



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

TESIS
DOCTORAL

EVALUACIÓN
DEL PERFIL HORMONAL
EN PACIENTES CON CÁNCER
DE MAMA PRECOZ SOMETIDAS
A HORMONOTERAPIA
ADYUVANTE

Meritxell Bellet Ezquerra

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

EVALUACIÓN DEL PERFIL HORMONAL
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA PRECOZ
SOMETIDAS A HORMONOTERAPIA ADYUVANTE

Tesi per a optar al grau de doctor
Meritxell Bellet Ezquerra

Director de la Tesis

Dr. Javier Cortés Castán

Co-directora de la Tesis

Dra. M^a Isabel Ruiz Camps

Tutor de Tesis

Dr Josep Manuel Baselga Torres

Programa de doctorat de Medicina
Facultat de Medicina
Barcelona, setembre de 2016

*Para investigar la verdad
es preciso dudar,
en cuanto sea posible,
de todas las cosas.*

René Descartes (1596 - 1650)

*Als meus pares,
Ricard i Maria Pilar
que m'heu donat la vida;
i als meus fills,
Júlia i Martí,
que me la continueu donant cada dia*

AGRAÏMENTS

Vull expressar aquí el meu agraïment a totes les persones que, durant la meua vida professional, m'heu ensenyat, guiat, estimulat, corregit i animat.

Sou Caps de Servei i Caps de Secció, passats o presents, i Adjunts del Vall d'Hebron o d'altres hospitals. Sou companys molt estimats de la Unitat de Càncer de Mama, nous o veterans que ja heu seguit altres camins. Sou també Residents de moltes generacions. I Investigadors Bàsics. I oncòlegs que, malauradament, ja no esteu entre nosaltres. Tots m'heu acompanyat o m'acompanyeu en el dia a dia de ser Oncòleg Mèdic. I sou molts, perquè ja començo a complir uns quants "dies" en aquesta tasca.

Vull agrair la feina dels que formen part del Comitè de Patologia Mamària, Cirurgians, Ginecòlegs, Patòlegs i Radiòlegs, els d'abans i els d'ara, pel vostre suport i dedicació. I per suposat, la d'Infermeres, Secretàries, Farmacèutiques, Auxiliars i Administratius, sense els quals la nostra tasca no seria possible. I vull expressar també el meu afecte pels companys del Comitè de Psiquiatria, dels qui valoro molt el seu treball, potser poc visible, però sempre necessari.

És de justícia recordar aquí els que heu col·laborat per a dur a bon port aquest treball que presento: Investigadors, Coordinadores, personal de l'Oficina de SOLTI, de l'IBCSG, de Pfizer, del departament estadístic del Dana Farber, del Laboratori d'Hormones de l'Hospital Vall d'Hebron i del Laboratori d'inVentiv Health Technology; i per suposat, Tutor i Directors de tesi.

No vull donar noms, no per a no deixar-me ningú -que també-, sino perquè el meu desig és trobar una estona per agrair-vos-ho un a un, personalment.

I igualment deixo per a un altre moment l'agraïment íntim, però no menys profund, que sento pels meus familiars més propers i pels meus amics i amigues de l'àmbit no professional.

Finalment, vull tenir un record agrait per a les pacients i per a les seves famílies, per haver participat generosament, sovint amb entusiasme, en aquest projecte.

A tots vosaltres, al que sou i als qui vau ser, dedico aquesta tesi.

SUMARIO DE LAS ABREVIATURAS UTILIZADAS

5-FU: 5-fluoruracilo

3 β -OH-SDH: 3 β -Hidroxiesteroide dehidrogenasa

16 α -OHasa: 16 α -Hydroxilasa

A: anastrozol

AC: doxorrubicina convencional + ciclofosfamida

ACO: anticonceptivos orales

ACOSOG: *American College of Surgeons Oncology Group*

ACTH: hormona adrenocorticotropa, del inglés *adrenocorticotrop hormone*

ADN: ácido desoxirribonucleico

AF-1: *Activating Factor 1*

AF-2: *Activating Factor 2*

aGnRH: análogo de la GnRH

AIB1: *amplified in breast 1*

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

AQI: amenorrea quimioinducida

ASCO: *American Society of Clinical Oncology*

AST: aspartato aminotransferase

AUC: área bajo la curva, del inglés *Area Under Curve*

BAG: biopsia con aguja gruesa

BIG: Breast International Group

BRCA1: *gen breast cancer 1*

BRCA2: *gen breast cancer 2*

BSGC: biopsia selectiva de ganglio centinela

C: ciclofosfamida

CMM: cancer de mama metastásico

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CDIS: carcinoma ductal *in situ*

CEA: antígeno carcinoembrionario

CLI: carcinoma lobulillar infiltrante

CLIS: carcinoma lobulillar in situ

CM: cáncer de mama

Cmax: concentración máxima

CMF: ciclofosfamida + metrotexate + 5-fluoruracilo

CMI: cadena mamaria interna

CMM: cáncer de mama metastásico

COMT: catecol O-metil transferasa

CYP2D6: citocromo 2D6

CTCEA: *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

CYP: citocromo P450

CYP19

D: docetaxel

DAC: docetaxel + doxorrubicina + ciclofosfamida

DHEA: dehidroepiandrosterona

DC: docetaxel + ciclofosfamida

DMO: densitometría ósea

E1: estrona

E1S: sulfato de estrona

E2: estradiol

E3: estriol

EBCTCG: *Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group*

EC: epirrubicina + ciclofosfamida

ECLIA: *electrochemiluminescence immunoassay*

ECOG: *Eastern Cooperative Oncologic Group*

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

EEUU: Estados Unidos

e.j.: por ejemplo

ERE: elemento de respuesta a estrógenos

ERM: exceso de riesgo de mortalidad

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

ESR1: *estrogen Receptor 1*

ESR2: *estrogen Receptor 2*

EXE: Exemestano

et al: y colaboradores

FAC: 5-fluoruracilo + doxorrubicina + ciclofosfamida

FDA: *Food and Drug Administration*

FEC: 5-fluoruracilo + epirrubicina + ciclofosfamida

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia

FSH: hormona folículoestimulante, del inglés *Follicle-Stimulating Hormone*

GC: ganglio centinela

GC-MS/MS: espectrometría de masas precedida de fase de cromatografía gaseosa, del inglés *Gas Chromatography/ tandem mass spectrometry*

G-CSF: granulocyte colony stimulating factor

GEICAM: Grupo Español para la Investigación del Cáncer de Mama

GH: grado histológico

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina, del inglés *Gonadotrophin Releasing Hormone*

GPCR: *G protein-coupled receptor*

GPER: *G protein-coupled estrogen receptor*

hCG: gonadotropina coriónica, del inglés *human chorionic gonadotropin*

HSP-90: *Heat Shock Protein 90*

HDL: lipoproteína de alta densidad, del inglés *High Density Lipoprotein*

HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HPLC: *high-performance liquid chromatography*

HR: *hazard ratio*

HSD17B: 17-hidroxiesteroide dehidrogenasa

HT: hormonoterapia

HSP-90: *Heat Shock Protein 90*

IA: inhibidor de la aromatasa

IANE: inhibidor de la aromatase no esteroideo

IBCSG: *International Breast Cancer Study Group*

IQR: *Interquartile range*

ISRS: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

i.m: vía intramuscular

i.v: vía intravenosa

L: letrozol

LC-MS/MS: espectrometria de masas precedida de fase de cromatografía líquida, del inglés *Liquid Chromatography/ tandem mass spectrometry*

LLQ: *low limit of quantification*

LH: hormona luteinizante, del inglés *Luteinizing Hormone*

IC: intervalo de confianza

IHQ: inmunohistoquímica

IGF-1: *insulin-like growth factor-1*

IGF1R: *insulin-like growth factor-1 receptor*

IMC: índice de masa corporal

ISH: hibridación in situ

M1: metástasis

MAPK/ERK: *mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase*

MEIA: *microparticle enzym immunoassay*

MSTFA: *N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide.*

N: *node*

NABCG: *North American Breast Cancer Group*

NCOR1: *Nuclear receptor co-repressor 1*

NIH: *National Institute of Health*

NOS: *No Otherwise Specified*

NSABP: *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*

PAX2: *Paired box gene 2*

PI3K/AKT: *phosphoinositide 3-kinase / Protein kinase B*

OH: grupo hidroxilo

OR: *Odds Ratio*

OSNA: *one-step nucleic acid amplification*

OMS: Organización Mundial de la salud

P: paclitaxel

PAAF: punción aspiración por aguja fina

PAX2: *Paired box gene 2*

PFB: pentafluorobenzoilclorido

PEPI: *Postoperative Endocrine Prognostic Index*

PET: tomografía por emisión de positrones

QT: quimioterapia

RCp: respuesta completa patológica

RE: receptor de estrógeno

RECIST: *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*

RH: receptor hormonal / receptores hormonales

RIA: *radioimmunoassay*

RMN: resonancia magnética nuclear

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

ROF: recuperación de la función ovárica

ROS: especies reactivas de oxígeno **Trip:** triptorelina

RP: receptor de progesterona

RR: riesgo relativo

RT: radioterapia

RTK: receptor con actividad tirosínquinasa

s.c: vía subcutánea

SECM: supervivencia específica de cáncer de mama

SEM: *standard error of mean*

SERM: modulador selectivo del receptor de estrógeno, del inglés *Selective Estrogen Receptor Modulator*

SMRT: *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*

SG: supervivencia global

SGe: supervivencia global esperada

SGo: supervivencia global observada

SLP: supervivencia libre de progresión

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SLED: supervivencia libre de enfermedad a distancia

SOLTI: Grupo cooperativo de Cáncer de Mama. Creado inicialmente como grupo de transplate (SOlid Tumor Intensification)

SWOG: Southwest Oncology Group

SHBG: globulina transportadora de hormonas sexuales del inglés *Sex Hormone Binding Globulin*

SOF: supresión de la función ovárica

SULTs: Sulfotransferasas

T: tamoxifeno

TBA: *Total Body Aromatization*

TCH: docetaxel + ciclofosfamida +trastuzuma

TEP: tromboembolismo pulmonar

TGF α : *Transforming Growth Factor α ,*

THA: tratamiento hormonal adyuvante

THS: terapia hormonal substitutiva

TR: tasa de respuestas

TSH: hormona estimulante del tiroides, del inglés *thyroid-stimulating hormone*

TVP: trombosis venosa profunda

TRZ: trastuzumab

TNM: sistema de estadiaje tumoral (tumor, ganglios del inglés *nodes*, metástasis)

TTP: tiempo libre de progresión, del inglés *time to progression*

UGTs: Glucuronosil transferasas

vs: *versus*

Nota de la autora

El contenido de la presente tesis ha sido ya publicado (Bellet M *et al.* J Clin Oncol. 2016 May 10; 34(14):1584-93).

Por consistencia con los datos presentados los decimales se presentan en el mismo formato que en la literatura inglesa, mediante puntos, y no mediante comas, como correspondería en español.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	34
1.1. INTRODUCCIÓN AL CÁNCER DE MAMA: GENERALIDADES	35
1.1.1. Epidemiología	35
1.1.1.1. Incidencia y mortalidad del Cáncer de Mama en la actualidad...	35
1.1.1.2. Incidencia y mortalidad del Cáncer de Mama: Evolución histórica y previsión para las próximas décadas.....	37
1.1.1.3. Factores de riesgo y factores que confieren protección	39
1.1.2. Diagnóstico y Estadaje	41
1.1.3. Histología	47
1.1.4. Factores pronósticos clínico-patológicos clásicos	49
1.1.5. Subtipos de Cáncer de Mama y perfiles de expresión génica	56
1.1.6. Tratamiento del Cáncer de mama precoz. Generalidades	59
1.1.6.1. Cirugía como primera maniobra terapéutica y tratamientos adyuvantes a la cirugía.....	59
1.1.6.2. Neoadyuvancia sistémica como primera maniobra y tratamientos posteriores.....	67
1.2. ESTRÓGENOS	70
1.2.1. Formulación química	70
1.2.2. Síntesis	71
1.2.3. Metabolismo	75
1.2.4. Transporte en el torrente circulatorio	78
1.2.5. Excreción	79
1.2.6. Niveles fisiológicos circulantes	79

1.2.7. Acciones fisiológicas	80
1.2.8. Mecanismo de acción molecular. Receptor de Estrógeno.....	83
1.3 HORMONA FOLÍCULOESTIMUANTE (FSH) Y HORMONA LUTEINIZANTE (LH).....	88
1.3.1. Origen y formulación química.....	88
1.3.2 Funciones de la LH y FSH sobre el ovario. Ciclo menstrual y mecanismos de regulación hormonal.....	89
1.3.3 Niveles fisiológicos circulantes.....	93
1.4. FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO ADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA.....	95
1.4.1. Tamoxifeno.....	95
1.4.1.1 Categorización y formulación química.....	95
1.4.1.2 Farmacocinética y farmacogenómica.	96
1.4.1.3 Farmacodinamia.....	99
1.4.1.4 Actividad en el contexto metastásico.....	102
1.4.1.5 Toxicidad.....	103
1.4.1.6 Indicaciones.....	105
1.4.2 Inhibidores de la aromatasa.....	106
1.4.2.1 Enzima aromatasa. Categorización y formulación química de los Inhibidores de la aromatas.....	106
1.4.2.2 Farmacocinética	108
1.4.2.3 Farmacodinámica y farmacogenómica.....	109
1.4.2.4 Actividad clínica en el contexto metastásico.....	114
1.4.2.5 Toxicidad.....	114
1.4.2.6 Indicaciones.....	118

