line treatment in metastatic breast cancer: A prospective randomized trial. *J Clin Oncol*. 1998.
166. Xu YC, Wang HX, Tang L, Ma Y, Zhang FC. A systematic review of vinorelbine for the treatment of breast cancer. *Breast Journal*. 2013.
167. Chan A, Verrill M. Capecitabine and vinorelbine in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009.
168. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2007.
169. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortés J, Pivot X, Tomczak P, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010.
170. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: Randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011.
171. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019.
172. Al. CJ et. LBA16. KEYNOTE-355: Final results from a randomized, double-blind phase 3 study of first-line pembrolizumab + chemotherapy vs placebo + chemotherapy for metastatic TNBC. *ESMO Congr*. 2021.
173. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009.
174. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology and Therapeutics*. 2018.
175. Mouridsen H, Gershonovich M, Sun Y, Pérez-Carrión R, Boni C, Monnier A, et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: Results of a phase III study of the international letrozole breast cancer group. *J Clin Oncol*. 2001.
176. Di Leo A, Jerusalem G, Petruzelka L, Torres R, Bondarenko IN, Khasanov R, et al. Results of the CONFIRM phase III trial comparing fulvestrant 250 mg with fulvestrant 500 mg in postmenopausal women with estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010.
177. Robertson JFR, Llombart-Cussac A, Rolski J, Feltl D, Dewar J, Macpherson E, et al. Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: Results from the FIRST study. *J Clin Oncol*. 2009.
178. Robertson JFR, Bondarenko IM, Trishkina E, Dvorkin M, Panasci L, Manikhas A, et al. Fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg for hormone receptor-positive advanced breast cancer (FALCON): an international, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*. 2016.
179. Ellis MJ, Llombart-Cussac A, Feltl D, Dewar JA, Jasióŭka M, Hewson N, et al. Fulvestrant 500

- mg versus anastrozole 1 mg for the first-line treatment of advanced breast cancer: Overall survival analysis from the phase II first study. *J Clin Oncol*. 2015.
180. Sini V, Cinieri S, Conte P, De Laurentiis M, Leo A Di, Tondini C, et al. Endocrine therapy in post-menopausal women with metastatic breast cancer: From literature and guidelines to clinical practice. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016.
 181. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis SP, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine Reviews*. 2011.
 182. Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, et al. Estrogen receptor α and β subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005.
 183. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SAW, Shou J. Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res*. 2001.
 184. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* (80-). 1995.
 185. Johnston SRD. Enhancing Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: Cotargeting Signaling Pathways. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015.
 186. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004.
 187. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CCW, Levin ER. Integration of the Non-genomic and Genomic Actions of Estrogen. *J Biol Chem*. 2002.
 188. Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2017.
 189. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2017.
 190. Johnson J, Thijssen B, McDermott U, Garnett M, Wessels LFA, Bernards R. Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*. 2016.
 191. Hanahan D, Weinberg RA. Ha1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74. llmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011.
 192. Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C, Lax S, et al. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res*. 2008.
 193. Jirström K, Stendahl M, Rydén L, Kronblad Å, Bendahl PO, Stål O, et al. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res*. 2005.
 194. Eeckhoute J, Carroll JS, Geistlinger TR, Torres-Arzayus MI, Brown M. A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev*. 2006.
 195. Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen

- receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* 2009 Oct 29;11(5).
196. Miller TW, Balko JM, Fox EM, Ghazoui Z, Dunbier A, Anderson H, et al. ER α -dependent E2F transcription can mediate resistance to estrogen deprivation in human breast cancer. *Cancer Discov.* 2011.
 197. Thangavel C, Dean JL, Ertel A, Knudsen KE, Aldaz CM, Witkiewicz AK, et al. Therapeutically activating RB: Reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2011.
 198. O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2016.
 199. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, et al. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(20):1925–36.
 200. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(18):1738–48.
 201. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase 3 trial of first-line ribociclib + letrozole in hormone receptor-positive (HR+), HER2-negative (HER2–), advanced breast cancer (ABC). *J Clin Oncol.* 2017 May;35(15_suppl):1038.
