

Biomarcadores en cáncer invasor de mama

ANGIE GABRIELA TENELANDA SANTILLÁN^{1,2}, ESTHER MORENO-MORENO¹⁻³,
IRENE CARRETERO-BARRIO¹⁻⁴, JOSÉ PALACIOS¹⁻⁴, BELÉN PÉREZ-MIES¹⁻⁴

¹Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. ²Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid. ³Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares. Alcalá de Henares, Madrid. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC). Instituto de Salud Carlos III. Madrid

RESUMEN

El mayor conocimiento en cáncer de mama ha llevado a la consolidación del uso de biomarcadores clásicos en patología mamaria, como los receptores hormonales o HER2, pero también al desarrollo y a la implementación de nuevos biomarcadores que pueden dar una nueva oportunidad terapéutica. Esto supone un reto para los laboratorios de la anatomía patológica, que deben adaptar sus procedimientos y formar a sus profesionales para ajustarse a las nuevas necesidades. En la era de la medicina de precisión, la determinación objetiva, reproducible y robusta de biomarcadores es crucial para el tratamiento personalizado de cada paciente. Este trabajo pretende ser una ayuda práctica para la realización e interpretación de los biomarcadores de mama tanto clásicos como emergentes.

PALABRAS CLAVE. Biomarcadores. Mama. Carcinoma.

ABSTRACT

The greater knowledge in breast cancer has led to the consolidation of the use of classic biomarkers such as hormone receptors or HER2, but also to the development and implementation of new biomarkers that represent a therapeutic opportunity. This represents a challenge for pathology laboratories that must adapt their procedures and train their professionals to adjust to the new needs. In the era of precision medicine, the objective, reproducible and robust determination of biomarkers is crucial for the personalized treatment of each patient. This work aims to be a practical aid for the realization and interpretation of both classical and emerging breast biomarkers.

KEYWORDS: Biomarkers. Breast. Carcinoma.

INTRODUCCIÓN

Se define como *biomarcador* aquel indicador medible de un proceso biológico normal, patológico o de una respuesta a un fármaco o a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pronósticos proporcionan información sobre la posible evolución clínica de una enfermedad desde el momento del diagnóstico, independientemente de los tratamientos recibidos, mientras que los biomarcadores predictivos son aquellos capaces de seleccionar pacientes que se beneficiarán de una terapia. Biomarcadores como los receptores hormonales o HER2 son pronósticos y predictores de respuesta simultáneamente (1).

En nuestra práctica clínica habitual, el tipo y el grado histológicos, el tamaño tumoral, los receptores hormonales (RH), HER2 y ki67, ayudados por los paneles de expresión multigén, principalmente 21 gene Oncotype DX[®] y 70 gene Mammaprint[®], definen la necesidad de tratamiento neoadyuvante o adyuvante del cáncer de mama en estadios iniciales (2,3).

Recientemente, derivados del creciente interés que suscita el papel del microambiente en la progresión tumoral, han surgido nuevos biomarcadores, como los linfocitos intratumorales (TIL) y la expresión de PD-L1. Adicionalmente, están explorando la carga mutacional tumoral (TMB) o la inestabilidad de microsatélites como predictores de respuesta a inmunoterapia (2).

En el contexto del cáncer de mama metastásico, se han desarrollado principalmente biomarcadores que predicen la respuesta a un tratamiento farmacológico, como la presencia de mutaciones en *PIK3CA*, en *BRCA* u otros genes implicados en la recombinación homóloga y los reordenamientos en *NTRK*. En ocasiones, se añaden estudios más extensos de secuenciación masiva con el objeto de buscar dianas terapéuticas.

El valor predictor de respuesta de los biomarcadores y su carácter agnóstico hace imprescindible que su determinación se realice en condiciones óptimas y bajo unas premisas indiscutibles de calidad que garanticen resultados reproducibles y robustos (4).

Este artículo tiene como objeto realizar una puesta al día práctica de los biomarcadores de más relevancia en el cáncer de mama.

BIOMARCADORES PRONÓSTICOS

TIPO HISTOLÓGICO

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea en la que el carcinoma invasor subtipo no especial es el tipo histológico más frecuente. El 20-25 % restante corresponde a subtipos especiales con características morfológicas definitorias. Los subtipos especiales pueden asociar mejor o peor pronóstico que un carcinoma no especial en su mismo estadio o tener diferente comportamiento clínico, como ocurre con el carcinoma lobulillar invasivo, que presentan recaídas más tardías y especial afinidad por la cavidad abdominal (3).

Como ejemplo, algunos subtipos, como el carcinoma tubular, el carcinoma cribiforme invasivo, el carcinoma metaplásico fibromatosis-like o adenoescamoso o el carcinoma de células altas con polaridad inversa, tienen mejor pronóstico que un carcinoma invasivo subtipo no especial, incluso aunque los tres últimos presenten frecuentemente un inmunofenotipo triple negativo (TN) (3,5). Por el contrario, otros subtipos especiales, como el carcinoma metaplásico fusocelular o con diferenciación mesenquimal heteróloga, se consideran más agresivos que un carcinoma invasivo subtipo no especial en el mismo estadio y presentan menores respuestas a un tratamiento de neoadyuvancia (3,6).

GRADO HISTOLÓGICO

Todos los carcinomas invasivos de mama deben gradarse, independientemente del subtipo histológico o de si la muestra es una biopsia diagnóstica o una pieza quirúrgica. La única situación que no requiere de grado histológico es el diagnóstico de carcinoma microinvasor, definido como invasión ≤ 1 mm (3,7). El grado histológico continúa siendo hoy en día uno de los biomarcadores de mayor trascendencia en el carcinoma invasor

de mama. Tiene valor pronóstico independiente del estadio del tumor, ya que algunos estudios han demostrado que predice mejor el pronóstico del tumor que el tamaño tumoral, parámetro que es más dependiente del tiempo de evolución de la neoplasia (7).

Para establecer el grado histológico (GH), la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda usar el sistema de gradación de Nottingham (Elston-Ellis), que es una modificación del diseñado por Patey-Scarff y Bloom-Richarson. En este se valoran de forma independiente tres parámetros: formación de ductos o glándulas, la atipia nuclear y el número de mitosis. Se establece un marcador independiente para cada parámetro de 1, 2 o 3 que posteriormente será sumado para establecer el marcador global (Fig. 1).

A la hora de valorar el componente glandular del tumor deben tenerse en cuenta solo formaciones glandulares reales e identificar células con polaridad en torno al lumen. Para establecer el grado nuclear debe localizarse la zona con la celularidad más atípica. El grado nuclear (GN) I es aquella célula que presenta un núcleo casi similar al de la célula de mama normal (Fig. 1B) y GN III y aquel que presenta un nucléolo prominente y tiene un tamaño al menos 4 veces el núcleo de la célula normal de mama (Fig. 1D). El GN II se empleará para casos intermedios (Fig. 1C). En cuanto a las mitosis, solo deben contabilizarse mitosis bien establecidas, sin considerar fenómenos de apoptosis ni de cariorrexis (8) (Fig. 1E). Las mitosis deben valorarse en la zona de mayor proliferación del tumor, que suele ser el frente expansivo. A la hora de establecer la puntuación hay que tener en cuenta el tamaño del campo del microscopio desde el que esté realizándose la observación, ya que los puntos de corte varían en función del campo (3,7). Con el auge de la patología digital, el conteo de mitosis podrá establecerse contabilizando mitosis por milímetro cuadrado, ya que puede no existir una equivalencia exacta de la imagen digital con el campo de un microscopio óptico (9).

Cuando se gradan un carcinoma de mama siguiendo estrictamente estas premisas, la reproducibilidad intra e interobservador aumenta considerablemente. Es de esperar que en un futuro próximo se desarrollen algoritmos de inteligencia artificial que mejoren la reproducibilidad del grado histológico y que predigan el pronóstico del tumor con base en este dato (7,9).

BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTORES DE RESPUESTA

CONSIDERACIONES PRÁCTICAS

Dado su carácter predictor de respuesta a tratamientos, debe determinarse la expresión de receptor de estrógenos, de progesterona y de HER2 en todos los carcinomas invasores de mama, en sus recidivas y en sus metástasis siempre y cuando sea posible obtener una biopsia.

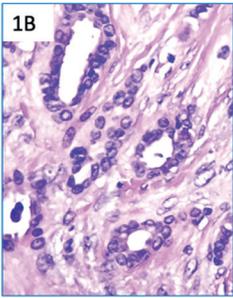
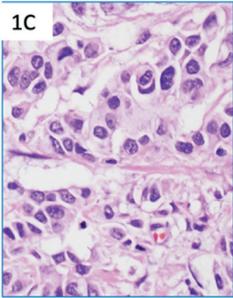
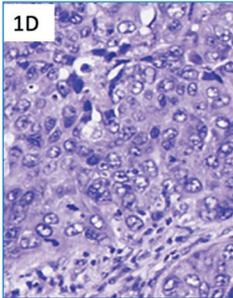
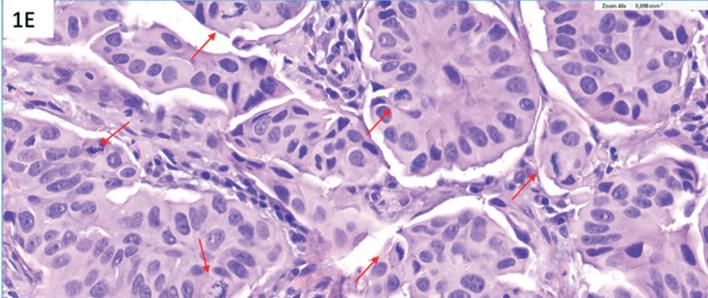
1A	Parámetros a valorar	Puntuación	1B	1C	1D
Formación glandular o tubular					
	> 75 %	1			
	10-75 %	2			
	< 10 %	3			
Pleomorfismo nuclear					
	Núcleos pequeños y uniformes, sin nucléolo	1			
	Moderado incremento y variabilidad nuclear, nucléolos perceptibles	2			
	Marcada atipia nuclear, variabilidad, nucléolos prominentes	3			
Contaje de mitosis					
	Según campo microscopio	1-3			
Grado histológico		Marcador global			
Grado histológico 1		3-5			
Grado histológico 2		6-7			
Grado histológico 3		8-9			

Fig. 1. Grado histológico. A. Parámetros implicados en el grado histológico según Nottingham (Elston-Ellis). B. Grado nuclear 1. C. Grado nuclear 2. D. Grado nuclear 3. E. Solo figuras de mitosis claras, como las señaladas con flechas, deben contabilizarse para realizar la gradación histológica.

El inmunofenotipo tumoral puede variar a lo largo de la evolución de la enfermedad hasta en un 27 % de los casos. La pérdida de RH se ha relacionado con una disminución de la supervivencia. Por el contrario, detectar positividad para RH o HER2 supone que el paciente puede recibir una terapia dirigida. La biopsia con aguja gruesa es válida para realizar las técnicas y se aconseja contar con al menos tres cilindros para mejorar la concordancia con la pieza de resección y detectar expresiones heterogéneas en algún biomarcador (10,11).

Debido su baja reproducibilidad, las guías americanas no incluyen ki67 dentro de los biomarcadores predictores de respuesta de obligada realización. Su determinación es opcional (3,4). Por el contrario, en Europa, la conferencia bianual de St. Gallen sí que reconoce su utilidad y lo incluye dentro de los biomarcadores a realizar en carcinomas invasores de mama (12).

En el caso del carcinoma intraductal, solo sería necesario realizar el receptor de estrógenos. La realización del receptor de progesterona es opcional (13).

En los tumores multicéntricos o multifocales se realizarán los biomarcadores al de mayor tamaño si presentan similar histología o a todos los focos si las histologías fuesen diferentes. En el caso de bilateralidad, se realizará a ambos focos. No es obligatorio repetir las determinaciones en la pieza de resección, salvo excepciones, como una escasa representación neoplásica en la biopsia, una histología diferente en la escisión o resultados no concluyentes previos, entre otras (3,4,10).

En el contexto del tratamiento neoadyuvante (TNA), las guías ASCO CAP no indican la obligatoriedad de repetir los biomarcadores tras TNA en casos de res-

puestas parciales. Sin embargo, algunas series detectan cambios en el inmunofenotipo tumoral que modificarían tratamientos en aproximadamente el 4 % de los casos (14,15). Por este motivo consideramos importante repetir los biomarcadores, especialmente si se observan respuestas menores a las esperadas para un subtipo tumoral o en carcinomas negativos para RH o HER2 pre-TNA.

Para garantizar un óptimo resultado de las técnicas es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones prácticas (Tabla I). El tiempo de isquemia fría, es decir, el tiempo que pasa desde que se extrae la biopsia hasta que se incluye en formol no debe superar una hora. Los tiempos de fijación en formaldehído tamponado al 10 % no deben ser inferiores a las 6 horas ni superiores a las 72 horas. La infra- o la sobrefijación del tejido puede dar lugar a falsos positivos o a falsos negativos en los resultados (4,16).

Los únicos sistemas para la determinación de biomarcadores son la inmunohistoquímica (IHQ) en el caso de receptores hormonales e IHQ e hibridación *in situ* (HIS) en el caso del HER2. Es obligatorio que cada laminilla de tejido contenga como mínimo un control externo positivo que permita comprobar que las técnicas se hayan realizado correctamente. El control interno del tejido mamario sería insuficiente, puesto que no siempre está presente y no es válido en el caso de HER2. Es además aconsejable utilizar anticuerpos con aprobación FDA o marca CE-IVD. En el caso de emplear anticuerpos desarrollados in house es necesario validarlos con un número suficiente de casos para garantizar un resultado óptimo. Esta validación deberá quedar registrada para futuras certificaciones o acreditaciones del laboratorio (4,13,17,18).

TABLA I.
CONSIDERACIONES PRÁCTICAS PARA DETERMINACIÓN ÓPTIMA DE BIOMARCADORES EN PATOLOGÍA MAMARIA

<i>Condiciones de fijación</i>	<p>Debe emplearse formol tamponado al 10 %, comercial</p> <p>Tiempo de isquemia fría (tiempo que transcurre desde la toma de la biopsia hasta que se introduce en formol) inferior a 1 hora</p> <p>Fijación en formol tamponado durante un mínimo de 6 horas y un máximo de 72</p> <p>Si hubiera desviación en cualquiera de los tiempos debe reflejarse en el informe, ya que puede afectar al resultado</p>
<i>Representatividad de la muestra</i>	<p>Según las guías ASCO-CAP la muestra debe ser representativa. Se aconsejan 3 cilindros en una biopsia por aguja gruesa</p> <p>Deben realizarse las determinaciones en todos los carcinomas invasivos, recidivas y metástasis. No es obligatorio repetir en piezas de resección, salvo excepciones</p> <p>Si hay más de un foco de carcinoma invasivo con similares histologías, se realizarán las determinaciones sobre el de mayor tamaño. Si fuesen de histologías diferentes o tumores bilaterales se realizarán a todos</p>
<i>Interpretación</i>	<p>Las determinaciones deben valorarse acorde a las últimas guías publicadas de interpretación</p> <p>Deben tenerse en cuenta las características histológicas del tumor para interpretar los biomarcadores y comprobar casos no concordantes (por ejemplo, grado histológico 1 con sobreexpresión de HER2, etc.)</p> <p>En el informe de biomarcadores debe constar el anticuerpo empleado, así como la plataforma donde se realiza</p>
<i>Calidad en las determinaciones</i>	<p>Utilizar anticuerpos con validación FDA o CE-IVD. Si se utilizan anticuerpos <i>in house</i> es necesario realizar validación y registrarla</p> <p>Cada biomarcador determinado por IHQ o HIS debe llevar, al menos, un control positivo en la misma laminilla</p> <p>Debe pertenecerse a un control externo de calidad</p> <p>Es aconsejable conocer la cifra de casos HER2 positivos del laboratorio propio, que debe estar en torno al 15 %</p> <p>Es aconsejable que el personal que realice e interprete las técnicas participe en cursos de formación continuada</p>

Es importante realizar una interpretación del resultado de cada biomarcador en consonancia con las características histológicas del carcinoma. Es extremadamente infrecuente que un carcinoma invasor GH1 tenga una tinción score 3+ de HER2 o que sea negativo para receptores hormonales. Los casos en los que se detecta discordancia entre la histología y el resultado de los biomarcadores deben revisarse para garantizar la fiabilidad del resultado (13,17).