1.4.3. Análogos de la hormonal liberadora de gonadotropinas (aGnRH)	118
1.4.3.1 Categorización y formulación química.....	118
1.4.3.2 Farmacocinética y farmacodinamia. Concepto de fenómeno de fin de dosis. Comparación entre compuestos y formulaciones.....	120
1.4.3.3 Comparación entre compuestos y formulaciones.....	122
1.4.3.4 Actividad clínica en monoterapia en el contexto metastásico...	125
1.4.3.5 Toxicidad	126
1.4.3.6 Indicaciones.....	127
1.4.4. Combinación de los aGnRH y tamoxifeno / inhibidores de la aromatasa. Datos clínicos y endocrinos	128
1.5 EFECTO ENDOCRINO DE LA QUIMIOTERAPIA (QT) EN MUJERES PREMENOPÁUSICAS: AMENORREA QUIMIOINDUCIDA. FACTORES PREDICTORES. IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)	135
1.5.1 Concepto de amenorrea quimioinducida. Factores predictores. Reversibilidad	135
1.5.2 Impacto de la amenorrea quimioinducida en la SLE y SG	137
1.5.3 Determinación del estado menopáusico tras QT adyuvante. Factores relacionados con la recuperación de la función ovárica (RFO) en mujeres que han recibido o no QT	140
1.6 ESTADO DEL ARTE DEL TRATAMIENTO HORMONAL ADYUVANTE	145
1.6.1 Pacientes postmenopáusicas	145
1.6.1.1 IA vs tamoxifeno: Estrategia de inicio.....	146
1.6.1.2 IA tras 2-3 años de tamoxifeno: Switching y secuencialidad....	149

1.6.1.3	IA tras 5 años de tamoxifeno.....	150
1.6.1.4	Tamoxifeno de continuación tras 5 años de tamoxifeno.....	151
1.6.1.5	IA de continuación tras 5 años de IA.....	152
1.6.2	Pacientes premenopáusicas.....	153
1.6.2.1	Tamoxifeno.....	153
1.6.2.2	Supresión de la función ovárica en pacientes premenopáusicas. Evidencia previa a los resultados del estudio SOFT.....	156
1.6.2.3	IA.....	165
1.6.2.4	Conclusiones sobre la THA en mujeres premenopáusicas.....	165
1.7	MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS CIRCULANTES Y NIVELES DE ESTRÓGENOS Y GONADOTROPINAS EN PACIENTES SOMETIDAS A TRATAMIENTO HORMONAL.....	167
1.7.1	Métodos de determinación de estrógenos circulantes.....	167
1.7.2	Niveles de estrógenos y gonadotropinas en pacientes pre y postmenopáusicas. Cambios atribuibles a tratamiento hormonal.....	168
2.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	177
3.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	181
3.1.	OBJETIVOS DEL ANÁLISIS A 12 MESES DEL SUBESTUDIO SOFT-EST: PRESENTE TESIS.....	182
3.2.	HIPÓTESIS Y DEFINICIONES.....	184

4. PACIENTES Y MÉTODOS	185
4.1 PACIENTES Y MÉTODOS EN EL ESTUDIO SOFT	186
4.1.1. Selección de pacientes para el estudio SOFT	186
4.1.2. Países y centros participantes en el estudio SOFT	188
4.1.3. Diseño del estudio SOFT: Grupos de Tratamiento, Objetivos, Procedimientos y Consideraciones Estadísticas	190
4.1.3.1. Diseño y Grupos de tratamiento.....	190
4.1.3.2. Objetivos principales y secundarios.....	191
4.1.3.3. Procedimientos.....	192
4.1.3.4. Consideraciones Estadísticas.....	195
4.1.4 Subestudios del Estudio SOFT	195
4.2 PACIENTES Y MÉTODOS EN EL SUBESTUDIO SOFT-EST	197
4.2.1. Diseño del Subestudio	197
4.2.2. Selección de pacientes	198
4.2.2.1 Centros participantes.....	198
4.2.2.2. Criterios de inclusión.....	198
4.2.2.3. Registro de las pacientes.....	198
4.2.3 Calendario de recogida de las muestras	199
4.2.4. Logística de la recogida, conservación y envío de las muestras ..	200
4.2.5. Determinación de estrógenos: GC-MS/MS	201
4.2.6. Determinaciones de FSH y LH	203
4.2.7. Consideraciones estadísticas del subestudio SOFT- EST para el período completo de 4 años	203

4.2.7.1. Análisis de los datos.....	203
4.2.7.2. Consideraciones acerca del tamaño muestral.....	205
4.2.8 Consideraciones estadísticas de subestudio SOFT-EST para el análisis de los primeros 12 meses.....	206
4.2.9 Calendario de publicación de resultados.....	207
5. RESULTADOS.....	209
5.1 POBLACIÓN.....	210
5.1.1 Período de reclutamiento y reclutamiento por centros.....	210
5.1.2. Análisis de cohortes.....	212
5.1.3. Estado de las pacientes en el estudio. Discontinuaciones precoces.....	213
5.1.4 Características de las pacientes en la cohorte analítica.....	215
5.2. NIVELES DE ESTRÓGENO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y DEL TRATAMIENTO ASIGNADO.....	221
5.2.1 Disponibilidad de las muestras.....	221
5.2.2. Grupo de tratamiento con Exemestano+Triptorelina.....	222
5.2.3. Grupo de tratamiento con Tamoxifeno+Triptorelina.....	223
5.2.4. Descripción de los niveles de E2 en ambos grupos de tratamiento y comparación entre grupos.....	224

5.2.5 Pacientes con niveles post-basales de E2>2.72 pg/mL y/o sangrado vaginal en el grupo de Exemestano+Triptorelina.....	227
5.2.5.1 Proporción de pacientes con niveles post-basales de E2>2.72 pg/mL.....	227
5.2.5.2 Pacientes con sangrado vaginal.....	230
5.2.5.3 Evolución de los niveles e E2 en las pacientes con supresión estrogénica subóptima en al menos una muestra post-basal	231
5.2.5.4. Características de las pacientes con supresión estrogénica subóptima en al menos una muestra post-basal...	234
5.3. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÓGENOS ENTRE GRUPOS DE TRATAMIENTO.....	236
5.4. NIVELES DE FSH Y LH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y TRATAMIENTO ASIGNADO.....	238
5.5. ADHERENCIA AL TRATAMIENTO Y TIEMPO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS CON RESPECTO A LAS INYECCIONES DE TRIPTORELINA.....	240

6. DISCUSION	245
6.1 NIVELES DE ESTRÓGENOS POST-BASALES EN LOS DOS GRUPOS DE TRATAMIENTO Y PROPORCIÓN DE PACIENTES CON SUPRESIÓN ESTROGÉNICA ÓPTIMA Y SUBÓPTIMA EN LAS PACIENTES TRATADAS CON EXEMESTANO+TRIPTORELINA. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS REALIZADOS EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS	246
6.2 METODOLOGÍA UTILIZADA Y RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS DINTELES DE SUPRESIÓN SUBÓPTIMA SELECCIONADOS	254
6.2.1. Metodología utilizada	254
6.2.2. Relevancia clínica de los dinteles de supresión subóptima seleccionados	255
6.2.2.1. Datos derivados de estudios randomizados que enfrentan IA de 3ª generación.....	256
6.2.2.2 Datos derivados de estudios que investigan la recuperación de la función ovárica en pacientes con CM y amenorrea inducida por QT adyuvante.....	260
6.3 COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS EN PACIENTES PREMENOPÁUSICAS	266
6.3.1. En el contexto adyuvante/neoadyuvante	266
6.3.2. En el contexto metastásico	270
6.4 FACTORES PREDICTIVOS DE SUPRESIÓN ESTROGÉNICA SUBÓPTIMA EN EL GRUPO QUE RECIBIÓ EXEMESTANO+TRIPTORELINA	272
6.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO SOFT-EST	279

6.6 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL SUBESTUDIO SOFT-EST EN EL CONTEXTO DE LOS HALLAZGOS DE LOS ESTUDIOS SOFT Y TEXT	283
6.7 DIRECCIONES FUTURAS.....	285
7. CONCLUSIONES.....	288
8. ANNEXO.....	291
9. REFERENCIAS.....	321

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cáncer de Mama: Tasas de incidencia estandarizadas por edad por países. Datos por cada 100.000 mujeres

Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en las diferentes regiones del mundo

Figura 3. Incidencia anual del CM en la mujer en EEUU entre 1975 y 2005

Figura 4. Evolución de la incidencia y mortalidad en CM en Estados Unidos de 1992 a 2012

Figura 5. Imagen microscópica de CDI (A) y CLI (B)

Figura 6. CM invasivos con positividad para RE (Panel A) y para RP (panel B)

Figura 7. CM HER2+: Tinción completa de la proteína de membrana por IHQ (score 3+, panel A) y amplificación del gen por FISH (panel B) e ISH (panel C)

Figura 9. Principales estrógenos naturales

Figura 10. Estructura química del colesterol, precursor de las hormonas esteroideas

Figura 11. Esquema general de la síntesis de esteroides

Figura 12. Proceso de biosíntesis de estrógenos

Figura 13. Principales vías de conjugación de E_2 y E_1

Figura 14. Formación y conjugación de Catecol Estrógenos y Estrógeno-Quinonas

Figura 15. Metabolismo de los estrógenos y mecanismos propuestos de carcinogénesis mamaria

Figura 16. Estructura proteica de $RE\alpha$ y $RE\beta$

Figura 17. Mecanismo de acción del RE en CM

Figura 18. Estructura química de FSH y LH

Figura 19. Acciones de la FSH y LH. Teoría de “dos hormonas, dos células”

Figura 20. Anatomía del ovario. Fases de desarrollo del folículo

Figura 21. Ciclo ovárico femenino: fases folicular y lútea, niveles hormonales y desarrollo del folículo y del endometrio en cada fase

Figura 22. Fórmula química del tamoxifeno y de sus metabolitos

Figura 23. Metabolismo del tamoxifeno

Figura 24. Mecanismo molecular de acción del tamoxifeno

Figura 25. Actividad predominante (agonista vs antagonista) del tamoxifeno sobre los órganos hormonosensibles de la mujer postmenopáusica

Figura 26. Estructura química de los tres inhibidores de la aromatasa (IA) de tercera generación

Figura 27. Diseño de los estudios comparativos de los niveles de estrógenos obtenidos con letrozol y anastrozol

Figura 28. Fénomeno de *fin de dosis*: escape de los niveles de testosterona por encima de los niveles de castración por agotamiento prematuro del preparado trimestral depot de aGHRH en pacientes con cáncer de próstata

Figura 29: Proporción de pacientes con menstruaciones en función de edad, esquema quimioterápico recibido y meses transcurridos desde finalización de QT adyuvante

Figura 30. SLE en pacientes RE positivos según hayan desarrollado o no amenorrea. A: todas las pacientes; B: subgrupo de pacientes randomizadas a recibir tamoxifeno

Figura 31. SG (A) y SLE (B) de las pacientes incluidas en estudio NSABP B30 en función de la presentación o no de amenorrea quimioinducida (pacientes RH positivos y negativos)

Figura 32: Diseños de los estudios SOFT y TEXT

Figura 33. Funcionamiento esquemático del espectrómetro de masas en tándem

Figura 34. Niveles plasmáticos (pmol/L) de E2 (panel A) y E1S (panel B) tras 3 meses de tratamiento con anastrozol o letrozol en función del IMC

Figura 35. Países participantes en estudio SOFT (en lila)

Figura 36. Diseño del estudio SOFT incluyendo factores de estratificación

Figura 37. Diseño del estudio SOFT-EST

Figura 38: Diagrama CONSORT del flujo de pacientes desde la randomización en el estudio principal SOFT hasta la inclusión en la corte analítica del subestudio SOFT

Figura 39. Distribución de los niveles de estrógeno (E2, E1 y E1S) en función del tiempo y tratamiento asignado

Figura 40. Porcentajes de pacientes en el grupo de exemestano+triptorelina con valores de estradiol (E2) por encima de los puntos de corte explorados

Figura 41. Evolución de los niveles de estradiol en función del tiempo y del número (1, 2 o 3) de muestras post-basales con un valor de E2 >2.72 pg/mL en las 27 pacientes con al menos 1 muestra post-basal con E2 superior al dintel mencionado

Figura 42. Media estimada de la diferencia en número de veces entre grupos de tratamiento (tamoxifeno+triptorelina vs exemestano+triptorelina) para cada estrógeno en función del tiempo.

Figura 43. Distribución de la FSH y LH en función del tiempo y tratamiento asignado

Figuras 44. A y B. Representación de los niveles hormonales en función del intervalo entre extracción de la muestra y última inyección de triptorelina. Panel A: niveles de E2, E1 y E1S. Panel B niveles de FSH y LH

Figura 45: Porcentaje de cambio en Ki67 a las 16 semanas con exemestano, anastrozol o letrozol en el estudio ACOSOG 1031

Figura 46. . SLE en función de la RFO en pacientes con amenorrea quimioinducida que reciben tratamiento con exemestano (Seguimiento medio 30 meses, análisis univariado)

Figura 47. Niveles de E2 (pmol/L) basales y durante el tratamiento en las pacientes con amenorrea quimioinducida que hicieron el cambio a tratamiento con exemestano

Figura 48 Supervivencia Libre de Enfermedad a Distancia (SLED) y Supervivencia Global (SG) en función de la FSH medida durante el tratamiento endocrino (goserelina-tamoxifeno o goserelina-anastrozol) en el estudio ABCSG 12

Figura 49. Beneficio relativo de Anastrozol vs Tamoxifeno en función del IMC en el estudio ATAC: Razón de Riesgo (HR) de recurrencias y recurrencias a distancia.