 202. Johnston S, Martin M, Di Leo A, Im SA, Awada A, Forrester T, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *npj Breast Cancer* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Oct 7];5(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0097-z>
 203. Rugo HS, Finn · R S, Diéras · V, Ettl · J, Lipatov · O, Joy · A A, et al. Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2019;174. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05125-4>
 204. Sledge GW, Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, et al. The Effect of Abemaciclib Plus Fulvestrant on Overall Survival in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Breast Cancer That Progressed on Endocrine Therapy - MONARCH 2: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020.
 205. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phas. *Lancet Oncol.* 2016 Apr;17(4):425–39.
 206. Slamon DJ, Neven P, Chia S, Fasching PA, De Laurentiis M, Im SA, et al. Phase III randomized study of ribociclib and fulvestrant in hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer: MONALEESA-3. *J Clin Oncol.* 2018.
 207. Cristofanilli M, Rugo HS, Im S-A, Slamon DJ, Harbeck N, Bondarenko I, et al. Overall survival (OS) with palbociclib (PAL) + fulvestrant (FUL) in women with hormone receptor–positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2–negative (HER2–) advanced breast cancer (ABC): Updated analyses from PALOMA-3. *J Clin Oncol.* 2021.
 208. Slamon DJ, Neven P, Chia SKL, Jerusalem GHM, De Laurentiis M, Im S-A, et al. Updated overall survival (OS) results from the phase III MONALEESA-3 trial of postmenopausal patients (pts) with HR+/HER2- advanced breast cancer (ABC) treated with fulvestrant (FUL)

- ± ribociclib (RIB). *J Clin Oncol*. 2021.
209. Francesco Schettini, Fabiola Giudici, Mario Giuliano, Massimo Cristofanilli, Grazia Arpino, Lucia Del Mastro, Fabio Puglisi, Sabino De Placido IP et al. Overall survival of CDK4/6-inhibitors-based treatments in clinically relevant subgroups of metastatic breast cancer: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2020;May 14. pi.
 210. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/palbociclib-ibrance>. (Internet accessed 22-May-2021).
 211. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/ribociclib-kisqali>. (Internet accessed 22-May-2021).
 212. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-abemaciclib-initial-therapy-hr-positive-her2-negative-metastatic-breast-cancer>. (Internet accessed 22-May-21).
 213. European Medicines Agency's (EMA). Palbociclib EPAR-Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report. 2016;44(September). Available from: www.ema.europa.eu/contact
 214. CHMP. EPAR_initial submission_Kisqali (Ribociclib) tablet. 2017;44(June):121. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kisqali-epar-public-assessment-report_en.pdf
 215. European Medicines Agency. Assessment report: Verzenio. 2018;44(Julio):133.
 216. Ban M, Miše BP, Majić A, Dražić I, Vrdoljak E. Efficacy and safety of palbociclib in heavily pretreated patients with HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Futur Oncol*. 2018;14(6):537–44.
 217. Dhakal A, Matthews CM, Levine EG, Salerno KE, Zhang F, Takabe K, et al. Efficacy of Palbociclib Combinations in Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer Patients After Prior Everolimus Treatment. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2018;18(6):e1401–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.04.015>
 218. du Rusquec P, Palpacuer C, Campion L, Patsouris A, Augereau P, Gourmelon C, et al. Efficacy of palbociclib plus fulvestrant after everolimus in hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2018;168(2):559–66. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4623-8>
 219. Maurer C, Ferreira AR, Martel S, Lambertini M, Pondé N, Aftimos P, et al. Endocrine therapy and palbociclib within a compassionate use program in heavily pretreated hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast*. 2018;39:14–8.
 220. Dickler MN, Tolaney SM, Rugo HS, Cortes J, Dieras V, Patt D, et al. MONARCH 1, a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2017.
 221. Hamilton EP, Cortés J, Ozyilkan O, Chen S-C, Petrakova K, Manikhas A, et al. 2730 nextMONARCH: Final overall survival analysis of abemaciclib monotherapy or in combination with tamoxifen in patients with HR+, HER2- metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2020.
 222. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017.