A la hora de realizar el informe de biomarcadores predictivos de respuesta debe constar tanto el clon del anticuerpo empleado como su proveedor. Por último, es necesario pertenecer a un control externo de calidad que evalúe al laboratorio periódicamente para comprobar y garantizar la fiabilidad de los resultados (13,17).

RECEPTORES HORMONALES (RH)

La expresión de receptor de estrógenos (RE) es un factor de buen pronóstico y predictor de respuesta al tratamiento hormonal (19). Dada su escasa toxicidad

y el gran beneficio que aporta, el uso de terapia hormonal está indicado en todas las pacientes que presenten un carcinoma mamario con expresión de RH. Aproximadamente el 79-85 % de los carcinomas de mama expresan RE y este porcentaje es incluso más alto en pacientes posmenopáusicas. La mejora en los métodos de determinación, el uso de anticuerpos primarios más sensibles y la estandarización de los protocolos técnicos han ayudado a optimizar la detección de los casos positivos (13). La última guía ASCO-CAP, publicada en 2020, mantiene el punto de corte de positividad en el ≥ 1 % de células tumorales teñidas para RE, independientemente de la intensidad. Como novedad, hay que informar del resultado como “positivo de baja intensidad” cuando la expresión del receptor sea entre del 1-10 %. Aproximadamente el 2-3 % de los carcinomas de mamá presentarán un nivel de estrógenos ≤ 10 %. Este grupo de tumores es un reto, no solo por la reproducibilidad del resultado, sino también porque se desconoce el beneficio real de la terapia hormonal en este subgrupo de pacientes, que molecularmente están más relacionados con los tumores triple negativo que con los tumores luminales (13).

El receptor de progesterona (RP) se encuentra regulado por el receptor alfa de estrógenos (α -ER), de forma que la expresión de RP sugiere que el α -ER es funcionante. Entre el 60 y el 70 % de los casos de carcinoma invasivo de mama presentan expresión de RP y aproximadamente un 10 % de los casos expresarán únicamente RE (esto es un factor de mal pronóstico) (20,21). Una expresión de RP < 20 % también se ha relacionado con un peor pronóstico y se ha tenido en cuenta a la hora de realizar la subclasificación en tumores luminales A y B (21,22).

En la valoración de RH solo deben tenerse en cuenta las tinciones nucleares, independientemente de su intensidad. Para detectar tinciones débiles es necesario visualizar la preparación al menos a un aumento de 10x. En el informe debe constar tanto el porcentaje de células teñidas como la intensidad de tinción y, de forma opcional, podremos añadir sistemas de valoración de receptores hormonales, como el sistema Allred, en el que se combinan el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción para obtener una puntuación final (23).

El 70-85 % de los carcinomas invasivos de mama expresan receptor de andrógenos (RA). Este es un biomarcador cuya realización no es obligatoria, pero que está explorándose como nuevo agente terapéutico y pronóstico en el carcinoma de mama (24).

HER2

La sobreexpresión de HER2 o amplificación *ERBB2* comenzó determinándose en el cáncer de mama como un factor pronóstico desfavorable. Sin embargo, con el impulso de las terapias anti-HER2, HER2 ha pasado a ser un biomarcador predictor de respuesta a tratamientos dirigidos acompañados o no de quimioterapia. El mejor conocimiento de la señalización de HER2 ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos que mejoran sustancialmente el pronóstico de estas pacientes. Actualmente puede accionarse sobre HER2 mediante el doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab con fármacos conjugados que combinan trastuzumab con otras moléculas, como emtasine (TDM-1) o deruxtecum (T-DXd), o con inhibidores tirosina quinasa como lapatinib, rucatinib o neratinib, lo que ha revolucionado el pronóstico de las pacientes HER2 tanto en estadios iniciales como avanzados (25).

Derivadas de los problemas de reproducibilidad de resultados entre laboratorios, la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) y el Colegio Americano de Patólogos (CAP) crearon las guías de HER2, que incluyen indicaciones tanto para la parte técnica como para la interpretación de los resultados. Desde la publicación de las primeras guías en 2007 ha habido dos actualizaciones, la más reciente, en 2018 (17,26,27). De forma paralela, el colegio inglés de patólogos ha desarrollado

su propia guía UK-HER2, que es la guía más reciente, casi superponible a la guía americana (28).

La definición de caso positivo para HER2 ha ido variando ligeramente de una guía a otra. En la guía de 2007 había una especial preocupación por los casos falsos positivos, por lo que se puso el punto de corte para positividad en > 30 % de células con tinción completa e intensa de membrana. En el año 2013, con el objeto de disminuir los falsos negativos, se bajó a > 10 % el punto de corte para la positividad y además se usó una definición para HER2 2+ (tinción débil o moderada circunferencial que puede ser incompleta en > 10 % de las células) que obligaba a hacer HIS en la mayoría de las ocasiones. La guía de 2018 mantiene el punto de corte de positividad en el 10 %. Mover el punto de corte del 30 % al 10 % prácticamente no tiene repercusión porque la gran mayoría de los casos de HER2 tiene tinciones homogéneas y los falsos positivos se deben más a una sobreinterpretación de casos HER2 2+ no amplificadas, como casos HER2 positivos 3+ (29).

En cuanto al *score* 2+, la guía de 2018 los define como aquellos que presentan tinción completa de membrana débil a moderada en más del 10 % de las células, eliminando los términos contradictorios *circunferencial e incompleta*. Además, incluye en el *score* 2+ casos en los que la tinción es moderada o intensa pero incompleta, como podría suceder en el carcinoma micropapilar de mama. Esta tinción incompleta debe testarse por HIS porque es muy probable que amplifique (2,17) (véase el algoritmo completo de HER2 IHQ en la figura 2).

Aproximadamente el 5 % de los casos HER2 positivos presentarán tinciones heterogéneas. Observaremos áreas agrupadas de tinción 3+ en el seno de áreas negativas o con intensidades menores. En el caso de que supongan > 10 % de la muestra, el caso debe considerarse positivo, pero debe informarse como heterogéneo y reflejar el porcentaje de células positivas, así como el patrón de tinción de las restantes. Estos casos son candidatos a tratamientos diana, pero es esperable que realicen respuestas menores a los fármacos diana. Por otro lado, en el caso de que la zona positiva suponga < 10 % es conveniente hacerlo constar en el informe y repetir la determinación en la resección por si se detectara un mayor porcentaje de celularidad positiva y pudiera haber cambio en el estado de HER2 (2,30) (Fig. 3B).

La interpretación de la hibridación *in situ* (HIS) también ha evolucionado con el tiempo. Actualmente se recomienda usar sondas duales y divide los resultados en 5 grupos. El grupo 1 correspondería a los casos positivos (ratio $\geq 2,0$ y media de señales de HER2 $\geq 4,0$), el grupo 5, a los casos negativos (ratio < 2,0 y media de señales de HER2 < 4) y los grupos 2 (ratio $\geq 2,0$ y media de señales de HER2 < 4) y 4 (ratio < 2,0 y media de señales de HER2 entre $\geq 4,0$ y < 6,0) requieren evaluación conjunta con el resultado de inmunohistoquímica. Si su IHQ arroja una tinción 3+ serían casos positivos.