Figura 50. Estudio ABCSG-12: Razones de riesgo (HR) de SLE y SG en función del tratamiento (tamoxifeno o anastrozol) en pacientes con sobrepeso/obesidad vs pacientes con peso normal

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadiaje TNM: T clínico (cT) y anatomopatológico (pT)

Tabla 2. Estadiaje TNM: “N” clínico (cN)

Tabla 3 Estadiaje TNM: “N” anatomopatológico (pN)

Tabla 4. Estadiaje TNM:”M”

Tabla 5. Estadiaje TNM: Clasificación por estadios

Tabla 6. Tipos histopatológicos de CM invasivos

Tabla 7: Evaluación de HER 2 por IHQ. Puntuación por IHQ y resultados

Tabla 8. Exceso de riesgo en mortalidad estimado según edad al diagnóstico de CM

Tabla 9. Riesgo de recaída según edad, estado de RH y desarrollo o no de amenorrea quimioinducida en pacientes con CM N+ incluidas en estudios del IBCSG

Tabla 10. Subtipos moleculares de CM según el perfil inmunohistoquímico

Tabla 11. Esquemas de QT utilizados según subtipo molecular de CM

Tabla 12. Toxicidad inmediata y tardía asociada a los regímenes QT más comunes

Tabla 13. Niveles de E1, E2 y E1S en mujeres premenopáusicas en función de la fase del ciclo menstrual

Tabla 14. Otros efectos descritos del tamoxifeno respecto placebo en estudio NSABP P1 (N=13388)

Tabla 15. IA de tercera generación: Parámetros farmacocinéticos

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del enzima aromatasa (TBA, del inglés *Total Body Aromatization*) y descenso de estrógenos séricos obtenido con respecto a los niveles basales tras tratamiento con los diferentes IA de 3ª generación en mujeres postmenopáusicas

Tabla 17. Toxicidad de IA vs Tamoxifeno en los estudios ATAC y BIG 1.98

Tabla 18. Efectos adversos de exemestano vs placebo en el estudio de prevención de CM EXCEL

Tabla 19. Efectos de la hormonoterapia en el perfil lipídico

Tabla 20. Análogos de la GnRH comercializados en España: Características

Tabla 21. Datos clínicos y endocrinos en estudios fase II y III que han utilizado combinaciones de aGnRH con tamoxifeno para tratamiento de mujeres premenopáusicas con CM avanzado

Tabla 22. Datos clínicos y endocrinos derivados de los estudios fase II que combinan aGnRH en mujeres premenopáusicas con CM avanzado

Tabla 23. Datos clínicos y endocrinos derivados de los estudios fase II que combinan aGnRH en mujeres premenopáusicas con CM precoz (contextos adyuvante y neoadyuvante)

Tabla 24: Niveles de E2, FSH y LH en estudio TABLE, basales y a los 1 y 2 años

Tabla 25. Proporción de amenorrea quimioinducida, definición y patrón de reversibilidad según el esquema de QT administrado

Tabla 26. Recuperación clínica y bioquímica de la función ovárica en pacientes inicialmente premenopáusicas con amenorrea quimioinducida.

Tabla 27. Estudios clínicos de tamoxifeno e IA como THA en mujeres postmenopáusicas. Estrategias de inicio, *switch* corto, y HT de continuación. Resultados

Tabla 28. Principales estudios randomizados de 5 vs 10 años de tamoxifeno y meta-análisis

Tabla 29. Principales estudios sobre SFO en pacientes premenopáusicas con o sin tamoxifeno hasta 2014

Tabla 30. Estudios SOFT y análisis combinado de los brazos con SO en estudios SOFT y TEXT

Tabla 31. Efectos adversos en estudios SOFT y TEXT

Tabla 32. Niveles de estrógenos determinados en mujeres con menopausia natural o inducida con aGnRH medidos por GC-MS/MS

Tabla 33. Cambios en los niveles de gonadotropinas en las mujeres postmenopáusicas incluidas en el estudio adyuvante HOBOE

Tabla 34. Grupos Cooperativos participantes en estudio SOFT

Tabla 35. Calendario de visitas y procedimientos del estudio SOFT

Tabla 36. Calendario de determinaciones en función de número de visita del estudio SOFT y meses desde el inicio del tratamiento

Tabla 37. Reclutamiento de pacientes en el estudio SOFT según el centro participante

Tabla 38. Resumen de las cohortes de análisis

Tabla 39. Cohorte Analítica: Estado de las pacientes a los 12 meses de iniciado el estudio. Seguimiento por protocolo vs discontinuación precoz

Tabla 40. Cohorte analítica del sub-estudio SOFT-EST: características de las pacientes, tratamientos sistémicos recibidos y niveles hormonales basales

Tabla 41. Características anatomopatológicas del tumor primario en la cohorte analítica

Tabla 42. Características de las pacientes en función de niveles basales centrales de E2 (≤ 20 o $E2 > 20$ pg/mL)

Tabla 43. Porcentaje de cambio en los niveles de estrógenos en cada punto de tiempo con respecto al valor basal en las pacientes randomizadas a exemestano+triptorelina

Tabla 44: Niveles de estrógenos (E2, E1 y E1S) en cada punto de tiempo en función del tratamiento asignado

Tablas 45a y 45b. Proporciones de pacientes tratadas en el grupo de exemestano+triptorelin con niveles de E2 por encima de los tres dinteles explorados: el pre-definido de >2.72 pg/mL, y los 2 dinteles adicionales (>10 y > 20 pg/mL) en función del uso previo de QT

Tabla 46. Características de las 2 pacientes en el grupo de exemestano+triptorelina que experimentaron sangrado vaginal

Tabla 47. Resumen de las 4 pacientes asignadas a exemestano+triptorelina que presentaron supresión estrogénica subóptima ($E2 > 2.72$ pg/mL) persistente durante el seguimiento

Tabla 48. Características clínicas y niveles hormonales basales de la población con supresión estrogénica óptima en todas las muestras basales en comparación con la población con al menos una muestra post-basal con valor de $E2 > 2.72$ pg/mL (Sólo pacientes pertenecientes al grupo exemestano+triptorelina)

Tabla 49a. Exemestano+Triptorelina: Pacientes que discontinuaron precozmente el tratamiento asignado (N=10). Mediana de tiempo de adherencia a los tratamientos. Niveles de E2 e intervalo de tiempo entre la obtención de muestra de sangre y la última inyección de triptorelina

Tabla 49b. Tamoxifeno+Triptorelina: Pacientes que discontinuaron precozmente el tratamiento asignado (N=5). Mediana de tiempo de adherencia a los tratamientos. Niveles de E2 e intervalo de tiempo entre la obtención de muestra de sangre y la última inyección de triptorelina

Tabla 50. Número de pacientes agrupados por intervalos de días transcurridos entre la obtención de la muestra y la última inyección de triptorelina (restringido a aquellos pacientes con información completa)

Tabla 51. Niveles de estrógenos (E2, E1 y E1 S) y porcentaje de cambio obtenidos con exemestano, letrozol y anastrozol en mujeres voluntarias sanas a las 12 y 24 semanas

Tabla 52. Comparación de la supresión estrogénica obtenida en nuestro estudio (E1 y E2) con la de estudios comparables (mismo IA y LLQ similares) llevados a cabo en pacientes postmenopáusicas

Tabla 52 (Continuación). Comparación de la supresión estrogénica obtenida en nuestro estudio (E1S) con la de estudios comparables (mismo IA y LLQ similares) llevados a cabo en pacientes postmenopáusicas

Tabla 53. Porcentaje de respuestas con exemestano, letrozol o anastrozol en el estudio neoadyuvante ACOSG Z103

Tabla 54. Estudios que investigaron la recuperación de la función ovárica (RFO) en mujeres con amenorrea quimioinducida. Características del método utilizado y *cut-offs* utilizados en la deficiencia de RFO.

Tabla 55. Niveles hormonales basales y tras 6 meses de tratamiento en las pacientes premenopáusicas incluidas en el estudio HOBOS

Tabla 56. Características clínicas con potencial influencia en el estado menopáusico real a la randomización en la población incluida en el análisis primario del estudio SOFT y en el estudio SOFT-EST

1 Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN AL CÁNCER DE MAMA: GENERALIDADES

1.1.1 Epidemiología

1.1.1.1 Incidencia y mortalidad del Cáncer de Mama en la actualidad

El cáncer de mama (CM) representa la primera causa de cáncer invasivo en la mujer a nivel mundial, y el segundo más frecuente si tenemos en cuenta toda la población. Se estima que en 2012 se diagnosticaron en el mundo 1.676.000 nuevos casos y se registraron 522000 muertes por esta causa [1].

El CM representa hoy en día el cáncer más común en mujeres tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Las tasas de incidencias varían de un 19.3 por 100.000 mujeres en el Este de África al 89.9 por 100.000 mujeres en el Oeste de Europa, y son altas (>80 por 100.000) en regiones desarrolladas (con la excepción de Japón) y bajas (<40 por 100.000 en países en desarrollo [2] (Figura 1). Las tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad por zonas del mundo se detallan en la Figura 2.

Figura 1. CM: Tasas de incidencia estandarizadas por edad por países. Datos por cada 100.000 mujeres [2]

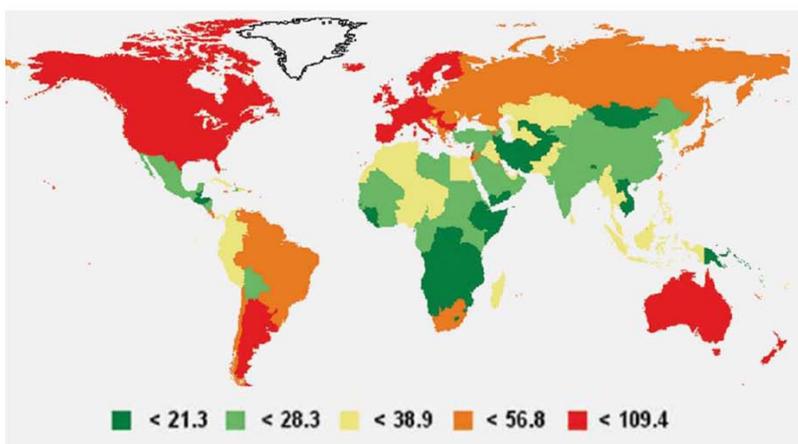
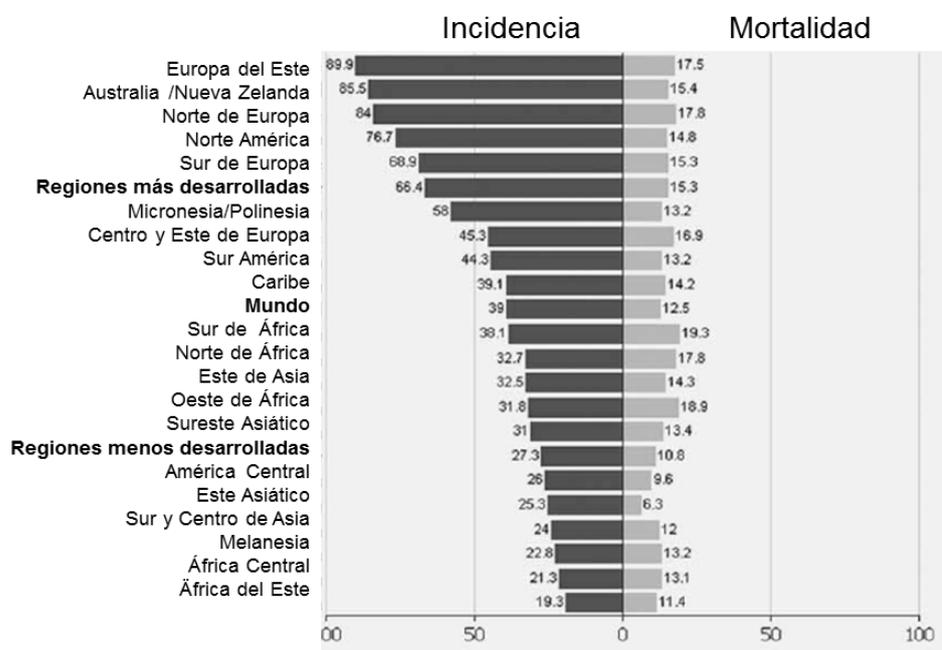


Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en las diferentes regiones del mundo [2]



En España el CM también es el más frecuente en mujeres; los datos a nivel nacional se ven limitados por la escasez de Registros de Tumores de base poblacional, pero se estimaron para el año 2015 21262 nuevos casos y 6075 defunciones [3]. Las tasas de incidencia estandarizadas por edad se corresponden con un riesgo intermedio en comparación con otras regiones del mundo y oscilan entre los 50 por 100.000 mujeres en Cuenca hasta las 68-69 por 100.000 en Navarra o Tarragona [4]

Sea cual la sea la región del mundo, a incidencia del CM aumenta con la edad, de manera que solo el 5% de casos se presenta antes de los 40 años. Aun así, en mujeres inglesas *de entre 15 y 49 años el CM representó un 43.3% de todos los casos de cáncer* [5].

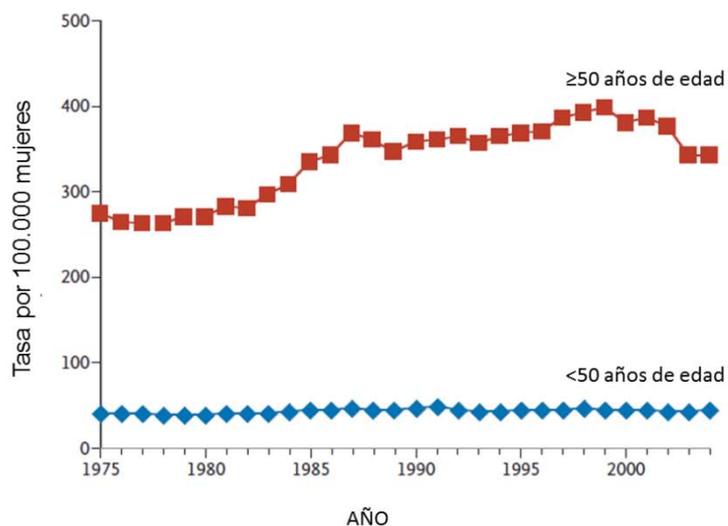
En hombres representan el CM representa sólo 1% de los casos de cáncer y de muertes por esta causa [1]

1.1.1.2. Incidencia y mortalidad del CM: Evolución histórica y previsión para las próximas décadas

La incidencia del CM ha aumentado progresivamente durante los años 1970 a 2000 (Figura 3)

Con la adopción generalizada de los exámenes de detección precoz a partir de la década de los 80, se produjo un aumento del número de casos de CM, así como de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y de otras lesiones premalignas [6]. El amplio uso de la terapia hormonal sustitutiva (THS) en las mujeres postmenopáusicas contribuyó asimismo al aumento de casos detectados [7]. En la última década la caída de la prescripción de la THS en muchos países se ha traducido de forma consistente en un descenso de la incidencia de CM, aunque no a niveles de la era previa al cribado [1, 8-11].

Figura 3. Incidencia anual del CM en la mujer en EEUU entre 1975 y 2005 [8].