 223. Criscitiello C, Marra A, Curigliano G. PIK3CA Mutation Assessment in HR+/HER2– Metastatic Breast Cancer: Overview for Oncology Clinical Practice. *J Mol Pathol*. 2021.

224. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005.
225. Kalra M, Nakshatri H. Will PI3K-targeted therapies for cancer become a reality? *Translational Cancer Research*. 2017.
226. Drullinsky PR, Hurvitz SA. Mechanistic basis for PI3K inhibitor antitumor activity and adverse reactions in advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2020.
227. Vasan N, Toska E, Scaltriti M. Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019.
228. Razavi P, Chang MT, Xu G, Bandlamudi C, Ross DS, Vasan N, et al. The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell*. 2018.
229. O'leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The genetic landscape and clonal evolution of breast cancer resistance to palbociclib plus fulvestrant in the PALOMA-3 trial. *Cancer Discov*. 2018.
230. Pernas Simon S, Villagrasa Gonzalez P, Vivancos A, Prat A, Scaltriti M, Burgues O, et al. AGATA molecular screening program: Implementing precision medicine in patients with advanced breast cancer in Spain. *Ann Oncol*. 2017.
231. Liu S, Knapp S, Ahmed AA. The structural basis of PI3K cancer mutations: From mechanism to therapy. *Cancer Research*. 2014.
232. Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the point of inhibition: A comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014.
233. Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005.
234. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*. 2015.
235. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science (80-)*. 2004.
236. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer*. 2005.
237. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2004.
238. Burke JE, Williams RL. Dynamic steps in receptor tyrosine kinase mediated activation of class IA phosphoinositide 3-kinases (PI3K) captured by H/D exchange (HDX-MS). *Adv Biol Regul*. 2013.
239. Cheung LWT, Yu S, Zhang D, Li J, Ng PKS, Panupinthu N, et al. Naturally occurring neomorphic PIK3R1 mutations activate the MAPK pathway, dictating therapeutic response to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Cell*. 2014.
240. Zhang Y, Kwok-Shing Ng P, Kucherlapati M, Chen F, Liu Y, Tsang YH, et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell*. 2017.
241. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008.
242. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, et al.

- Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest*. 2010.
243. Bosch A, Li Z, Bergamaschi A, Ellis H, Toska E, Prat A, et al. PI3K inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015.
 244. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994.
 245. Creighton CJ, Fu X, Hennessy BT, Casa AJ, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, et al. Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010.
 246. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2020.
 247. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnyak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009.
 248. Zardavas D, Te Marvelde L, Milne RL, Fumagalli D, Fountzilas G, Kotoula V, et al. Tumor PIK3CA genotype and prognosis in early-stage breast cancer: A pooled analysis of individual patient data. *J Clin Oncol*. 2018.
 249. Liu YR, Jiang YZ, Zuo WJ, Yu K Da, Shao ZM. PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotargets and Therapy*. 2014.
 250. Jain S, Shah AN, Santa-Maria CA, Siziopikou K, Rademaker A, Helenowski I, et al. Phase I study of alpelisib (BYL-719) and trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive metastatic breast cancer (MBC) after trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2018.
 251. Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z, Shao Z, Mano MS, Neciosup SP, et al. Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): A phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2015.
 252. Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2012.
 253. Baselga J, Im SA, Iwata H, Cortés J, De Laurentiis M, Jiang Z, et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017.
 254. Di Leo A, Johnston S, Lee KS, Ciruelos E, Lønning PE, Janni W, et al. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018.
 255. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929–40.
 256. Juric D, Janku F, Rodón J, Burris HA, Mayer IA, Schuler M, et al. Alpelisib Plus Fulvestrant in

- PIK3CA -Altered and PIK3CA -Wild-Type Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019.
257. Rugo HS, Mayer I, Conte P, Loibl S, Campone M, Juric D, et al. Abstract CT142: Prevalence of PIK3CA mutations in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor-2-negative advanced breast cancer from the SOLAR-1 trial . In 2019.
 258. Juric D, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo H, et al. Abstract GS3-08: Alpelisib + fulvestrant for advanced breast cancer: Subgroup analyses from the phase III SOLAR-1 trial. In 2019.
 259. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2–negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol.* 2021.