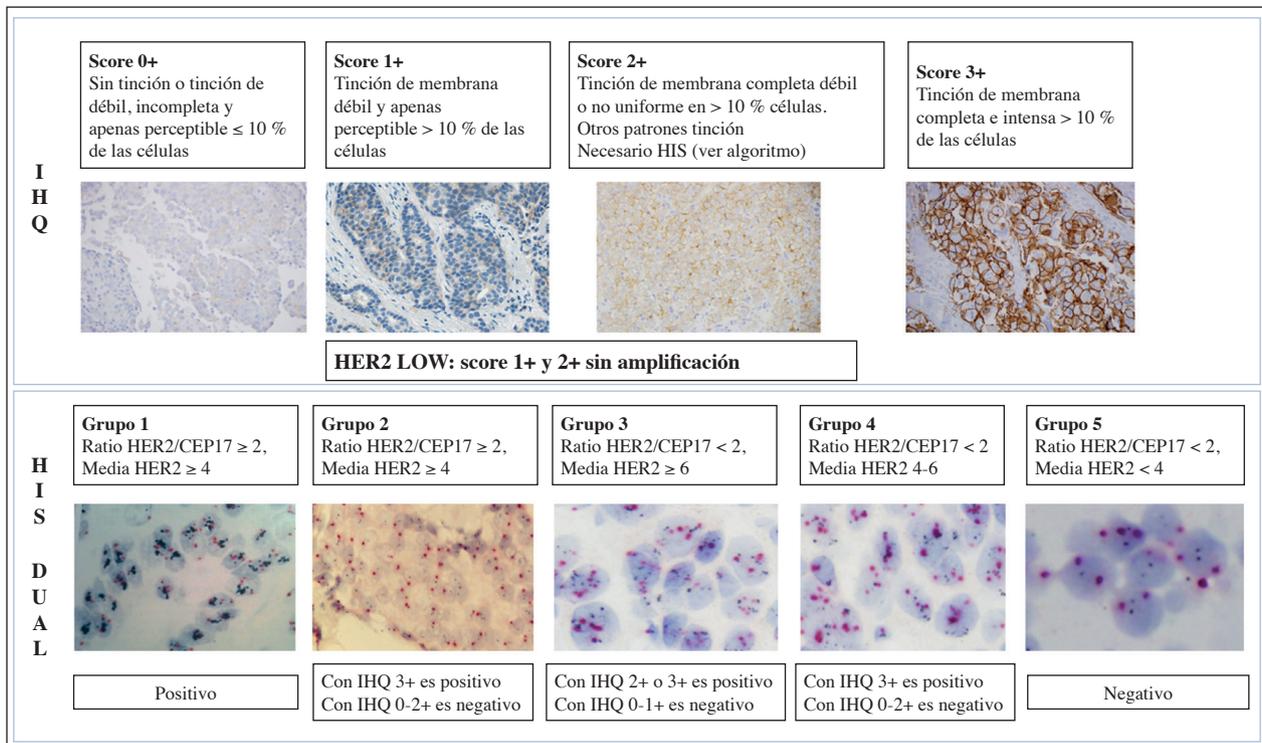


Fig. 2. Algoritmo de interpretación de HER2 según las guías ASCO-CAP 2018. Parte superior, algoritmo de IHQ. Parte inferior, algoritmo en el caso de comenzar la determinación mediante HIS.

Si la tinción es 0-2+ y un segundo observador obtiene el mismo resultado en el conteo de HIS, se consideran negativos con una nota explicativa: se aclara que no se ha demostrado beneficio de las terapias anti-HER2 en estas situaciones. El grupo 3 corresponde a casos con ratio < 2 y media de señales de HER2 ≥ 6 . Se consideran positivos si su tinción IHQ es de 2+ o 3+ y negativos si puntúan 0+ o 1+, con la misma nota explicativa expuesta anteriormente. Este nuevo algoritmo evita los antiguos resultados equívocos que dificultaban la toma de decisiones terapéuticas, pero obliga a testar en los grupos 2-4 con IHQ de forma refleja. En cualquier caso, la frecuencia de los grupos 2-4 dependerá en gran medida de si se hace HIS a todos los casos o se testa primero con IHQ y se hace HIS solo a los casos con tinción 2+ (2,17). Con las guías de 2018 han disminuido los resultados positivos, ya que los grupos 2 y 4 se consideran negativos (31). Véase el algoritmo completo de HER2 HIS en la figura 2.

A pesar de que la guía ASCO-CAP 2018 está orientada a evitar resultados equívocos, existen todavía situaciones ambiguas pendientes de resolver, como los casos del grupo 1, que presentan amplificación con bajo número de copias de HER2 (≥ 4 y < 6). Este grupo de baja amplificación presenta hasta en un 20 % resultados 0 y 1+ por IHQ y solo se detectarían si testamos directamente con HIS y serían negativos si comenzamos la valoración con IHQ, que es la práctica más habitual (32). Además, estos casos con baja amplificación suelen ser heterogéneos y poco reproducibles interobservador,

por lo que consideramos adecuado añadir un comentario en el informe cuando se obtenga este resultado (2).

Las nuevas versiones de los fármacos conjugados, como trastuzumab-duocarmizine (SYD-985) y trastuzumab-deruxtecan (T-DXd), han mostrado resultados muy favorables en ensayos clínicos que incluían pacientes con bajos niveles de expresión de HER2; es decir, casos con tinción 1+ o 2+ sin amplificación (33,34). Los tumores *low HER2* suponen aproximadamente el 55 % de los carcinomas de mama. La mayoría son RH positivo e incluyen distintos subtipos intrínsecos (35). Esto supone que la distinción entre 0+ y 1+, que ha sido hasta ahora irrelevante desde el punto de vista clínico, podría ser en un futuro próximo crítica para definir el tratamiento de una paciente con enfermedad avanzada. En este escenario sería necesario mejorar aún más la reproducibilidad de los resultados. La preanalítica es crítica para lograr tinciones robustas y reproducibles (2).

El futuro de HER2 pasa por la detección no solo de sobreexpresión y amplificación, sino también en la determinación de mutaciones accionables en ERBB2 presentes entre el 2 y el 5 % de los cánceres de mama (36). Estas mutaciones son más frecuentes en carcinomas lobulillares, especialmente en su variante pleomórfica, en las que se ha llegado a identificar hasta el 25 % de los casos (37). Por tanto, las mutaciones de ERBB2 deben estar incluidas en paneles de secuenciación orientados a buscar alteraciones accionables en cáncer de mama (36-38).