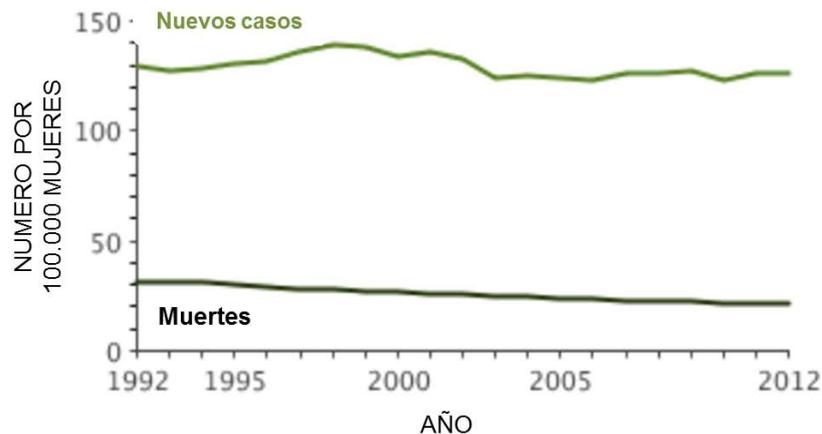


Nótese cómo se incrementa la incidencia sólo en mujeres mayores de 50 años, precisamente el grupo poblacional susceptible de cribado poblacional y de prescripción de THS

Con respecto a la mortalidad por CM, se ha observado un descenso de ésta a partir de 1990, en parte debido al diagnóstico precoz, en parte debido a los avances e implementación de los tratamientos adyuvantes, y a la caída de la

prescripción de la THS a partir 2002 [1, 8] (Figura 4). La supervivencia específica de CM (SECM) a los 5 años en el período 2005-2011 en EEU fue del 89% [12]

Figura 4. Evolución de la incidencia y mortalidad en CM en Estados Unidos de 1992 a 2012 [12]



En España ha mejorado también la supervivencia del CM en los últimos años, de manera que, según datos recientes del *Grupo Español para la Investigación del Cáncer de Mama* (GEICAM), se ha pasado de tasas del 75% a principios de los años 90 a más del 87% en el periodo 1998-2001 [13].

En cuanto a la previsiones de incidencia para los próximos años, estudios publicados recientemente [14] anticipan un total de 441000 CM invasivos e *in situ* en EEUU para el año 2030, frente a los 283000 detectados en 2011, lo que representa un incremento del 50%; se ha calculado, además, que habrá un descenso de la incidencia de CM en mujeres entre 55 y 69 años, mientras que aumentarán los casos en la franja de los 70 a los 84. En cuanto al tipo de tumores detectados se estima que aumentará la proporción de tumores *in situ* que expresan receptores de estrógeno (RE), del 19% al 29%, se mantendrá el porcentaje de tumores invasivos RE positivos, en torno al 63% y descenderá la proporción de tumores *triple negativos* (ver más adelante) invasivos y no invasivos, de un total del 17% a un 9%.

1.1.1.3. Factores de riesgo y factores que confieren protección

Se considera que el 90-95 % de los CM son de naturaleza esporádica, relacionados con factores ambientales o de tipo hormonal/reproductivo, mientras que sólo 5-10% responden a causas genéticas hereditarias[15].

Como principales *factores de riesgo para el desarrollo de CM* se describen los siguientes [16]:

- Edad avanzada
- Menarquia temprana
- Menopausia tardía: Incremento del 3% de riesgo con cada año de retraso en la presentación de la menopausia
- THS: Riesgo se incrementa particularmente a partir de los 5 años de duración, con su uso reciente, en las mujeres más delgadas, y si se han usado combinados de estrógenos y progestágenos más que preparados únicamente con estrógenos. Según datos del estudio más importante (>16000 mujeres randomizadas a THS vs placebo) la razón de riesgo ajustada durante la fase de tratamiento y durante la fase postintervención fue de 1.65 (Intervalo de Confianza (IC) 95% 1.10-2.39) y de 1.26 (IC95% 0.73-2.20), respectivamente[17]
- Uso actual y reciente de anticonceptivos orales; sobre todo si el uso ha sido antes de los 20 años, o se han utilizado preparados trifásicos. En general, el riesgo es poco elevado.
 - Niveles endógenos elevados de estrógenos circulantes en mujeres postmenopáusicas y, con menor evidencia, en mujeres premenopáusicas (mayor riesgo de CM RE+)
 - Niveles elevados de andrógenos circulantes en mujeres postmenopáusicas
 - Nuliparidad
 - Latencia entre menarquia y primera gestación a término: el retraso de la primera gestación a término se asocia a un retraso en la maduración definitiva de la glándula mamaria, lo que la hace más susceptible a estímulos

carcinogénicos, en especial si el período transcurrido desde el inicio de la exposición a estrógenos (menarquia) es prolongado

- Historia familiar de cáncer de mama y en particular, existencia de mutación patogénica en los genes de susceptibilidad a CM, especialmente genes BRCA1 y BRCA2 (*breast cancer gen 1 y 2*)
- Consumo de alcohol (incremento entre 7.1- 9% por cada 10 g/día)
- Obesidad: Aumenta el riesgo de CM en mujeres postmenopáusicas. El incremento de riesgo se asocia primordialmente a mayores niveles de estrógenos circulantes, debido a la mayor conversión periférica (grasa) de andrógenos a estrógenos. En menor medida, riesgo también se relaciona con niveles más elevados de insulina
- Exposición torácica o de la mama a irradiación (ej: RT mediastínica previa por Linfoma de Hodgkin)
- Migración y adopción de estilo de vida de países con tasas de incidencia baja a países de incidencia alta. Se ha relacionado con introducción de dietas con alto contenido en grasas, pero estudio de intervención no han corroborado esto último.
- Polimorfismos asociados a alta expresión del enzima aromatasa, que convierte andrógenos a estrógenos

Se consideran, en cambio, *factores protectores* [16]:

- Número de partos y latencia entre ellos (mejor cuantos más y más cercanos en el tiempo)
- Lactancia materna: Se ha comunicado un 4% reducción de riesgo por cada 12 meses de lactancia. Recientemente se ha descrito que la primera gestación en edad joven, junto con una ausencia de lactancia materna aumentan el riesgo de CM triple negativo.
- Actividad física: Su efecto protector vendría mediado, en mujeres postmenopáusicas, por la reducción de depósitos grasos, y, por tanto, por una menor conversión de andrógenos a estrógenos, así como por la disminución de los niveles de insulina circulantes. En mujeres

premenopáusicas, la actividad física intensa demora la menarquia, y reduce los riesgos de promoción tumoral a través de la vía de la insulina

- Pérdida de peso tras la menopausia
- Ooforectomía bilateral en edad joven
- Consumo elevado de folatos en pacientes con consumo de alcohol
- Quimioprevención con antiestrógenos (raloxifen, tamoxifeno, arzoxifeno) o inhibidores de la aromatasa: Disminuyen el riesgo de CM RE positivos

En resumen, pues, la exposición prolongada a estrógenos endógenos o exógenos constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo del CM e, inversamente, maniobras que conlleven una disminución de dichos estrógenos actuarán como factores protectores.

1.1.2. Diagnóstico y Estadía

El CM en sus etapas iniciales suele ser asintomático y se detecta en la mayoría de casos por cambios en la mamografía y/o por la presencia de un tumor palpable en la mama.

Los principales síntomas y signos de la enfermedad a nivel locorregional son la aparición de un nódulo o masa tumoral, generalmente duro y de crecimiento progresivo, con retracción de piel ocasional y/o de un nódulo en la axila. En etapas más avanzadas se puede apreciar deformación de la mama, afectación de piel de ésta, en forma de infiltración, edema, eritema, o signos inflamatorios, así como edema del brazo por bloqueo tumoral del drenaje linfático axilar. La presencia de metástasis (M1) al diagnóstico es poco frecuente (5-10% de casos [18]) y puede ser asintomática (hallazgo en estudio de extensión inicial) o condicionar los síntomas propios de la localización metastásica (dolor, compresión neurológica y/o síntomas de hipercalcemia en caso de M1 óseas, disnea en caso de derrame pleural /linfangitis carcinomatosa, focalidad neurológica asociada a M1 cerebrales, dolor y/o síndrome tóxico por afectación hepática, síndrome anémico ante la presencia de mieloptisis, etc).

La exploración física, la mamografía, ecografía mamaria y, en ocasiones, la Resonancia Magnética (RMN) mamaria, ayudarán en la sospecha diagnóstica, en el diagnóstico diferencial con lesiones benignas (quistes, fibroadenomas), y en la estadificación locorregional. El diagnóstico definitivo vendrá dado fundamentalmente por la biopsia con aguja gruesa (BAG) del tumor mamario. Dicha biopsia precisará a menudo de una guía radiológica, particularmente en caso de lesiones no palpables.

Para el despistaje de metástasis serán útiles las pruebas de laboratorio, con hemograma y bioquímica y marcadores tumorales (Antígeno carcinoembrionario o CEA, y Ca 15.3). La gammagrafía ósea, la Ecografía o Tomografía Computarizada (TC) abdominal, y muy raramente, la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), se utilizarán en caso de sospecha clínica o alteraciones de laboratorio (ej. elevación de marcadores tumorales y/o fosfatasa alcalina ósea) tumores localmente avanzados o con afectación ganglionar [19].

Al igual que en la mayoría de tumores, el estadiaje del CM se rige por el sistema TNM de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) 7ª edición, que tiene en cuenta el tamaño tumoral (T); la presencia o ausencia de afectación adenopática regional (N); y la existencia o no de metástasis a distancia (M). La clasificación T, N y M se refleja de forma abreviada en las Tablas 1 a 4. La agrupación por estadios (Tabla 5) tendrá implicaciones pronósticas y determinará la estrategia terapéutica.

Tabla 1. Estadía TNM: T clínico (cT) y anatomopatológico (pT)*

T	Definición
Tx	No es posible la evaluación del tumor primario
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Tumor in situ (CDIS; CLIS, enfermedad de Paget)
T1	Tumor primario ≤ 2 cm
T1mi	Tumor primario ≤ 1 mm
T1a	Tumor primario > 1 mm y ≤ 5 mm
T1b	Tumor primario > 5 mm y ≤ 1 cm
T1c	Tumor primario > 1 cm y ≤ 5 cm
T2	Tumor primario > 2 cm y ≤ 5 cm
T3	Tumor primario > 5 cm
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión a pared torácica y/o piel
T4a	Afectación de pared torácica, no incluyendo solamente adherencia del músculo pectoral/ invasión
T4b	Ulceración y/o nódulos satélites ipsilaterales y/o edema, incluyendo piel de naranja
T4c	T4a+T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio

* La clasificación anatomopatológica de T (pT) se corresponde con la clasificación clínica, y tiene en cuenta igualmente el diámetro máximo del tumor y afectación de estructuras adyacentes, pero en este caso referido a la pieza quirúrgica. En caso de tratamiento sistémico previo la clasificación TNM incorpora el prefijo “yc” si tiene en cuenta datos clínicos o “yp” si tiene en cuenta datos de los especímenes quirúrgicos

Tabla 2. Estadíaje TNM: “N” clínico (cN)

N	Definición
Nx	Los ganglios regionales no pueden ser o no han sido evaluados
N0	Ausencia de metástasis regionales ganglionares
N1	Presencia de ganglios móviles en niveles I y II axilares
N2	Presencia de ganglios móviles axilares en niveles I , II axilares o presencia de ganglios detectados clínicamente en cadena mamaria interna homolateral
N2a	Presencia de ganglios axilares en niveles I y II que son clínicamente fijos o empastados
N2b	Metástasis clínicamente aparentes en los ganglios ipsilaterales de CMI en ausencia de ganglios axilares clínicamente evidentes
N3a	Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales
N3b	Metástasis clínicamente aparentes en los ganglios ipsilaterales de la CMI junto con ganglios axilares clínicamente evidentes
N3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales

Nivel I: ganglios axilares laterales e inferiores a músculo pectoral menor

Nivel II: ganglios axilares posteriores a músculo pectoral menor

Nivel III: ganglios axilares en situación medial con respecto músculo pectoral menor e infraclaviculares

CMI: cadena mamaria interna

Tabla 3 Estadíaje TNM: “N” anatomopatológico (pN)

pN	Definición
pNx	Las regiones ganglionares no han sido o no han podido ser evaluadas
pN0	Ausencia histológica* de metástasis regionales ganglionares
pN0(i-)	Ausencia de metástasis regionales, tras evaluación tanto histológica como por IHQ
pN0(i+)	Presencia de células malignas en ganglio(s) regional(es) no mayor de 0.2 mm (detectado por H&E o IHQ)
pN1mi	Micrometástasis (mayor de 0.2 mm y/o acúmulos mayores de 200 células, pero ninguno mayor de 2.0 mm)
pN1a	Metástasis en 1–3 ganglios axilares, al menos una metástasis mayor de 2.0 mm

pN1b	Metástasis en CMI con micro o macrometástasis detectadas por biopsia selectiva de ganglio centinela pero no detectados clínicamente**
pN1c	Metástasis en 1-3 ganglios axilares y en CMI con micro o macrometástasis detectadas por biopsia selectiva de ganglio centinela, pero no detectados clínicamente
pN2a	Metástasis en 4–9 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2.0 mm)
pN2b	Metástasis en CMI clínicamente detectado(s) en ausencia de afectación metastásica axilar
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2.0 mm); o metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III axilar)
pN3b	Metástasis mayor de 2mm en uno o más ganglios axilares positivos y afectación CMI clínicamente aparente; o afectación metastásica (>2mm) en 4 o más ganglios axilares así como en CMI, con macro o micrometástasis detectadas por biopsia selectiva, pero no clínicamente aparentes
pN3c	Metástasis en ganglios axilares supraclaviculares ipsilaterales

*Referido a técnicas histológicas convencionales, como son la tinción por hematoxilina y eosina (H&E). No incluye técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) o moleculares

** Referido a detección por técnicas de imagen, o por examen clínico altamente sospechoso, o citología de punción compatible con presumibles macrometástasis

CMI: cadena mamaria interna

Tabla 4. Estadiaje TNM:”M”

M	Definición
Mx	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas o no han sido evaluadas
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M0(i+)	No evidencia clínica o radiográfica de metástasis a distancia, pero existencia de depósitos de células tumorales detectados molecular o microscópicamente en sangre, médula ósea o adenopatía no regional, que no son mayores de 0.2 mm en un paciente sin signos/síntomas de metástasis
M1	Presencia de metástasis a distancia

Tabla 5. Estadaje TNM: Clasificación por estadíos

Estadío	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T3	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T0	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.1.3 Histología

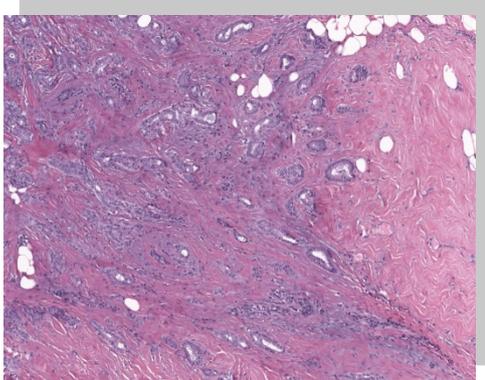
Para la clasificación de los tumores de mama se usa actualmente una modificación de la clasificación que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el año 2003 [20]. Esta clasificación distingue seis grandes categorías de lesiones

1. Lesiones precursoras (neoplasia lobulillar y carcinoma ductal in situ o intraductal).
2. Carcinoma invasivo de tipo no especial (NOS, del inglés *No Otherwise Specified*)
3. Subtipos especiales de carcinoma invasivo.
4. Situaciones especiales (carcinoma microinvasivo, carcinoma inflamatorio y carcinoma de mama bilateral).
5. Lesiones proliferativas intraductales.
6. Lesiones papilares.