 260. Narayan P, Prowell TM, Gao JJ, Fernandes LL, Li E, Jiang X, et al. FDA Approval Summary: Alpelisib Plus Fulvestrant for Patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2021.
 261. FDA-approved test: theascreen PIK3CA RGQ PCR Kit (QIAGEN GmbH) Breast cancer (tissue and plasma)<https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-vitro-and-imaging-tools> (internet accessed 26-Apr-2021).
 262. Gymnopoulos M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007.
 263. Dogruluk T, Tsang YH, Espitia M, Chen F, Chen T, Chong Z, et al. Identification of variant-specific functions of PIK3CA by rapid phenotyping of rare mutations. *Cancer Res.* 2015.
 264. Turner S, Chia S, Kanakamedala H, Hsu WC, Park J, Chandiwana D, et al. Effectiveness of Alpelisib + Fulvestrant Compared with Real-World Standard Treatment Among Patients with HR+, HER2–, PIK3CA-Mutated Breast Cancer. *Oncologist.* 2021.
 265. <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-liquid-biopsy-ngs-companion-diagnostic-test-multiple-cancers-and-biomarkers> (internet accessed 26-Apr-2021).
 266. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/piqray-epar-public-assessment-report_en.pdf (internet accessed 26-Apr-2021).
 267. Rugo HS, Lerebours F, Ciruelos E, Drullinsky P, Ruiz-Borrego M, Neven P, et al. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer after a CDK4/6 inhibitor (BYLieve): one cohort of a phase 2, multicentre, open-label, non-comparative study. *Lancet Oncol.* 2021.
 268. Bachelot T. Everolimus plus tamoxifen versus tamoxifen alone in patients receiving previous aromatase inhibitors: The TAMRAD trial. In: P and T. 2011.
 269. Massarweh S, Romond E, Black EP, Van Meter E, Shelton B, Kadamyian-Melkumian V, et al. A phase II study of combined fulvestrant and everolimus in patients with metastatic estrogen receptor (ER)-positive breast cancer after aromatase inhibitor (AI) failure. *Breast Cancer Res Treat.* 2014.
 270. Hyman DM, Smyth LM, Donoghue MTA, Chang MT, Reichel JB, Bouvier N, et al. AKT inhibition in solid tumors with AKT1 mutations. *J Clin Oncol.* 2017.
 271. Jones RH, Casbard A, Carucci M, Cox C, Butler R, Alchami F, et al. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre,

- randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020.
272. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-olaparib-germline-brca-mutated-metastatic-breast-cancer> (internet accessed 27-Apr-2021).
 273. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-talazoparib-gbrcam-her2-negative-locally-advanced-or-metastatic-breast-cancer> (accessed 27-Apr-2021).
 274. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) European Medicines Agency (EMA). Public assessment report olaparib. Ema [Internet]. 2014;44(October):1–187. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/lynparza-epar-public-assessment-report_en.pdf
 275. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) European Medicines Agency (EMA). Public assessment report talazoparib. 2019;31(April):1–140. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/talzenna-epar-public-assessment-report_en.pdf
 276. Robson ME, Tung N, Conte P, Im SA, Senkus E, Xu B, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician’s choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2019.
 277. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee K-H, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation . *N Engl J Med.* 2018.
 278. Schoningher, S.F. & Blain SW. The Ongoing Search for Biomarkers of CDK4/6 Inhibitor Responsiveness in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2020;19:3–12.
 279. Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, Rivas MA, Cutts RJ, Garcia-Murillas I, et al. Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2016.
 280. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnicka-Worms H, et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell.* 1989.
 281. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade MA, Trachet E, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2004.
 282. Dean JL, Thangavel C, McClendon AK, Reed CA, Knudsen ES. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: Key mechanisms of response and failure. *Oncogene.* 2010.
 283. Li Z, Razavi P, Li Q, Toy W, Liu B, Ping C, et al. Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. *Cancer Cell.* 2018.
 284. Andre F, Su F, Solovieff N, Arteaga CL, Hortobagyi GN, Chia SKL, et al. Pooled ctDNA analysis of the MONALEESA (ML) phase III advanced breast cancer (ABC) trials. *J Clin Oncol.* 2020.