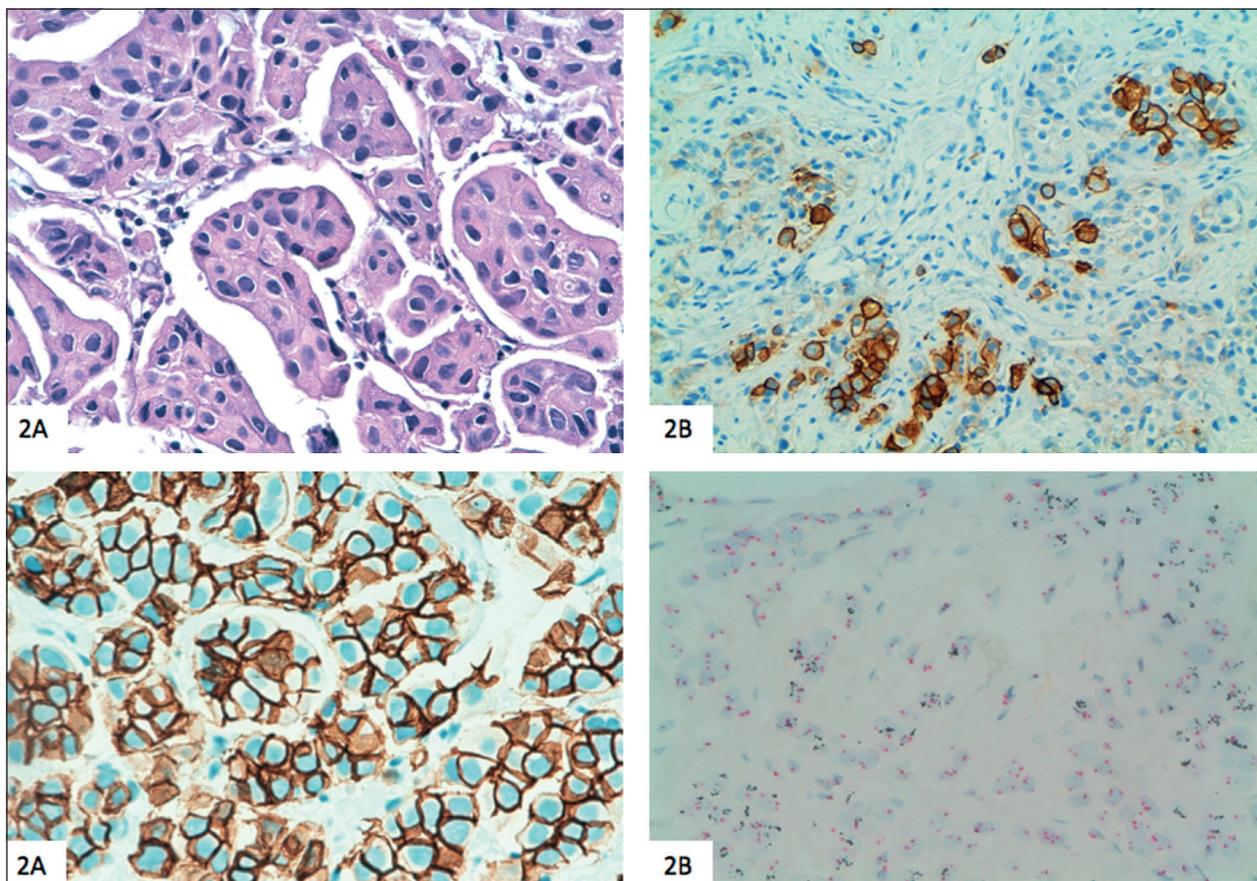


Fig. 3. A. H&E y HER2 de carcinoma invasivo con tinción intensa pero incompleta de HER2. Este caso debe categorizarse como 2+ y realizar HIS. B. Tinción heterogénea para HER2 IHQ e HIS con células amplificadas y células no amplificadas entremezcladas.

Ki67

Ki67 es el método más extendido para determinar el nivel de proliferación celular de una neoplasia mediante IHQ. Es una proteína nuclear que está presente en todas las fases del ciclo celular menos en G0, de forma que su expresión indica que la célula o bien está dividiéndose o bien va a empezar a hacerlo. Sin embargo, debido a su baja reproducibilidad inter- e intraobservador, se cuestiona su utilidad en el manejo clínico de los pacientes. Hay falta de consenso en el método que debe seguirse para su evaluación y en cáncer de mama no ha conseguido definirse un punto de corte que permita diferenciar baja y alta proliferación. Por estas razones, ni las guías ASCO ni NCCN (National Cancer Comprehensive Network) recomiendan su uso rutinario (39). Por el contrario, en las conferencias de St. Gallen de 2017 y de 2021 se coincidió en que puede usarse en tumores ER+/HER2- para distinguir entre tumores luminales A y B, aunque se refleja la preocupación por su falta de reproducibilidad (12,40). En este sentido, tanto la conferencia de St. Gallen de 2021 como el grupo de trabajo de ki67 (ki67 working group) consideran que solo deben tenerse en cuenta valores o muy bajos (< 5 %)

o muy altos (> 30 %) para tomar decisiones terapéuticas y aconsejan el uso de plataformas multigén en los casos intermedios (12,39).

Otros usos potenciales de ki67 incluyen la predicción de respuesta o de resistencia a quimioterapias y terapias endocrinas o la determinación dinámica de respuesta a tratamiento neoadyuvante, principalmente endocrino (39). También ki67 ha demostrado utilidad para predecir la respuesta a inhibidores del ciclo celular, de forma que a mayor índice de ki67 mejor respuesta utilizando terapias combinadas de CDK4/6i con tratamiento hormonal (41,42).

Para cuantificar ki67 deberemos tener en cuenta células teñidas de cualquier intensidad y evaluar el conjunto de la laminilla para dar un valor global de ki67, teniendo en cuenta zonas de más y menos proliferación. Utilizar guías de consenso mejora la reproducibilidad y recientemente se ha desarrollado una página web (<https://www.ki67inbreastcancerwg.org/>) que incluye una aplicación que ayuda a mejorar la interpretación de ki67 (39).

Por lo tanto, a pesar de la controversia que genera ki67, este biomarcador presenta un importante valor pronóstico y predictor de respuesta y posiblemente

el uso de métodos que estandaricen su valoración o el empleo de algoritmo de inteligencia artificial otorgarán mayor valor a este biomarcador, útil, pero cuestionado (43-45).

Linfocitos intratumorales (TIL)

En los últimos años la evaluación morfológica de los TIL en cáncer de mama se ha propuesto como nuevo biomarcador pronóstico y predictor de respuestas a tratamientos neoadyuvantes y de inmunoterapia, principalmente en tumores triples negativos y *HER2*. Cada incremento del 10 % en el número de TIL se ha asociado con una disminución de la mortalidad en cáncer de mama triple negativo (TN) y *HER2*. Incluso se ha propuesto que en tumores TN y *HER2* un porcentaje de TIL del 30 al 50 % o > 20 %, respectivamente, podría ser el punto de corte para desescalar los tratamientos quimioterápicos o anti-*HER2* (46,47). En cambio, el papel de los TIL en los tumores luminales no está aclarado e incluso parece ser un factor pronóstico adverso (48,49).

St. Gallen 2021 y la Sociedad Europea de Oncología médica (ESMO) reconocen la importancia pronóstica de los TIL, aunque desaconsejan su uso independiente para guiar opciones terapéuticas. La última edición del libro de la OMS de tumores mamarios también ensalza su importancia, por lo que consideramos que debe constar su valoración en los informes de anatomía patológica, especialmente ahora que está dándose tanto valor a la inmunoterapia (3,12,47).

Para su cuantificación debe utilizarse el método descrito por Salgado et al. (50), que ha sido recientemente actualizado con la creación de un espacio web (www.tilsinbreastcancer.org) en el que de forma gratuita puede accederse a imágenes comparativas para cuantificar mejor este biomarcador. Además, se redefine la cuantificación en metástasis tanto sobre órganos sólidos como sobre ganglio linfático (46). Véase la figura 4A con algoritmo de interpretación de TIL.

PD-L1, TMB y MSI

PD-1 es un regulador negativo del sistema inmune que se expresa en la superficie de células T, B, *natural killer*, monocitos y células dendríticas, pero que no está expresado en células T en reposo. PD-1 se une a dos ligandos, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC). La activación de PD-1 a través de su unión con PD-L1 y L2 regula negativamente el sistema inmunitario, lo que inhibe la función de los linfocitos T y reduce la actividad citotóxica y la capacidad de reconocer antígenos. Los tumores sólidos son capaces de activar esta vía de inhibición de respuesta inmune, lo que incrementa la expresión de PD-L1 en las células neoplásicas o linfoides (51).