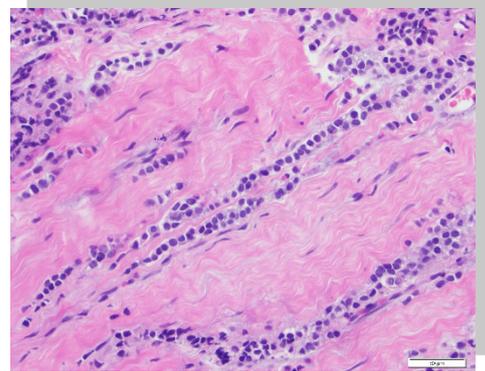
La histología más frecuente del CM invasivo es, con mucho, el carcinoma ductal infiltrante (CDI), que representa aproximadamente el 70-80% de casos, seguido en frecuencia del carcinoma lobulillar infiltrante (CLI). EL CDI tiene su origen en los conductos mamarios, mientras que el CLI se origina a nivel de los lobulillos y se caracteriza por ser un tumor multifocal y/o multicéntrico y por su mayor tendencia a la bilateralidad. .La morfología de ambos tipos histológicos (CDI y CLI) viene ilustrada en la Figura 5 (Paneles A y B, respectivamente).

Figura 5. Imagen microscópica de CDI (A) y CLI (B)

A



B



El pronóstico del CDI y CLI es similar, pero el patrón de metastatización es diferente, de manera que el CLI tiene mayor predilección por metastatizar en serosas, tracto gastrointestinal y ovarios [21]. Las histologías medular, cribiforme y en particular mucinoso y tubular son poco frecuentes pero tienen mejor pronóstico. Para el carcinoma medular la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) y la Supervivencia Global (SG) son también superiores, incluso si se restringe la comparación al subgrupo de tumores RE- y grado histológico 3. En el caso de carcinomas mucinosos, y carcinomas tubulares el pronóstico es especialmente favorable, de manera que, en este último caso, las tasas de SLE y SG son superponibles a las de la población general [22].

Otros tipos histopatológicos menos frecuentes se describen en la Tabla 6. Para la mayoría de ellos el pronóstico no está claramente establecido, dada su rareza

Tabla 6. Tipos histopatológicos de CM invasivos [23]

Histología	Frecuencia
Carcinoma ductal infiltrante (CDI)	60-80%
Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)	5-15%
Carcinoma mixto (CDI + CLI)	4-5%
Carcinoma medular	1-7%
Carcinoma mucinoso	<5%
Carcinoma invasivo tubular/cribiforme	1-6%
Carcinoma invasivo papilar	<1-2%
Carcinoma invasivo micropapilar	<3%
Carcinoma metaplásico	<5%
Carcinoma invasivo apocrino	0.3-4%
Carcinoma neuroendocrino	2-5%
Carcinoma rico en lípidos	>1-6%
Carcinoma de células claras rico en glucógeno	1-3%

1.1.4 Factores pronósticos clínico-patológicos clásicos

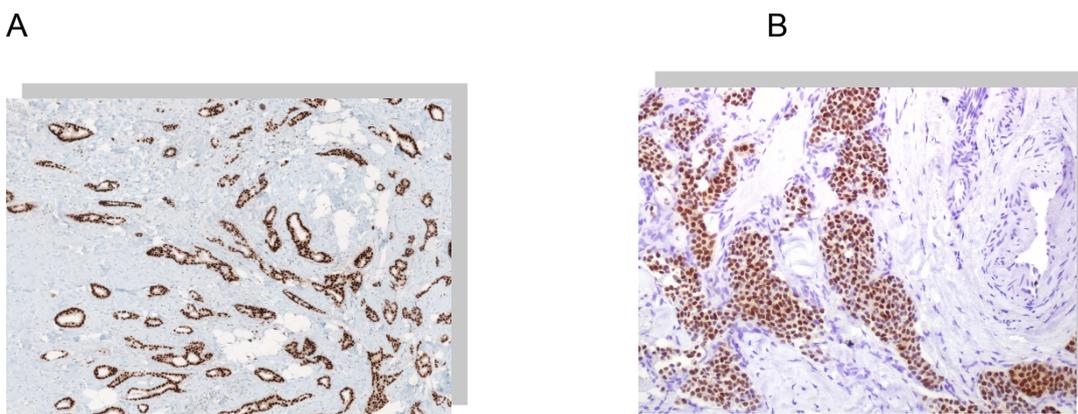
El pronóstico y también la estrategia terapéutica del CM vendrán determinados por *factores pronósticos clínico-patológicos* clásicamente establecidos. La información pronóstica que de ellos se deriva se verá complementada o corroborada cada vez más por el uso de *plataformas génicas* que estudian de forma robusta la biología del tumor, pero en sí mismos son aún hoy las variables principales en las que se basan la mayoría de decisiones clínicas.

Dichos factores pronósticos clínico-patológicos son los siguientes:

- *Afectación ganglionar*: Clásicamente es la variable pronóstica más importante. La afectación ganglionar axilar y el número de ganglios afectados se relaciona de forma consistente con la SLE y SG [24].
- *Tamaño tumoral*: Se ha considerado el segundo factor pronóstico independiente en relevancia. Mayores tamaños tumorales se asocian a un pronóstico más desfavorable y a una mayor incidencia de afectación ganglionar regional [24].
- *Grado histológico*: Se establecen tres grados diferentes según el método propuesto por Elston y Ellis en función del pleomorfismo celular, el recuento mitótico y la formación de túbulos; así, los tumores con grado histológico 1 son de bajo grado y de mejor pronóstico, y los tumores con grado histológico 3 se consideran de alto grado y se asocian a un peor pronóstico [25].
- *Tipo histológico*: No existen diferencias pronósticas entre los carcinomas invasivos de tipo no especial y la variante clásica de los carcinomas lobulillares infiltrantes [26]. Las histologías tubular, mucinosa y medular se han asociado a un mejor pronóstico (Véase Sección 1.1.3)
- *Invasión linfovascular*: La presencia de invasión linfovascular tumoral, sobre todo si es extensa, constituye un factor de peor pronóstico, Este efecto es independiente del estado ganglionar [15]. Asimismo, la invasión linfovascular se ha relacionado con una mayor probabilidad de afectación ganglionar cuando se lleva a cabo la biopsia selectiva del ganglio centinela [27]
- *Receptores hormonales (RH)*: El estado de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) constituye un factor pronóstico y predictivo fundamental en CM. Actualmente su determinación tiene lugar mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Clásicamente se consideraba que un tumor era positivo para uno u otro receptor (más frecuentemente ambos a la vez) cuando se observaba tinción nuclear en >10% de células tumorales. Más recientemente se ha rebajado el dintel de positividad y se acepta que un tumor es positivo con sólo un 1% de núcleos celulares teñidos [28]. Aun así, valores entre 1 y 9% se consideran equívocos [29]. La Figura 6 muestra el aspecto microscópico de CM con tinción IHQ positiva para RE y RP. La positividad de los RH se asocia a una mejor supervivencia en los cinco primeros años desde

el diagnóstico, pero también a un riesgo constante de recaída más allá de este período, que se prolonga incluso hasta los 20 años [30]. También se asocia a tumores bien diferenciados y, sobre todo, predice el beneficio del tratamiento hormonal (HT) [31, 32]. De forma inversa, la negatividad se asocia a la ausencia de eficacia de las terapias endocrinas. En cuanto a RP, un pequeño porcentaje de CM (entre 1 y el 4% [33]) son catalogados como RE-RP+. Actualmente se considera que se trata de casos donde la determinación de RE podría ser falsamente negativa [34, 35] y son a menudo reclasificados cuando se testan por una segunda técnica. El RP, además, se utiliza en la actualidad para diferenciar el subtipo de CM luminal A del luminal B, considerándose un valor bajo (indicativo de luminal B, véase Sección 1.1.5) aquél $\leq 20\%$ [36]

Figura 6. CM invasivos con positividad para RE (Panel A) y para RP (Panel B)



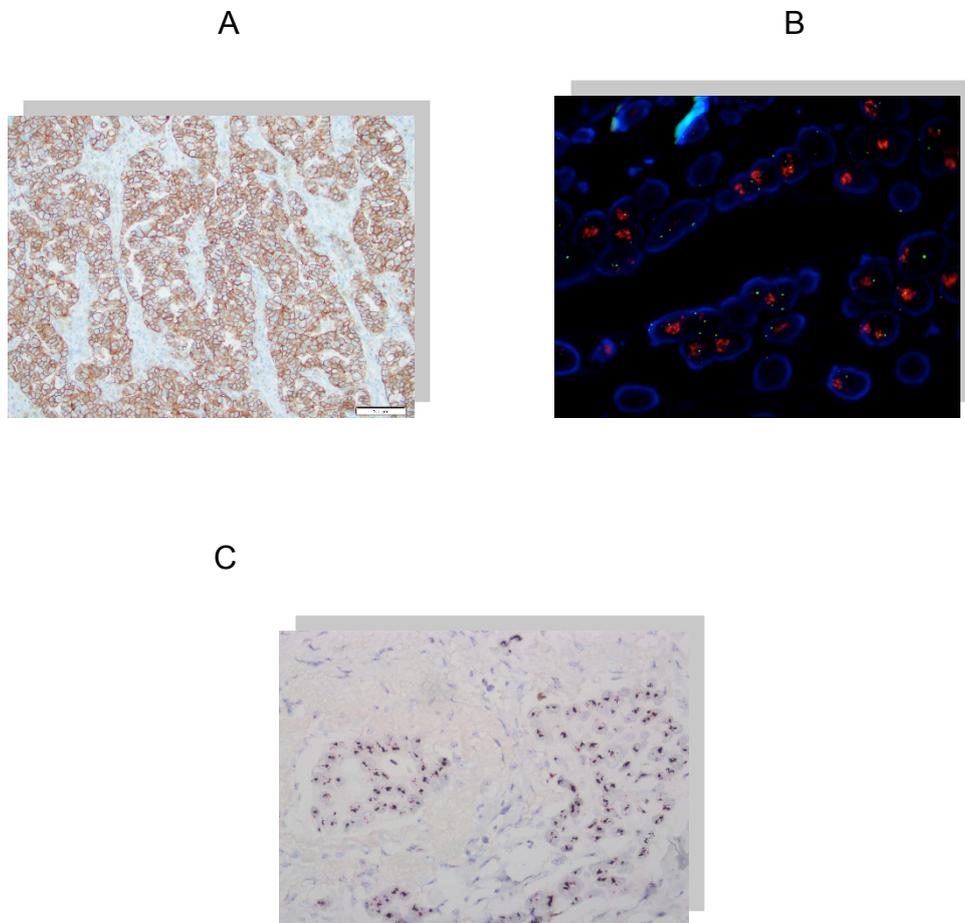
- **HER2:** La proteína HER2 (del inglés *Human Epidermal Receptor 2*) es un receptor de membrana de la familia de factores de crecimiento de EGFR (del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*). Se determina en primera instancia mediante IHQ. La tinción completa y circunferencial de la membrana que es intensa en más del 10% de células tumorales se categoriza como 3+ y se considera positiva (Tabla 7). En caso de tinción +2 es necesario determinar si existe o no amplificación mediante técnicas de hibridación *in situ*, ISH o FISH [37] (Figura 7). La positividad de HER2 (por sobreexpresión o amplificación)

ha demostrado ser un factor de mal pronóstico, indicativo de agresividad de la enfermedad y de resistencia a terapias endocrinas, así como un factor altamente predictivo de beneficio de terapias dirigidas contra dicho receptor de membrana [38].

Tabla 7. Evaluación de HER 2 por IHQ. Puntuación por IHQ y resultados

Definición	Puntuación IHQ	Resultado
No se observa tinción o existe tinción incompleta o débil/difícilmente apreciable en $\leq 10\%$ de células tumorales	0	Negativo
Tinción incompleta o débil /difícilmente apreciable en $>10\%$ de células tumorales	1+	Negativo
Tinción circunferencial de la membrana que es incompleta y/o débil/moderada en $>10\%$ de células tumorales	2+	Equívoco
o Tinción completa y circunferencial de la membrana que es intensa en $\leq 10\%$ de células tumorales		(Será necesario segundo test, generalmente ISH)
Tinción completa y circunferencial de la membrana que es intensa en $>10\%$ de células tumorales	3+	Positivo

Figura 8. CM HER2+: Tinción completa de la proteína de membrana por IHQ (score 3+, panel A) y amplificación del gen por FISH (panel B) e ISH (panel C)



- *Índice proliferativo Ki67*: Es un antígeno nuclear utilizado como marcador de la proliferación celular y que también se determina mediante IHQ. A pesar de que hoy en día esta determinación está bien protocolizada [39], continúa criticándosele su baja reproducibilidad. En general, una alta expresión de Ki67 se ha correlacionado con tumores de alto grado histológico, negatividad de RH, peor pronóstico de la enfermedad [40, 41], y beneficio de la QT adyuvante [42]. El índice proliferativo Ki67 es, junto con RE, RP y HER2, uno de los cuatro parámetros inmunohistoquímicos utilizados para inferir el subtipo molecular del tumor [43] (véase Sección siguiente). El *cut-off* para determinar

un valor elevado no está bien establecido. En 2009 se comunicó que el valor de 13.25 era el más adecuado para distinguir tumores luminales A de luminales B [44]. Sin embargo más recientemente se ha consensuado un dintel $\geq 20\%$ para considerar un valor de Ki67 alto [45].