 285. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): A randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):25–35.
 286. Finn RS, Liu Y, Martin M, Rugo HS, Dieras V, Im S-A, et al. Abstract P2-09-10: Comprehensive gene expression biomarker analysis of CDK 4/6 and endocrine pathways from the PALOMA-2 study. Vol. 78, *Cancer Research.* 2018. P2-09 p.

287. DeMichele A, Clark AS, Tan KS, Heitjan DF, Gramlich K, Gallagher M, et al. CDK 4/6 Inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: Phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment. *Clin Cancer Res*. 2015.
288. O'leary B, Cutts RJ, Huang X, Hrebien S, Liu Y, André F, et al. Circulating Tumor DNA Markers for Early Progression on Fulvestrant with or without Palbociclib in ER+ Advanced Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(3):309–17.
289. Yang C, Li Z, Bhatt T, Dickler M, Giri D, Scaltriti M, et al. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene*. 2017.
290. Tolaney SM, Toi M, Neven P, Sohn J, Grischke E-M, Llombart-Cussac A, et al. Abstract 4458: Clinical significance of PIK3CA and ESR1 mutations in ctDNA and FFPE samples from the MONARCH 2 study of abemaciclib plus fulvestrant . In 2019.
291. Hortobagyi G, Stemmer S, Campone M, Sonke G, Arteaga C, Paluch-Shimon S, et al. Abstract PD4-06: First-line ribociclib + letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: Efficacy by baseline circulating tumor DNA alterations in MONALEESA-2. In 2018.
292. Turner NC, Liu Y, Zhu Z, Loi S, Colleoni M, Loibl S, et al. Cyclin E1 expression and palbociclib efficacy in previously treated hormone receptor-positive metastatic breast cancer. In: *Journal of Clinical Oncology*. 2019.
293. Arnedos M, Bayar MA, Cheaib B, Scott V, Bouakka I, Valent A, et al. Modulation of rb phosphorylation and antiproliferative response to palbociclib: The preoperative-palbociclib (POP) randomized clinical trial. *Ann Oncol*. 2018.
294. Ma CX, Gao F, Luo J, Northfelt DW, Goetz M, Forero A, et al. NeoPalAna: Neoadjuvant palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, and anastrozole for clinical stage 2 or 3 estrogen receptor–positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2017.
295. Pascual J, Gil-Gil M, Zielinski C, Hills M, Ruiz-Borrego M, Ciruelos EM, et al. CCNE1 mRNA and cyclin E1 protein expression as predictive biomarkers for efficacy of palbociclib plus fulvestrant versus capecitabine in the phase III PEARL study. *J Clin Oncol*. 2021.
296. Lu Y-S, Hurvitz SA, Su F, He W, Tripathy D, Campos Gomez S, et al. In-depth gene expression analysis of premenopausal patients with HR+/HER2– advanced breast cancer (ABC) treated with ribociclib-containing therapy in the Phase III MONALEESA-7 trial. *J Clin Oncol*. 2019.
297. Finn RS, Liu Y, Zhu Z, Martin M, Rugo HS, Dieras V, et al. Biomarker analyses of response to cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition and endocrine therapy in women with treatment-naïve metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2020 Jan 1 [cited 2020 Oct 7];26(1):110–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31527167/>
298. Chia S, Su F, Neven P, Im S-A, Petrakova K, Bianchi GV, et al. Abstract PD2-08: Gene expression analysis and association with treatment response in postmenopausal patients with hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer in the MONALEESA-3 study. In 2020.
299. Formisano L, Lu Y, Servetto A, Hanker AB, Jansen VM, Bauer JA, et al. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. *Nat Commun*. 2019.
300. Prat A, Cheang MCU, Galván P, Nuciforo P, Paré L, Adamo B, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncol*. 2016;
301. Bastien RR, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MT, Prat A, Munárriz B, Rowe L, et al. PAM50

- breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics*. 2012.
302. Finn R, Liu Y, Martin M, Rugo H, Dieras V, Im S-A, et al. Abstract P2-09-10: Comprehensive gene expression biomarker analysis of CDK 4/6 and endocrine pathways from the PALOMA-2 study. In 2018.