Los ensayos clínicos aleatorios Impassion 130 (52) y Keynote-355 (53) han demostrado, respectivamente, el beneficio de fármacos anti PD1/PD-L1 (atezolizumab y pembrolizumab) sumados a quimioterapia en el tratamiento en primera línea de carcinoma de mama triple negativos metastásicos. En ambos casos, la determina-

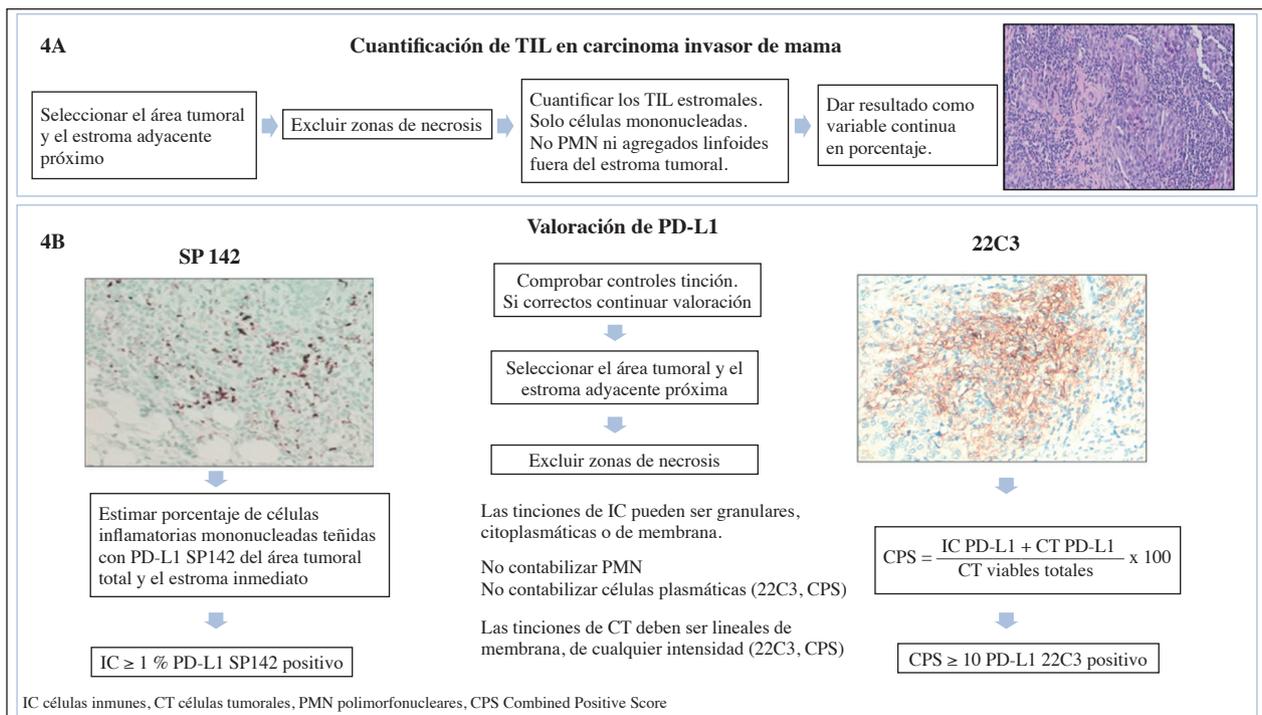


Fig. 4. A. Algoritmo de valoración de TIL según Salgado et al (2015). 4. Algoritmo de valoración de PD-L1 SP142 y PD-L1 22C3.

ción de PD-L1 resulta determinante para seleccionar las pacientes que se benefician de estos tratamientos. Sin embargo, el anticuerpo utilizado y la forma de valoración varían de un ensayo a otro.

Para el uso de atezolizumab usaremos el anticuerpo de PD-L1 SP-142 de Ventana (Tucson, Arizona) y valoraremos únicamente la celularidad inmune en el estroma del tumor y su inmediata vecindad. Se considerará positivo un inmune *cell score* (IC) ≥ 1 %. Las tinciones identificadas en las células inmunes podrán ser granulares, de membrana o citoplasmáticas (52).

Para el uso de pembrolizumab emplearemos el anticuerpo de PD-L1 22C3 (Agilent, Carpinteria, CA) y valoraremos el marcador positivo combinado (CPS) resultante de calcular el cociente entre la suma de las células tumorales e inmunes teñidas con PD-L1 y el número total de células tumorales viables multiplicado por 100. Se considera positivo cuando el valor de CPS es ≥ 10 . CPS es un número absoluto y no un porcentaje y se ha determinado que su valor máximo es de 100, aunque la cifra que arroje nuestro cálculo pudiera ser mayor. La tinción de las células neoplásicas ha de ser de membrana, circunferencial o incompleta de cualquier intensidad y la tinción de la celularidad inmune puede ser granular, citoplasmática o de membrana (53).

En ambos casos, los tipos de células inmunes que se incluyen en el conteo son linfocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos. Se excluyen los neutrófilos y las células plasmáticas. Las zonas de necrosis también deben excluirse de la valoración. Las técnicas deben realizarse con al menos un control positivo. La amígdala es el control ideal y es recomendable usar también un control negativo, tal y como recomiendan ambos fabricantes.

El hecho de que existan dos plataformas diferentes para la determinación de PD-L1 en función del fármaco a emplear supone un problema para los laboratorios de anatomía patológica, ya que es frecuente que solo se disponga de una de ellas. Por el momento, y a diferencia del pulmón, no existen estudios de armonización entre los anticuerpos y, además, su concordancia es muy baja (54,55).

La carga mutacional tumoral (*Tumoral Mutational Burden*, TMB) también se ha propuesto como posible biomarcador de respuesta a inmunoterapia, ya que mide la carga de antigenicidad que presenta una neoplasia y, por tanto, su inmunogenicidad. Se ha demostrado que un TMB ≥ 10 detectado con la plataforma Foundation One DX Assay predice la respuesta a pembrolizumab. Sin embargo, este punto de corte no tiene validez para otros fármacos, como atezolizumab, y los resultados de TMB de distintas plataformas no son superponibles, por lo que se necesitan estudios de armonización que permitan homogeneizar puntos de cortes y que garanticen la reproducibilidad de los resultados (56).

La inestabilidad de microsátélites (MSI) también se ha propuesto como biomarcador predictor de respuesta a inmunoterapia, pero en mama esta alteración es extremadamente infrecuente (0-2 %) (57).

PLATAFORMAS GENÓMICAS

En los últimos años, y debido a la mejoría del pronóstico del cáncer de mama en estadios precoces, ha aumentado el interés en seleccionar de una forma óptima a aquellas pacientes que van a beneficiarse de un tratamiento adyuvante con quimioterapia o con hormonoterapia exclusiva. En aquellas pacientes con cáncer de mama luminal en estadio precoz la supervivencia global a los 10 años es excelente, por lo que recibir quimioterapia en todos los casos produciría una alta tasa de sobretratamientos, lo que ocasiona efectos secundarios derivados de ellos. En este escenario cobran importancia las plataformas genómicas.

MAMMAPRINT®, AGENDIA

Se trata de una firma de 70 genes capaz de pronosticar la evolución de la enfermedad. Fue desarrollada en el año 2002 por el Instituto Nacional de Cáncer holandés y permite estratificar a las pacientes en alto y bajo riesgo de recaída. La firma de 70 genes ha sido validada para tumores sin afectación ganglionar, con afectación ganglionar y en pacientes posmenopáusicas, por lo que recibió la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU.) (58).

Posteriormente, con el ensayo prospectivo MINDACT (*Microarray in Node-Negative and 1 to 3 Positive Lymph Node Disease May Avoid Chemotherapy*) se obtuvo el nivel de evidencia IA. Los resultados de este estudio demuestran que muchas pacientes de cáncer de mamá en estadio temprano con hasta 3 ganglios afectados pueden evitar de forma segura la quimioterapia adyuvante a partir de un análisis de la biología de su enfermedad. Hasta un 46 % de las pacientes clasificadas de alto riesgo por el método clínico se clasificaban como de bajo riesgo mediante Mammaprint®(58).