- *Edad*: Datos procedentes de registros de tumores establecen que la edad joven, y en particular <35 años, constituye un factor pronóstico negativo independiente del estadio, de variables histopatológicas y del tratamiento. Este exceso de riesgo en mortalidad se observa sólo en estadios precoces y viene detallado en la Tabla 8 [46]. Datos procedentes de varios grupos cooperativos oncológicos (NSABP, ECOG; SWOG e IBCSG) señalan, asimismo, que en mujeres jóvenes este exceso de riesgo viene determinado por el grupo RE+, independientemente del tratamiento adyuvante recibido (ninguno, QT, tamoxifeno o QT+ tamoxifeno) y, sobre todo, se produce a expensas del grupo que no presenta amenorrea quimioinducida [47] (Ver Tablas 8 y 9). Debe enfatizarse que precisamente las mujeres más jóvenes (<35 años) son las que presentan menores tasas de amenorrea prolongada secundaria a la QT.

Tabla 8. Exceso de riesgo en mortalidad estimado según edad al diagnóstico de CM [46]

Edad	N	SG e	SG o	ERM Crudo (IC)	ERM Ajustado (IC)
20-34	471	99.8	74.7	2.84 (2.31-3.49)	1.63 (1.32-2.01)
35-39	858	99.7	83.8	1.76 (1.45-2.14)	1.08 (0.89-1.32)
40-49	4789	99.1	88.3	1.17 (1.04-1.31)	0.84 (0.75-0.94)
50-69	15899	96.8	87.8	1.00 (ref)	1.00 /ref)

SGe: Supervivencia global esperada; SGo: Supervivencia global observada; ERM: Exceso de riesgo de mortalidad estimado; IC: Intervalo de confianza del 95%; ref: valor de referencia

Tabla 9. Riesgo de recaída según edad, estado de RH y desarrollo o no de amenorrea quimioinducida en pacientes con CM N+ incluidas en estudios del IBCSG [47]

Edad y Estado de RE	N pacientes		RR	P
	No Amenorrea	Amenorrea*		
<35, RE+	61	21	1.53 (0.80-2.94)	0.20
≥35, RE+	320	773	1.34 (1.12-1.61)	0.0014
<35, RE-	54	23	1,14 (0.42-3.15)	0.79
≥35, RE-	152	387	1.11 (0.85-1.45)	0.45

*La amenorrea inducida por QT fue determinada a los 9 meses de finalizar CMF (Ciclofosfamida, Metrotexate, 5-Fluorouracilo); RR: Riesgo relativo de recaída

- *Programa informático Adjuvant!:* Determina el riesgo de recaída y de mortalidad fundamentándose en varios factores clínicos (edad, estado menopáusico y comorbilidades) y patológicos (tamaño, grado histológico, estado ganglionar y estado de RH) de la paciente [48]. Calcula, además, el beneficio en términos de recaída y mortalidad con diferentes maniobras terapéuticas, basándose para ello en los datos del metaanálisis del *Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group* (EBCTCG) publicado en el año 1998. El programa permite redefinir riesgos en base a factores adicionales, como estado de HER2, invasión linfovascular, etc, siempre que el usuario del programa conozca el riesgo relativo asociado a dicha variable pronóstica; y sus resultados se han validado en diferentes poblaciones [49]. En los últimos años, y con la introducción de las plataformas de expresión génica, ha caído en desuso, pero continúa siendo una herramienta útil, sobre todo si dichas plataformas no están disponibles.

1.1.5. Subtipos moleculares de CM, correlación inmunohistoquímica y plataformas de expresión génica

En la última década se ha desarrollado una nueva clasificación molecular del CM no basada en los factores histopatológicos clásicos, sino en el perfil de expresión génica tumoral.

Perou y Sorlie fueron los primeros autores que clasificaron los tumores de mama en función de su perfil génico en un artículo de gran relevancia publicado en 2000 [50]. En este artículo se definieron cuatro subtipos intrínsecos de cáncer de mama: *luminal*, *normal-like*, *basal* y *HER2-enriched*. Posteriormente, los mismos autores refinaron esta clasificación y postularon que el subtipo luminal podría subclasificarse en varios subgrupos con diferente pronóstico (luminal A, B y C), mientras que el subtipo *normal-like* podría corresponder a tejido mamario normal [51].

Esta clasificación molecular tiene importancia tanto pronóstica como terapéutica. Por lo que respecta al pronóstico, el subtipo luminal A presenta la mejor supervivencia, los subtipos basal y *HER2-enriched* presentan una supervivencia muy pobre, y el subtipo luminal B muestra un pronóstico intermedio [51, 52]. Debe decirse que los datos de SG relativos al subtipo *HER2-enriched* no se corresponden con los actuales, ya que el pronóstico se estableció en ausencia de tratamientos dirigidos antiHER2, tratamientos que, hoy sabemos, han mejorado drásticamente el pronóstico de este subgrupo molecular. Asimismo la utilización de HT prolongadas más allá de los 5 años clásicamente establecidos puede mejorar el pronóstico a 10 años de los tumores luminales.

La clasificación molecular del CM tiene como principal limitación su complejidad técnica y coste, y en consecuencia, su dificultad para ser empleada en la práctica clínica habitual. Es por ello que las determinaciones histopatológicas clásicas (ej. grado histológico) y, sobre todo, las determinaciones IHQ de RE, RP, Ki67 y HER2 se están utilizando como marcadores subrogados de dichos subtipos moleculares [43, 53]. La correlación entre el subtipo molecular y su perfil inmunohistoquímico subrogado es en general buena, aunque no perfecta, y viene detallada en la Tabla 10.

Tabla 10. Subtipos moleculares de CM según el perfil inmunohistoquímico

Subtipo molecular	IHQ
Luminal A	RE+ y RP+ HER2- Ki67 bajo*
Luminal B/HER2-	RE+ HER2- Al menos uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • RP negativo o bajo** • Ki67 alto
Luminal B/HER2+	RE+ HER2+
HER2-enriched	RE- y RP- HER2+
Basal	RE-, RP- y HER2- (Tumor Triple negativo)

* Dintel recientemente aceptado para determinar Ki67 elevado: $\geq 20\%$

**Dintel aceptado para RP bajo: $\leq 20\%$

En un intento de favorecer la aplicación clínica real de los perfiles moleculares del CM, se han desarrollado en la última década plataformas de expresión génica cada vez más automatizadas y disponibles en tejido parafinado.

Dichas plataformas se han diseñado, o bien para determinar el pronóstico a 5 o 10 años de forma biológicamente robusta (OncotypeDx®[54]), MammaPrint® [55-57]; Endopredict® [58], PAM50-ROR/Prosigna® [59]), o bien directamente para determinar el subtipo tumoral (PAM-50/ROR/Prosigna® [59], Blueprint® [60]), y/o para predecir el beneficio de la QT adyuvante (OncotypeDx® [61, 62]) en pacientes RH positivo HER2 negativo.

En general puede decirse que, aunque los genes estudiados son distintos, la información proporcionada por las diferentes plataformas es bastante concordante [63, 64] e independiente de la proporcionada por los factores pronósticos histopatológicos clásicos; y que la introducción de éstas se ha basado en estudios retrospectivos o en los llamados estudios prospectivos-retrospectivos que han re-analizado muestras de pacientes que se randomizaron en estudios fase III ya comunicados y con un buen seguimiento. En base a ellos, se hipotetiza que pacientes RE+HER2- con N- o con 1 a 3 ganglios axilares con riesgo genómico intermedio, podrían no beneficiarse de QT adyuvante. Dichas hipótesis se han testado prospectivamente usando OncotypeDx® en los estudios randomizados TAILORx [65] y RxPONDER[66] de los que no se conocen todavía los resultados. Un segundo estudio prospectivo, el estudio MINDACT [67], también llevado a cabo en población N- o con 1 a 3 ganglios axilares positivos, pero esta vez usando MammaPrint®, ha randomizado a las pacientes con perfil pronóstico discordante (alto riesgo genómico, bajo riesgo clínico-patológico según el programa Adjuvant!; o viceversa) a recibir o no QT, con resultados poco concluyentes en cuanto al grupo discordante [68] Lo que sí sabemos con bastante certeza a día de hoy es que las pacientes RE+, N- con riesgo genómico bajo según OncotypeDx® que fueron prospectivamente seleccionadas en el estudio TAILORx presentan un excelente pronóstico a 5 años [69], así como las pacientes con factores clinicopatológicos favorables y bajo riesgo genómico por Mammaprint [68]

En espera de los datos completos de los estudios prospectivos mencionados, la realidad actual es que el uso de las plataformas génicas se está implementando cada vez más en las decisiones de QT adyuvante como complemento a los factores pronósticos clásicamente establecidos y/o para corroborar y/o descartar el subtipo molecular determinado por la IHQ. En base a estudios publicados recientemente es posible que se utilicen también en los próximos años para decidir la prolongación de la HT adyuvante más allá de 5 años en pacientes que han recibido o no QT adyuvante [70-73]

1.1.6. Tratamiento del Cáncer de Mama Precoz

Puesto que la presente tesis se centrará en CM precoz (estadios I a III) se explicará únicamente el abordaje terapéutico en este contexto, entendiendo que el enfoque terapéutico en CM metastásico aporta poco a la comprensión del trabajo que se presenta.

A diferencia de lo que sucede en CM avanzado, la estrategia terapéutica en CM tiene como objetivos la erradicación del tumor y la curación definitiva del paciente. Para ello se utilizarán maniobras locales y tratamientos sistémicos, de manera secuencial, y con un enfoque multidisciplinar. La primera maniobra suele ser quirúrgica en caso de tumores en estadios iniciales y tratamiento sistémico con QT, y más raramente HT, en tumores localmente avanzados inoperables y en pacientes operables, pero en los que la reducción tumoral con tratamiento sistémico puede permitir una cirugía conservadora.

1.1.6.1 Cirugía como primera maniobra terapéutica y tratamientos adyuvantes a la cirugía

La cirugía representará, en la mayoría de casos, la primera maniobra terapéutica. Además de extirpar las lesiones detectadas clínicamente, supondrá un valioso procedimiento de estadiaje. La cirugía oncológica del CM deberá incidir siempre sobre mama y axila.

A nivel de la *mama*, y teniendo en cuenta tanto el estadiaje (T del sistema TNM) como la relación entre el tamaño tumoral y de la propia glándula mamaria, se indicará tumorectomía / cuadrantectomía (cirugía conservadora) o bien mastectomía. Dado el carácter mutilante de esta última, y teniendo en cuenta los resultados de estudios randomizados ya antiguos [74] en los que se describen resultados similares en SG para la tumorectomía seguida de RT con respecto a la mastectomía, se preferirá, a ser posible, el tratamiento conservador. En la actualidad, y debido a la implementación de programas de cribado la mayoría de pacientes serán candidatas a cirugía conservadora. Pero continúan existiendo indicaciones de mastectomía, como son tumor

multicéntrico (afectación de distintos cuadrantes), presencia de microcalcificaciones difusas, antecedentes de RT sobre mama o imposibilidad para administrarla, imposibilidad de obtener márgenes negativos y carcinoma inflamatorio.

En caso de tumores invasivos, siempre se estudiará la *axila*, bien mediante biopsia selectiva de ganglio centinela (en estadíos clínicos N0), bien mediante linfadenectomía de los niveles axilares I y II de Berg (en axila clínicamente positiva), considerándose un procedimiento óptimo la extirpación de al menos 10 ganglios axilares [75, 76].

La técnica del ganglio centinela (Biopsia selectiva del ganglio centinela: BSGC) se basa generalmente en la inyección preoperatoria de un radioisótopo y detección peroperatoria mediante gammacámara de la primera estación ganglionar a la que drena el tumor, que será la axila en la gran mayoría de casos, y, más raramente, la CMI. La extirpación del ganglio/s detectado/s mediante esta técnica permitirá su estudio anatomopatológico cuidadoso (cortes múltiples y empleo de técnicas inmunohistoquímicas), lo que disminuirá la incidencia de falsos negativos y se evitará la comorbilidad asociada a una disección axilar completa [77]. La BSGC como único procedimiento quirúrgico axilar en casos de ganglio centinela (GC) negativo [pN0(sn)] ha demostrado no comprometer la recaída axilar ni la SG con respecto a añadir la disección axilar [78]. En caso de GC positivo aceptaba clásicamente que se precisaba realizar linfadenectomía, en el mismo acto quirúrgico, si se detectaba ya afectación de éste, o en un segundo tiempo, si la afectación del GC se detectaba posteriormente, tras el tiempo quirúrgico, generalmente tras la aplicación de técnicas IHQ. Este última situación, la relativa a linfadenectomías en un segundo tiempo, ha disminuido drásticamente en los últimos años, en parte debido a la implementación de técnicas automatizadas y de reacción en cadena de la polimerasa en el estudio del GC (técnica del OSNA, del inglés *one-step nucleic acid amplification*) [79], y en parte, a que en los últimos años se ha cuestionado la necesidad de realizar disección axilar en caso de afectación limitada de la axila, y siempre y cuando la paciente sea candidata a un tratamiento adyuvante sistémico óptimo [80, 81]. Así, el estudio Z011 del grupo

cooperativo americano ACOSOG [80] comunicó que pacientes clínicamente T1-T2N0, candidatas a tumorectomía y con 1 o 2 GC afectos (por micro o macrometástasis) presentaban una SG similar independientemente de si habían realizado disección axilar o no, procedimiento al que habían sido asignadas aleatoriamente. Todas las pacientes recibieron RT sobre la mama y tratamiento adyuvante sistémico. Con estos datos, que se han confirmado a 10 años [82], la opción de obviar la linfadenectomía si se cumplen todos los criterios del estudio Z011 viene reconocida en las guías clínicas más actuales [29, 83]. En la misma línea, un estudio randomizado más pequeño llevado a cabo en pacientes con micrometástasis en GC describió igualmente similar SG con o sin disección axilar adicional [81], con lo que resulta una opción cada vez más aceptada. Finalmente un tercer estudio, el AMAROS, ha comparado radioterapia (RT) axilar con disección axilar en pacientes con tumores T1-T2 y GC positivo (micro o macrometástasis) comunicando similares resultados, por lo que la RT sobre axilar puede también considerarse una alternativa razonable a linfadenectomía en esta situación [84].