 303. Prat A, Chaudhury A, Solovieff N, Paré L, Martinez D, Chic N, et al. Correlative Biomarker Analysis of Intrinsic Subtypes and Efficacy Across the MONALEESA Phase III Studies. *J Clin Oncol*. 2021.
 304. Prat A, Chaudhury A, Solovieff N, Paré L, Martinez D, Chic N, et al. Abstract GS1-04: Correlative biomarker analysis of intrinsic subtypes and efficacy across the MONALEESA Phase III studies. In 2021.
 305. Jiang Y, Randolph S, English P, Kim S, Huang X, Press MF, et al. Cell Cycle Biomarker Analysis from the Paloma-1/ Trio 18 Palbociclib Plus Letrozole Phase II Study in Er-Positive/Her2-Negative Advanced Breast Cancer (Abc). *Ann Oncol*. 2014.
 306. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phas. *Lancet Oncol*. 2016.
 307. Rugo HS, Finn RS, Diéras V, Ettl J, Lipatov O, Joy AA, et al. Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2019.
 308. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018.
 309. Brandão M, Caparica R, Eiger D, de Azambuja E. Biomarkers of response and resistance to PI3K inhibitors in estrogen receptor-positive breast cancer patients and combination therapies involving PI3K inhibitors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019.
 310. Castel P, Scaltriti M. Mechanisms of Resistance to PI3K and AKT Inhibitors. In 2018.
 311. Toska E, Osmanbeyoglu HU, Castel P, Chan C, Hendrickson RC, Elkabets M, et al. PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D. *Science* (80-). 2017.
 312. Juric D, Andre F, Singer CF, Sohn J, Campone M, Loibl S, et al. Abstract P4-10-04: Clinical outcomes of alpelisib in hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer by next-generation sequencing-detected PIK3CA alteration status and phosphatase and tensin homolog los. In 2020.
 313. Ciruelos EM, Loibl S, Mayer IA, Campone M, Rugo HS, Arnedos M, et al. Abstract PD2-06: Clinical outcomes of alpelisib plus fulvestrant in hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer with PIK3CA alterations detected in plasma ctDNA by next-generation sequencing: Biomar. In 2021.
 314. Vasan N, Razavi P, Johnson JL, Shao H, Reznik E, Smith ML, et al. Double PIK3CA mutations in cis enhance PI3K α oncogene activation and sensitivity to PI3K α inhibitors in breast cancer. *Ann Oncol*. 2019.
 315. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005.

316. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*. 2008.
317. Johnston S, Pippen J, Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor - Positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009.
318. Li A, Schleicher SM, Andre F, Mitri ZI. Genomic Alteration in Metastatic Breast Cancer and Its Treatment. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2020.
319. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children . *N Engl J Med*. 2018;
320. Demetri GD, Paz-Ares L, Farago AF, Liu SV, Chawla SP, Tosi D, et al. Efficacy and safety of entrectinib in patients with NTRK fusion-positive (NTRK-fp) Tumors: Pooled analysis of STARTRK-2, STARTRK-1 and ALKA-372-001. *Ann Oncol*. 2018.
321. Harding JJ, Cleary JM, Quinn DI, Braña I, Moreno V, Borad MJ, et al. Targeting HER2 (ERBB2) mutation-positive advanced biliary tract cancers with neratinib: Results from the phase II SUMMIT ‘basket’ trial. . *J Clin Oncol*. 2021.
322. Schettini F, Barbaio P, Brasó-Maristany F, Galván P, Martínez D, Paré L, et al. Identification of cell surface targets for CAR-T cell therapies and antibody-drug conjugates in breast cancer. *ESMO open*. 2021.
323. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2012.
324. Immunomedics INC. Trodelvy (sacituzumab govitecan-hziy) [package insert]. *AccessdataFdaGov* [Internet]. 2020;1–20. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/761115s000lbl.pdf [truy cập 24/6/2021]
325. Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, et al. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021.