ONCOTYPEDX®, PALEX

Calcula una puntuación de probabilidad de recaída (*Recurrence Score*, RS) con base en la expresión de 21 genes. Este marcador tiene un valor de 0-100 y se divide en tres grupos pronósticos: de bajo riesgo (RS < 18), intermedio (RS 18-30) y alto (RS > 30), con probabilidades de recaída del 7 %, del 14 % y del 30 %, respectivamente. El método ha sido validado en muestras refinadas y tiene valor predictivo para determinar el beneficio de recibir quimioterapia o no en pacientes con ganglios positivos y negativos (59). El ensayo TAILOR X aclaró en gran medida la necesidad de quimioterapia en el grupo intermedio y demostró que en pacientes < 50 años con RS de entre 16 y 25 había beneficio en el uso de quimioterapia, mientras que con > 50 años con RS < 25 no se obtenía be-

neficio (60). Más adelante, el ensayo RESPONDER demostró el beneficio de recibir quimioterapia en pacientes premenopáusicas con ganglios positivos y con RS < 25, mientras que las posmenopáusicas, no (61). Palex también ha desarrollado una prueba para determinar la necesidad de radioterapia en el carcinoma *in situ* de mama, aunque su uso clínico es muy limitado (62).

ENDOPREDICT®, MYRIAD GENETICS

Es un test pronóstico basado en el estudio de 12 genes, que estima el riesgo de recaída a los 10 años y, además, proporciona información sobre el beneficio de las terapias hormonales prolongadas más allá de los 5 años. EndoPredict combina el resultado del test con el tamaño tumoral y el estado ganglionar para obtener un marcador no solo teniendo en cuenta la biología del tumor, sino también la clínica (EPclin). Este marcador combinado puede utilizarse para tomar decisiones terapéuticas en pacientes posmenopáusicas con enfermedad luminal y ganglios negativos. No se aconseja su uso en mujeres con ganglios positivos (63).

PROSIGNA® (PAM50/RIESGO/ROR)

Usa la tecnología de Nanostring, incluyendo 50 genes, para determinar el riesgo de recaída a distancia en cáncer de mama luminal en pacientes posmenopáusicas con hasta tres ganglios positivos que reciben únicamente tratamiento hormonal. Combina el estudio de expresión de genes de proliferación con el estado ganglionar y el tamaño tumoral, definiendo una puntuación ROR (*Risk of Recurrence*). ROR se divide en tres: bajo (< 10 %), intermedio (10-20 %) y alto (> 20 %). Prosigna® también identifica subtipos intrínsecos. Ha sido validado prospectivamente en pacientes tratadas con hormonoterapia y ganglios tanto positivos como negativos (64).

NUEVOS BIOMARCADORES

PIK3CA

El ensayo clínico de fase III SOLAR-1 ha demostrado la eficacia del tratamiento combinado alpelisib-fulvestrant en el cáncer de mama luminal (HR+,HER2-), estadios avanzados que hayan recibido tratamiento endocrino previo. Por tanto, presentar mutación en *PIK3CA* pasa a ser condicionante para recibir este tratamiento (65). Para su determinación pueden utilizarse diferentes sistemas, como la secuenciación directa por Sanger, la técnica de *Real Time* PCR, mediante paneles de secuenciación masiva que incluyan este gen dentro de su panel, o mediante biopsia líquida estudiando

mutaciones en ADN de células tumorales circulantes. El estudio SOLAR empleó tecnología *PIK3CA Therascreen*, que permite detectar 11 mutaciones, las más frecuentes, pero no incluye todas las mutaciones existentes de *PIK3CA*. Lo que se desconoce es si alpelisib tiene acción sobre mutaciones fuera de ese panel (65-67).

BRCA1/BRCA2

Los inhibidores de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) olaparib y talazoparib están aprobados en Europa para el tratamiento del cáncer de mama en estadios avanzados en pacientes que presenten mutaciones germinales en *BRCA1* o *BRCA2*. También está testándose el uso de inhibidores de PARP en pacientes sin mutaciones germinales en estos genes, lo que abre la posibilidad de su uso en pacientes con mutaciones somáticas de *BRCA* o en otros genes implicados en la recombinación homóloga. Por este motivo, es muy probable que tenga que testarse este biomarcador en tejido parafinado en un futuro próximo (68).

BIOPSIA LÍQUIDA (ADN CIRCULANTE Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES)

La biopsia líquida se basa en que las neoplasias liberan a la sangre células (*Circulating Tumoral Cell, CTC*) y componentes de estas células (ctDNA, RNA, exosomas, etc.). Estos componentes pueden utilizarse gracias a la mejora de las técnicas moleculares, que pueden detectar y amplificar cantidades mínimas de material genético. Las más empleadas son las CTC y ctDNA, lo que permite de una forma no invasiva caracterizar molecular y evolutivamente una neoplasia mamaria avanzada y buscar mutaciones diana o mutaciones de resistencias a tratamientos o incluso predecir su recaída precozmente. Actualmente hay validación FDA para la detección de mutaciones en *PIK3CA* y *ERS1* en biopsia líquida. Su aplicación es hoy en día experimental, pero ofrece un futuro muy prometedor (69).

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Las técnicas de NGS permiten localizar la gran mayoría de alteraciones genómicas detectadas en cáncer. Sin embargo, el uso a nivel asistencial de la NGS en cáncer de mama queda limitado a la búsqueda de mutaciones accionables en el caso de estadios avanzados. De las 40 alteraciones *driver* más frecuentes en cáncer de mama, solo la amplificación de *HER2*, las mutaciones germinales de *BRCA1/2* y las mutaciones de *PIK3CA* tienen nivel de evidencia IA y el resto, como las fusiones de *NTRK*, MSI, mutaciones en *ERS1*, mutaciones en *ERBB2* o *AKT1*, tienen niveles de evidencia inferiores como dianas moleculares (70).

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

CORRESPONDENCIA:

Belén Pérez-Mies
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Ctra. de Colmenar, km 9,100
28034 Madrid
e-mail: bperezmi@salud.madrid.org