Tras la cirugía se indicará un *tratamiento adyuvante*. Como adyuvante se entiende aquel tratamiento destinado a disminuir el riesgo de recurrencia local y/o sistémica, riesgo que vendrá definido por los factores pronósticos clínico-patológicos y plataformas génicas comentados en las Secciones 1.1.4 y 1.1.5. En la actualidad este tratamiento está bien establecido y recogido en guías clínicas y documentos de consenso que se revisan periódicamente [29, 83].

Con respecto a la quimioterapia (QT) adyuvante, los sucesivos metaanálisis del EBCTCG han demostrado que su administración se asocia a una mejoría en la supervivencia global independientemente de la edad, la afectación ganglionar y el estado de RH [85, 86]. La evidencia del beneficio de QT en pacientes ≥ 70 años es más limitada, al menos en los metaanálisis mencionados, pero un estudio posterior ha corroborado su beneficio en SLE y SG, sobre todo en la población con tumores RH- [87].

En ausencia de contraindicación médica, la QT adyuvante se indicará en prácticamente todas las pacientes portadoras de tumores triple negativos con ganglios positivos (N+) o sin afectación ganglionar pero considerados de

riesgo (a partir pT1b, sobre todo G3 y/o con Ki67 alto). Asimismo la mayoría de mujeres con enfermedad HER2+ recibirán QT con trastuzumab. La mayor evidencia del beneficio de la adición de trastuzumab a QT radica en pacientes con positividad ganglionar, pero también se recomiendan ambos en pacientes N-, ya a partir de tumores pT1b, o incluso pT1a, especialmente RH negativos, eso sí utilizando esquemas de QT menos tóxicos. En cuanto a los tumores RH positivos HER2 negativo, se distinguirán aquellos con factores clínico-patológicos de alto riesgo (G3, Ki67 alto) y/o que orientan a un subtipo molecular luminal B (RP negativo) de los que son consistentes con un subtipo molecular luminal A. En caso de duda, a menudo se recurre a plataformas génicas para determinar de forma robusta uno u otro subtipo y obtener datos pronósticos y/o predictivos de beneficio a la QT (Véase Sección 1.1.5). Evidentemente siempre se tendrá en cuenta la edad de la paciente, estado menopáusico, y estadiaje patológico (T y N), así como las preferencias de la paciente. Ello es así porque la mayoría de esquemas de QT conllevan una carga tóxica considerable, Los esquemas más utilizados por subtipo de CM, así como su duración y efectos tóxicos se resumen en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Esquemas de QT utilizados según subtipo molecular de CM

Subtipo	Estadaje	Esquema
Luminal A	T y N de riesgo (sobre todo >3 N+)	AC/EC x4→Ps x12 AC/EC x4 →D x4 TAC x 6 FEC x3 →D x3
	T y N de menor riesgo o riesgo de cardiotoxicidad por antraciclinas*	FAC/FEC; AC/EC
Luminal B	Tumores pequeños o riesgo de cardiotoxicidad por antraciclinas*	FAC/FEC TC x4*
	T y N de riesgo	AC/EC x4→Ps x12 AC(EC x4 →D x4 DAC x6 FEC x3 →D x3
Triple negativo	Tumores pequeños (T1a, T1b)	TC x4
	T≥1c	AC/ECx4→P(±Carbo)s x12 AC/EC x4 →D x4 DAC x 6 FEC x3 →D x3
HER2+	Tumores pequeños N0	Px12s+Trastu→Trastu hasta completar 1 año
	N0 de riesgo y N+	AC/EC x4→Ps x12+TRZ→TRZ hasta completar 1 año AC/EC x4 →D x4+TRZ→TRZ hasta completar 1 año Carbo-D +TRZ→ TRZ hasta completar 1 año

La tabla no describe todos los esquemas posibles, sino los más utilizados.

Los fármacos se administran vía endovenosa, a menos que se especifique lo contrario.

Las antraciclinas convencionales son adriamicina (o doxorubicina) y epirubicina.

En general se utilizan los mismos esquemas en el contexto adyuvante que en el neoadyuvante

En ocasiones, para minimizar el riesgo de toxicidad cardíaca asociado a antraciclinas convencionales, sin prescindir de sus potenciales beneficios. éstas se substituyen por antraciclinas liposomales.

A: Adriamicina; a 60 mg/m² en esquemas de AC o FAC/FEC, a 50 mg/m² en esquema DAC.

C. Ciclofosfamida 600 mg/m²; los esquemas de AC/EC pueden administrarse cada 3 semanas o cada 2 (con Factores Estimulantes de Colonias Granulocíticas: G-CSF) en tumores considerados altamente proliferativos

FAC/FEC: 5-Fluorouracilo 600 mg/m², adriamicina/epirubicina y ciclofosfamida 600 mg/m², cada 3 semanas, o 5FU y A/E cada 3 semanas

Ps: Paclitaxel 80 mg/m² semanal;

D: docetaxel 100mg/m² cada 3 semanas en monoterapia, en esquema DAC 75 mg/m²;

TRZ: Trastuzumab (semanal o trisemanal, a dosis de 2 mg/kg/semana o 6 mg/kg/semana, con esquemas de carga de 4 y 8 mg/kg, respectivamente); Carbo: Carboplatino (Área bajo la curva (AUC) de 2 semanal, o 6 trisemanal)

En tumores luminales o TN con ≥ 4 ganglios+, y sobre todo con más de 10 ganglios+, puede considerarse esquema denso-intenso del grupo AGO: E150 mg/m² x3 →P250 mg/m² x3 →(cada 2s) →C2000-2500 mg/m² x3, siempre cada 2 semanas y con G-CSF

Tabla 12. Toxicidad inmediata y tardía asociada a los regímenes QT más comunes

Esquema	Toxicidad inmediata	Toxicidad Tardía
AC /EC	Neutropenia /Neutropenia febril	Insuficiencia cardíaca (1%)
FAC/FEC	Astenia	Leucemia
	Nauseas/Vómitos	
	Alopecia universal	
	Mucositis	
	Anemia	
	Amenorrea quimioinducida *	

DAC	Neutropenia / Neutropenia febril Astenia Nauseas/Vómitos Alopecia universal Mucositis Amenorrea quimioinducida*	Insuficiencia cardíaca (1%) Leucemia
D 100 mg/m2	Neutropenia / Neutropenia febril Astenia Alopecia universal Artromialgias Neurotoxicidad Diarrea Reacciones infusionales Amenorrea quimioinducida*	Raramente Alopecia irreversible
P 80 mg/m2 x	Neutropenia / Neutropenia febril Astenia Alopecia casi universal Artromialgias Neurotoxicidad Diarrea Reacciones infusionales Amenorrea quimioinducida*	Neurotoxicidad persistente
CMF (ciclofosfamida oral o ev)	Neutropenia Astenia Nauseas/vómitos Mucositis Diarrea Alopecia leve Amenorrea quimioinducida*, generalmente definitiva	Amenorrea definitiva Leucemia
Trastuzumab	Reacciones infusionales Toxicidad cardíaca, sobre todo si se han administrado antraciclinas previas	Raramente toxicidad cardíaca

		persistente
Carboplatino	Anemia, neutropenia, plaquetopenia	Neurotoxicidad persistente
	Reacciones infusionales	
	Neurotoxicidad	

La HT adyuvante se indicará en todos los estadios si el tumor expresa RH y no existe contraindicación médica. Tendrá en cuenta siempre el estado menopáusico de la paciente. Los tratamientos a utilizar serán inhibidores de la aromatasa (IA) de 3ª generación (letrozol, anastrozol o exemestano) en mujeres menopáusicas, análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH) y tamoxifeno, que es activo tanto en mujeres pre como postmenopáusicas. En mujeres premenopáusicas podrán utilizarse los IA siempre que se haya suprimido la función ovárica, mediante aGnRH, cirugía o radiación ovárica. En las Secciones 1.4 y 1.6 se desarrollará extensamente dicho tratamiento.

El objetivo principal de la RT adyuvante del CM es disminuir la probabilidad de recaída locorregional. Dicho beneficio local se han traducido también en un beneficio de la SG en dos meta-análisis recientemente publicados [88, 89], y ello tanto en pacientes sometidas a cirugía conservadora como tras mastectomía. La RT adyuvante tiene indicaciones bien establecidas: En principio se realizará sobre la mama intervenida siempre que se haya realizado una cirugía conservadora, y se asociará a una sobreimpresión en la zona del lecho tumoral en mujeres <50 años y/ o tumores de alto grado. En determinadas circunstancias, como en el caso de mujeres mayores (>65 o 70 años), con tumores pequeños, hormonosensibles, puede valorarse omitir dicho tratamiento [90, 91]. Clásicamente se utilizaban esquemas de 45-50 Gy con fraccionamiento de 2 Gy en 23-35 sesiones; más recientemente hasta cuatro estudios randomizados avalan la similar eficacia de los esquemas hipofraccionados (40-42.5 Gy en 15-16 sesiones), por los que las guías clínicas actuales consideran estos esquemas cortos como igualmente válidos, e incluso preferibles por su mayor conveniencia [83, 92]. En cuanto a la RT post-mastectomía, ésta se indicará en las siguientes situaciones:

- Tumores mayores de 5 cm; en este caso se irradiará siempre la pared torácica, mientras que la irradiación de las áreas ganglionares homolaterales (región axilar, y supraclavicular) se realizará o no en función de la afectación ganglionar.
- Ante la presencia de ganglios macroscópicamente afectados, en especial si son 4 o más. Aunque todavía controvertido y pendiente de más evidencia[93], datos recientes apoyan la irradiación locorregional también cuando existen sólo entre 1 y 3 ganglios afectados [89, 94], de manera que en esta última situación de momento debe decidirse de forma individualizada. La afectación clínica de la mama interna supondrá la irradiación de ésta.

1.1.6.2 Neoadyuvancia sistémica como primera maniobra y tratamientos posteriores

El tratamiento sistémico puede tener una *intención neoadyuvante*, cuando se aplica antes del tratamiento local, que en este caso será fundamentalmente la cirugía o, más raramente la radioterapia.

En CM la neoadyuvancia con QT (con tratamiento antiHER2 si éste está indicado) ha demostrado reducir el tamaño tumoral y aumentar la posibilidad de cirugía conservadora en caso de tumores inicialmente candidatos a mastectomía, y ello sin que se comprometa la supervivencia global (SG) [95]. Para tumores operables se ha indicado clásicamente a partir de tumores de 2 cm, entendiendo que la mayoría de estos casos serían igualmente candidatos a QT adyuvante si la cirugía fuera la primera maniobra. En caso de tumores localmente avanzados (cT4 y/o cN2/N3) este tratamiento neoadyuvante tiene como objetivo reducir el tumor y conseguir la operabilidad de éste. En cualquier caso, tanto en tumores operables como en inoperables de entrada, la QT neoadyuvante permite tratar precozmente las micrometástasis establecidas, permite testar *in vivo* la sensibilidad del tumor y puede conseguir la remisión completa patológica del tumor en la pieza quirúrgica (RCp). Asimismo, se estima que la QT neoadyuvante consigue la negativización de ganglios axilares inicialmente positivos. La respuesta completa en mama y axila se ha relacionado con un mejor pronóstico en un

metanálisis reciente [96], y se considera actualmente un marcador intermedio de eficacia del tratamiento neoadyuvante. Las tasas de RCp dependerán del esquema de QT utilizado y del subtipo molecular. Las tasas de progresión tumoral durante la QT neo-adyuvante son inferiores al 5%. En general los esquemas utilizados en la neoadyuvancia son similares a los utilizados en adyuvancia, aunque ocasionalmente pueda haber diferencias regulatorias por lo que respecta a la aprobación de fármacos. Así, durante años en Europa los taxanos tenían indicación sólo en adyuvancia de ganglios positivos, pero se permitían en pacientes con ganglios negativos y tumores >2 cm candidatos a neoadyuvancia. Más recientemente, la asociación de docetaxel-trastuzumab-pertuzumab ha sido aprobada como tratamiento neoadyuvante por las agencias regulatorias americana [97] y europea [98] como tratamiento neoadyuvante para tumores HER2+ de riesgo; en cambio pertuzumab no tiene la aprobación como tratamiento adyuvante.

La HT neoadyuvante cumple la mayoría de objetivos de la QT neoadyuvante, pero en este caso con menor evidencia. A diferencia de lo que sucede con la QT no existen estudios fase III randomizados de HT neoadyuvante frente a HT adyuvante. Los estudios de mayor tamaño se basan prácticamente siempre en población postmenopáusica y demuestran la superioridad de los IA frente a tamoxifeno en este contexto [99-102]. Demuestran que pueden conseguirse tasas elevadas de cirugía conservadora y de resecabilidad en tumores inicialmente candidatos a mastectomía o bien localmente avanzados, respectivamente, mientras que los porcentajes de progresión tumoral en curso de tratamiento se mantienen entorno al 10%. En los estudios iniciales la duración de la HT neoadyuvante era de 3-4 meses, pero actualmente se tiende a esquemas de mayor duración (aproximadamente 6 meses). A diferencia de la QT neoadyuvante las tasas de RCp son anecdóticas (aprox 1% si se analizan los estudios según Intención De Tratamiento), por lo que éste no suele ser un marcador intermedio con el que analizar la eficacia de nuevos tratamientos, sino que suelen utilizarse otros parámetros (tasa de respuestas clínicas, y más a menudo valor de Ki67 a los 15 días o a la finalización del tratamiento hormonal). En cuanto al pronóstico tras HT neoadyuvante, se ha desarrollado una clasificación pronóstica

conocida como “PEPI score” (*Postoperative Endocrine Prognostic Index*) que tiene en cuenta el tamaño tumoral patológico, la existencia de afectación ganglionar, así como la expresión IHQ de RE y Ki67 en el espécimen quirúrgico, y que pretende ayudar al clínico en la decisión de administrar o no QT adyuvante [103].