326. Yonemori K, Masuda N, Takahashi S, Kogawa T, Nakayama T, Yamamoto Y, et al. Single agent activity of U3-1402, a HER3-targeting antibody-drug conjugate, in HER3-overexpressing metastatic breast cancer: Updated results from a phase I/II trial. *Ann Oncol*. 2019.
327. Boni V, Burris III HA, Liu JF, Spira AI, Arkenau H-T, Fidler MJ, et al. CX-2009, a CD166-directed proboddy drug conjugate (PDC): Results from the first-in-human study in patients (Pts) with advanced cancer including breast cancer (BC). *J Clin Oncol*. 2020.
328. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, et al. Antitumor activity and safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-low–expressing advanced breast cancer: Results from a phase Ib study. *J Clin Oncol*. 2020.
329. Luen S, Virassamy B, Savas P, Salgado R, Loi S. The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast*. 2016.
330. Sobral-Leite M, Van de Vijver K, Michaut M, van der Linden R, Hooijer GKJ, Horlings HM, et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology*. 2018.
331. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA oncology*. 2016.

332. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018.
333. Goel S, Decristo MJ, Watt AC, Brinjones H, Sceneay J, Li BB, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature.* 2017.
334. Tolaney SM, Kabos P, Dickler MN, Gianni L, Jansen V, Lu Y, et al. Updated efficacy, safety, & PD-L1 status of patients with HR+, HER2- metastatic breast cancer administered abemaciclib plus pembrolizumab. *J Clin Oncol.* 2018.
335. Hurvitz SA, Martin M, Press MF, Chan D, Fernandez-Abad M, Petru E, et al. Potent cell-cycle inhibition and upregulation of immune response with abemaciclib and anastrozole in Neomonarch, phase II neoadjuvant study in HR+/HER2- Breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2020.
336. Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, Pusztai L, Swanton C. Intratumor heterogeneity: Seeing the wood for the trees. *Science Translational Medicine.* 2012.
337. Martelotto LG, Ng CKY, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Research.* 2014.
338. Mertins P, Mani DR, Ruggles K V., Gillette MA, Clauser KR, Wang P, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature.* 2016.
339. Odegaard JI, Vincent JJ, Mortimer S, Vowles J V., Ulrich BC, Banks KC, et al. Validation of a plasma-based comprehensive cancer genotyping assay utilizing orthogonal tissue- and plasma-based methodologies. *Clin Cancer Res.* 2018.
340. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeny LALM, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet [Internet].* 2017;101(1):50–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.05.013>
341. 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;4(11):1589–93.
342. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature.* 2017.
343. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Corrigendum: Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution (*Nature* (2017) 545 (446–451) DOI: 10.1038/nature22364). *Nature.* 2018.
344. FDA-NIH Biomarker Working Group. Understanding Prognostic versus Predictive Biomarkers. BEST (Biomarkers, EndpointS, other Tools) Resour. 2016.
345. Yavuz BR, Tsai C-J, Nussinov R, Tuncbag N. Discovery of Latent Drivers from Double Mutations in Pan-Cancer Data Reveal their Clinical Impact. *bioRxiv [Internet].* 2021;2021.04.02.438239. Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2021/04/04/2021.04.02.438239.abstract>
346. Supplee JG, Milan MSD, Lim LP, Potts KT, Sholl LM, Oxnard GR, et al. Sensitivity of next-generation sequencing assays detecting oncogenic fusions in plasma cell-free DNA. *Lung Cancer.* 2019.
347. Qiagen GmbH. Therascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit Instructions for Use (Handbook). 2019;(May):1–104. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190001C.pdf

- 348. Jacot W, Savage HM, Dent S, Cortés J, Im Y-H, Dieras VC, et al. 30 Mutation analysis of circulating tumour DNA from baseline and study discontinuation samples in SANDPIPER, a phase III study of tasisib or placebo with fulvestrant in oestrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, PIK3. *Ann Oncol*. 2020.
- 349. Dent S, Cortés J, Im YH, Diéras V, Harbeck N, Krop IE, et al. Phase III randomized study of tasisib or placebo with fulvestrant in estrogen receptor-positive, PIK3CA-mutant, HER2-negative, advanced breast cancer: the SANDPIPER trial. *Ann Oncol*. 2021.