BIBLIOGRAFÍA

- FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other tools). Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (USA); 2016.
- Najjar S, Allison KH. Updates on breast biomarkers. *Virchows Arch* 2022;480(1):163-76.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Breast tumours. 5th ed. Geneva: OMS; 2019.
- Jorns JM. Breast Cancer Biomarkers: Challenges in Routine Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2/neu Evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 2019;143(12):1444-9.
- Schnitt SJ, Fend F, Decker T. Breast carcinomas of low malignant potential. *Virchows Arch* 2022;480(1):5-19.
- Kim J, Kim JY, Lee HB, Lee YJ, Seong MK, Paik N, et al. Characteristics and prognosis of 17 special histologic subtypes of invasive breast cancers according to World Health Organization classification: comparative analysis to invasive carcinoma of no special type. *Breast Cancer Res Treat* 2020;184(2):527-42.
- Van Dooijeweert C, van Diest PJ, Ellis IO. Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. *Virchows Arch* 2022;480:33-43.
- Lashen A, Ibrahim A, Katayama A, Ball G, Mihai R, Toss M, et al. Visual assessment of mitotic figures in breast cancer: a comparative study between light microscopy and whole slide images. *Histopathology* 2021;79(6):913-25.
- Veta M, Heng YJ, Stathonikos N, Bejnordi BE, Beca F, Wollmann T, et al. Predicting breast tumor proliferation from whole-slide images: The TUPAC16 challenge. *Med Image Anal* 2019;54:111-21.
- Grinda T, Joyon N, Lusque A, Lefèvre S, Arnould L, Penault-Llorca F, et al. Phenotypic discordance between primary and metastatic breast cancer in the large-scale real-life multicenter French ESME cohort. *NPJ Breast Cancer* 2021;7(1):41.
- Sun T, Zhang H, Gao W, Yang Q. The appropriate number of preoperative core needle biopsy specimens for analysis in breast cancer. *Medicine* 2021;100(14):e25400.
- Thomssen C, Balic M, Harbeck N, Gnant M. St. Gallen/Vienna 2021: A Brief Summary of the Consensus Discussion on Customizing Therapies for Women with Early Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2021;16(2):135-43.
- Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* 2020;144(5):545-63.
- Xian Z, Quinones AK, Tozbikian G, Zynger DL. Breast cancer biomarkers before and after neoadjuvant chemotherapy: does repeat testing impact therapeutic management? *Hum Pathol* 2017;62:215-21.
- Coiro S, Gasparini E, Falco G, Santandrea G, Foroni M, Besutti G, et al. Biomarkers Changes after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Seven-Year Single Institution Experience. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(12):2249.
- Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10(2):183-6.
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* 2018;36(20):2105-22.
- Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(6):930-5.
- Manni A, Arafah B, Pearson OH. Estrogen and progesterone receptors in the prediction of response of breast cancer to endocrine therapy. *Cancer* 1980;46(Suppl.12):2838-41.
- Braun L, Mietzsch F, Seibold P, Schneeweiss A, Schirmacher P, Chang-Claude J, et al. Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss. *Mod Pathol* 2013;26(9):1161-71.
- 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;31(2):203-9.
- Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Coleoni M, Dellapasqua S, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 2014;16(3):R65.
- Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol* 2010;23(Suppl.2):S52-9.
- Jahan N, Jones C, Rahman RL. Androgen receptor expression in breast cancer: Implications on prognosis and treatment, a brief review. *Mol Cell Endocrinol* 2021;531:111324.
- Pernas S, Tolaney SM. Management of Early-Stage Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *JCO Oncol Pract* 2021;17(6):320-30.
- Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(1):18-43.
- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3997-4013.
- Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JMS, Ibrahim M, Starczynski J, Carder PJ, et al. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol* 2015;68(2):93-9.
- Grimm EV, Allison KH, Hicks DG, Swenson KK, Krueger J, Yaziji H, et al. HER2 Testing: Insights from Pathologists' Perspective on Technically Challenging HER2 FISH Cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2021;29(9):635-42.
- Filho OM, Viale G, Stein S, Trippa L, Yardley DA, Mayer IA, et al. Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab. *Cancer Discov* 2021;11(10):2474-87.
- Kim MC, Kang SH, Choi JE, Bae YK. Impact of the Updated Guidelines on Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Testing in Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2020;23(5):484-97.
- Ballard M, Jalikis F, Krings G, Schmidt RA, Chen YY, Rendi MH, et al. "Non-classical" HER2 FISH results in breast cancer: a multi-institutional study. *Mod Pathol* 2017;30(2):227-35.
- Cortés J, Kim SB, Chung WP, Im SA, Park YH, Hegg R, et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med* 2022;386(12):1143-54.
- Banerji U, van Herpen CML, Saura C, Thistlethwaite F, Lord S, Moreno V, et al. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase I dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol* 2019;20(8):1124-35.

35. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2021;7(1):1.
36. Ross JS, Gay LM, Wang K, Ali SM, Chumsri S, Elvin JA, et al. Nonamplification ERBB2 genomic alterations in 5605 cases of recurrent and metastatic breast cancer: An emerging opportunity for anti-HER2 targeted therapies. *Cancer* 2016;122(17):2654-62.
37. Rosa-Rosa JM, Caniego-Casas T, Leskela S, Cristóbal E, González-Martínez S, Moreno-Moreno E, et al. High Frequency of ERBB2 Activating Mutations in Invasive Lobular Breast Carcinoma with Pleomorphic Features. *Cancers (Basel)* 2019;11(1):E74.
38. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov* 2013;3(2):224-37.
39. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2021;113(7):808-19.
40. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol* 2017;28(8):1700-12.
41. Palleschi M, Maltoni R, Ravaoli S, Vaghegini A, Mannozi F, Fanini F, et al. Ki67 and PR in Patients Treated with CDK4/6 Inhibitors: A Real-World Experience. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(8):E573.
42. Shao X, Zheng Y, Cao W, Shen X, Li G, Chen J, et al. Ki67 and progesterone receptor status predicts sensitivity to palbociclib: a real-world study. *Ann Transl Med* 2021;9(8):707.
43. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, Lopez-Knowles E, Filipits M, Dubsy P, et al. Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *J Clin Oncol* 2015;33(8):916-22.
44. Polley MYC, Leung SCY, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(24):1897-906.
45. Acs B, Pelekanou V, Bai Y, Martinez-Morilla S, Toki M, Leung SCY, et al. Ki67 reproducibility using digital image analysis: an inter-platform and inter-operator study. *Lab Invest* 2019;99(1):107-17.
46. Loi S, Michiels S, Adams S, Loibl S, Budczies J, Denkert C, et al. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. *Ann Oncol* 2021;32(10):1236-44.
47. Laenkholm AV, Callagy G, Balancin M, Bartlett JMS, Sotiriou C, Marchio C, et al. Incorporation of TILs in daily breast cancer care: how much evidence can we bear? *Virchows Arch* 2022;480(1):147-62.
48. Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, Viale G, Viale G, Curigliano G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2-breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2020;183(2):347-54.
49. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Hepner 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;19(1):40-50.
50. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruner G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015;26(2):259-71.
51. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704.
52. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(1):44-59.
53. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusuf MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* 2020;396(10265):1817-28.
54. Rugo HS, Loi S, Adams S, Schmid P, Schneeweiss A, Barrios CH, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assay Comparison in Atezolizumab plus nab-Paclitaxel-Treated Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2021;djab108.
55. Pang JMB, Castles B, Byrne DJ, Button P, Hendry S, Lakhani SR, et al. SP142 PD-L1 Scoring Shows High Interobserver and Intraobserver Agreement in Triple-negative Breast Carcinoma but Overall Low Percentage Agreement with Other PD-L1 Clones SP263 and 22C3. *Am J Surg Pathol* 2021;45(8):1108-17.
56. Ravaoli S, Limarzi F, Tumedei MM, Palleschi M, Maltoni R, Bravaccini S. Are we ready to use TMB in breast cancer clinical practice? *Cancer Immunol Immunother* 2020;69(10):1943-5.
57. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* 2016;22(4):813-20.
58. Ovcáricek T, Takac I, Matos E. Multigene expression signatures in early hormone receptor positive HER 2 negative breast cancer. *Radiol Oncol* 2019;53(3):285-92.
59. Syed YY. Oncotype DX Breast Recurrence Score®: A Review of its Use in Early-Stage Breast Cancer. *Mol Diagn Ther* 2020;24(5):621-32.
60. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018;379(2):111-21.
61. Kalinsky K, Barlow WE, Gralow JR, Meric-Bernstam F, Albain KS, Hayes DF, et al. 21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2021;385(25):2336-47.
62. Solin LJ, Gray R, Baehner FL, Butler SM, Hughes LL, Yoshizawa C, et al. A Multigene Expression Assay to Predict Local Recurrence Risk for Ductal Carcinoma in situ of the Breast. *JNCI* 2013;105(10):701-10.
63. Buus R, Sestak I, Kronenwett R, Denkert C, Dubsy P, Krapmann K, et al. Comparison of EndoPredict and EPclin With Oncotype DX Recurrence Score for Prediction of Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(11).
64. Hequet D, Harrissart G, Krief D, Mauny L, Lerebours F, Menet E, et al. Prosigna test in breast cancer: real-life experience. *Breast Cancer Res Treat* 2021;188(1):141-7.
65. 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;32(2):208-17.
66. Fusco N, Malapelle U, Fassan M, Marchiò C, Buglioni S, Zupo S, et al. PIK3CA Mutations as a Molecular Target for Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Front Oncol* 2021;11:644737.
67. Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2020;22(1):45.
68. Cortesi L, Rugo HS, Jackisch C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Target Oncol* 2021;16(3):255-82.
69. Tay TKY, Tan PH. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review. *Arch Pathol Lab Med* 2021;145(6):678-86.
70. Condorelli R, Mosele F, Verret B, Bachelot T, Bedard PL, Cortes J, et al. Genomic alterations in breast cancer: level of evidence for actionability according to ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol* 2019;30(3):365-73.