Tras el tratamiento sistémico neoadyuvante debe practicarse una cirugía adecuada. Con excepción de las situaciones que contraindican la cirugía conservadora (Sección 1.1.6.1), se intentará conservar la mama, extirpando sólo el tumor residual, eso sí, con márgenes quirúrgicos negativos. El marcaje del tumor con clips radio-opacos antes de iniciar la QT puede guiar al cirujano acerca de la zona a extirpar, sobre todo en caso de respuesta completa clínica. El manejo de la axila resulta algo más complejo. Algunos grupos quirúrgicos defienden la práctica de la BSGC previamente al inicio del tratamiento sistémico, pero la mayoría de ellos lo realizan post-neoadyuvancia, junto con la cirugía del tumor primario. A la BSGC post-neoadyuvancia se le ha criticado una mayor tasa de no detección del ganglio centinela y de falsos negativos con respecto a la BSGC pre-neoadyuvancia. La BSGC post-neoadyuvancia como único procedimiento de estadiaje de la axila está indicada sólo en caso de cN0 inicial. En caso de cN+, el tratamiento estándar continúa siendo la linfadenectomía, aunque se está investigando en estudios clínicos la posibilidad de evitar la disección axilar en caso de negativización clínica y BSGC post-neoadyuvancia negativo.

En las situaciones en que se haya realizado tratamiento sistémico neoadyuvante la RT adyuvante se indicará en función del peor estadio (pre o post-tratamiento) [83]. Se indicará igualmente a) sobre la mama, siempre que se haya practicado una cirugía conservadora; b) sobre las zonas ganglionares si existe una afectación clínica inicial \geq cN2, y siempre en ganglios patológicos positivos; c) sobre pared si inicialmente cT3-cT4, con o sin irradiación de áreas ganglionares, dependiendo de la afectación patológica de éstas.

1.2. ESTRÓGENOS.

Los niveles de estrógenos circulantes, endógenos o exógenos, desempeñan un papel fundamental en la carcinogénesis del CM, tal y como ha quedado reflejado por los datos epidemiológicos comentados en la Sección 1.1. En este sentido, resulta particularmente relevante la disminución de la incidencia de CM que se ha observado en la última década con el descenso de prescripción de la THS motivada por los datos del estudio *Women's Health Initiative* (WHI) [17, 104]. La importancia de los estrógenos en el desarrollo del CM viene avalada, además, por la eficacia de las manipulaciones hormonales como tratamiento de éste una vez establecido (Véase Sección 1.4)

A continuación se describirán brevemente aspectos bioquímicos relativos a los principales estrógenos circulantes. Dichos aspectos resultan relevantes para la comprensión del presente trabajo.

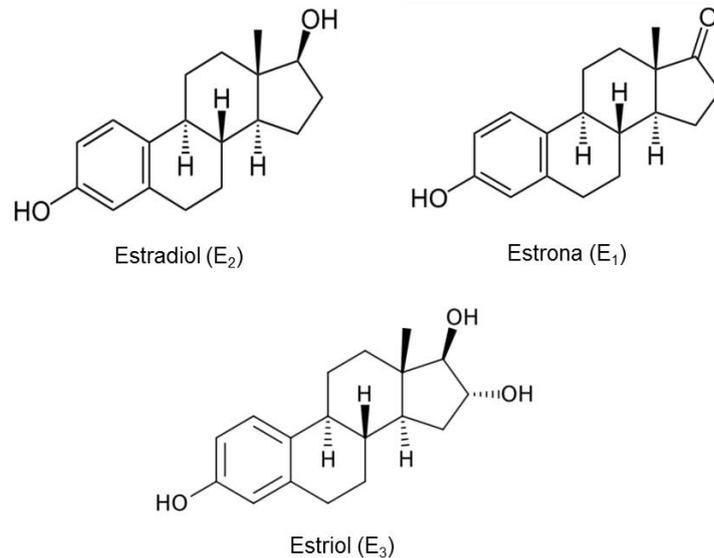
1.2.1. Formulación química

Los estrógenos naturales son moléculas esteroideas. Comprenden un total de 9 compuestos químicos. Su estructura está basada en cuatro anillos: A, B, C y D, y un grupo hidroxilo (OH) en el carbono 3 (C3) y, o bien un OH o un grupo cetona (grupo carbonilo unido a dos átomos de carbono) en C17. La molécula crítica en los compuestos estrogénicos es el anillo 3-OH. Los estrogénos principales son tres: el 17 β -estradiol (E2), la estrona (E1) y el estriol (E3) [105] (Véase Figuras 9 y 10).

En mujeres premenopáusicas la forma predominante es el E2, que es el compuesto con mayor capacidad biológica, mientras que en las mujeres postmenopáusicas la E1 y el sulfato de estrona (E1S) suponen la mayoría de estrógenos circulantes [106]. E1 tiene mucha menor capacidad estrogénica que E2 porque le falta el grupo OH en posición 17 β , de manera que su

potencia estrogénica va básicamente ligada a su conversión a E2. E3 es un estrógeno débil que se une a RE por un período de tiempo corto [107].

Figura 9. Principales estrógenos naturales



Los anillos A, B, C y D vienen ordenados de izquierda a derecha, mientras que la enumeración de los átomos de carbono viene representada en la Figura 10, que muestra la estructura química del precursor último de las hormonas sexuales, el colesterol

1.2.2. Síntesis

Los estrógenos, hormonas esteroideas formadas por 18 carbonos, se sintetizan a nivel de los ovarios, de la glándula suprarrenal y de otros tejidos periféricos (grasa, hígado, mama, tejidos neurales), a partir de compuestos de 19 carbonos, los andrógenos (androstenediona y testosterona). Los enzimas y compuestos más importantes de dicho proceso se describen a continuación (Ver también Figura 11 y 12) [108]

Figura 10. Estructura química del colesterol, precursor de las hormonas esteroideas

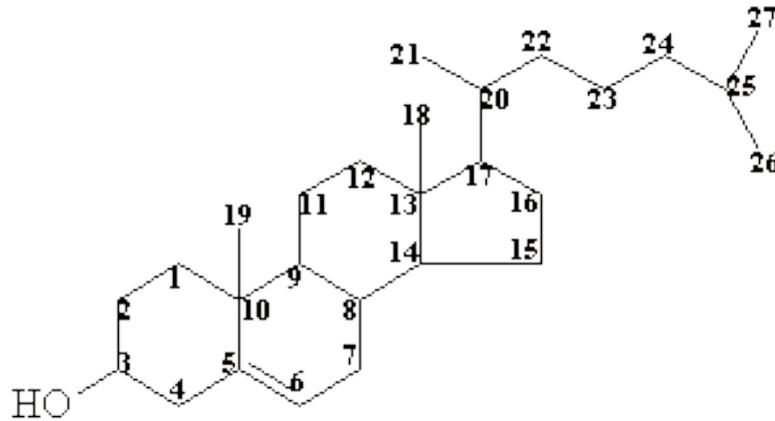
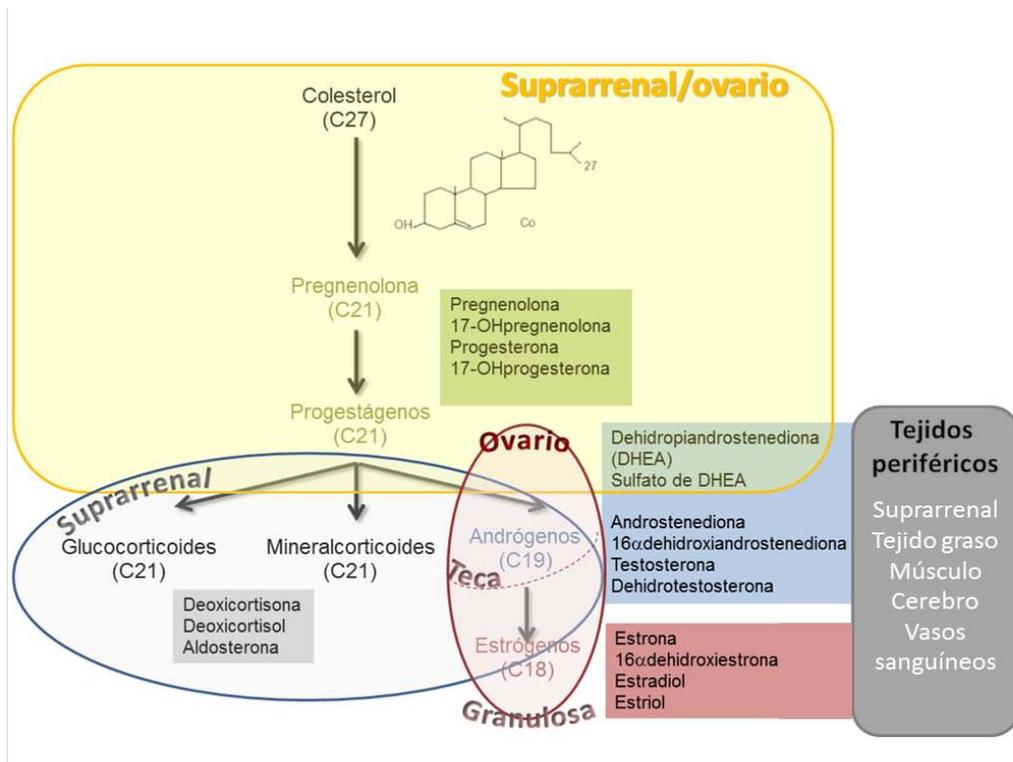


Figura 11. Esquema general de la síntesis de esteroides



C (27,21,19,18): número de átomos de carbono de cada compuesto o grupo de compuestos.

-La síntesis de los estrógenos se inicia con la formación de dehidroepiandrosterona (DHEA), un precursor de los andrógenos, a partir del colesterol. La DHEA se convertirá en androstenediona a través de la enzima 3 β -Hidroxiesteroid dehidrogenasa. La androstenediona puede convertirse a E1 o E2 directamente, o a través de la testosterona, la cual puede formarse también a partir del colesterol.

-La conversión de androstenediona a E1 requiere una *aromatización* en 3 pasos del anillo A de aquélla. Como aromatización se entiende el proceso químico mediante el cual una molécula orgánica (o una parte de ella) es convertida en un anillo bencénico (también llamado anillo aromático). En el caso de la androstenediona este proceso es catalizado por monooxigenasas de la familia del citocromo P450 (la CYP19 y la CYP11B1, sucesivamente).

-La testosterona se convierte en E2 mediante un proceso similar de aromatización, catalizado por la aromatasa CYP19.

-Por otro lado, la androstenediona y la testosterona son andrógenos interconvertibles. La androstenediona puede sufrir un proceso de reducción a testosterona, mediado por las enzimas hidroxisteroid (17-beta) dehidrogenasas 2 y 3 (HSD17B2 y HSD17B3). La reacción opuesta (oxidación de testosterona en posición 17 y conversión a androstenediona) es catalizada por la monooxigenasa CYP2C19.

-Un tercer andrógeno que sufre igualmente una aromatización en tres pasos mediada por CYP19 es la 16 α -hidroxiandrostenediona, que se convertirá en la 16 α -hidroxiestrona.

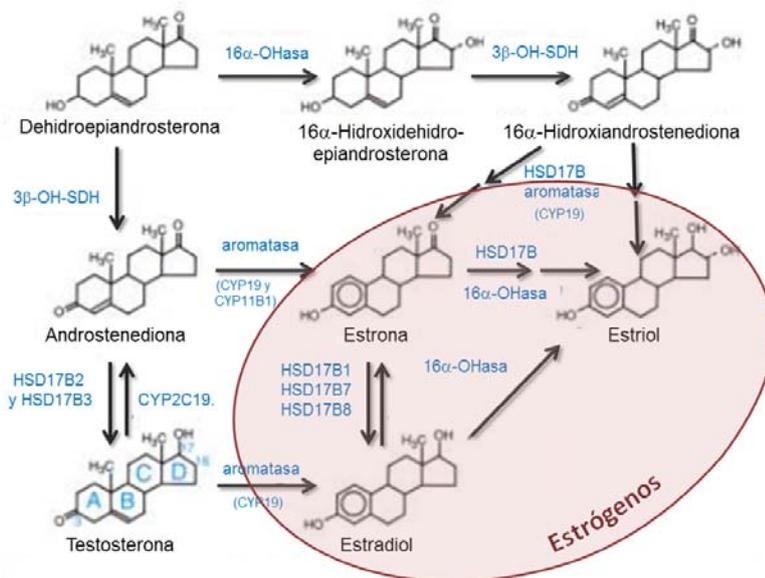
-E2 y E1 son también interconvertibles. La conversión está mediada por las hidroxisteroide (17-beta) dehidrogenasas 1, 7 y 8 (HSD17B1, HSD17B7 y HSD17B8, respectivamente).

-La síntesis de androstenediona viene controlada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a nivel suprarrenal y por las gonadotropinas (hormona foliculoestimulante o FSH, y hormona luteinizante o LH) a nivel del

ovario. En el ovario las células de la teca son las encargadas de la síntesis de androstenediona, que liberan en sangre, mientras que la síntesis de estrógenos se completa en las células de la granulosa, que contienen la enzima aromatasa (CYP19). En las mujeres premenopáusicas, las glándulas suprarrenales y los ovarios se reparten a partes iguales la producción total de androstenediona (unos 3 mg/día). Con la menopausia la producción de androstenediona se reduce a la mitad debido a la reducción de esteroides secretados por el ovario.

Mientras que en la mujer premenopáusicas la principal fuente de E2 es el ovario, la mayoría de E1 y E3 se forman en el hígado a partir del E2, o en los tejidos periféricos a partir de la androstenediona. En la mujer postmenopáusicas los precursores principales de los estrógenos en los tejidos periféricos son la androstenediona, la testosterona y la E1. La androstenediona producida en los ovarios y en la glándula suprarrenal se transforma en estrógenos en los tejidos periféricos con actividad aromatasa.

Figura 12. Proceso de biosíntesis de estrógenos



3β-OH-SDH: 3β-Hidroxiesteroide dehidrogenasa; HSD17B: 17-hidroxiesteroide dehidrogenasa; 16α-OHasa: 16α-Hydroxilasa

1.2.3 Metabolismo de los estrógenos. Carcinogénesis mamaria

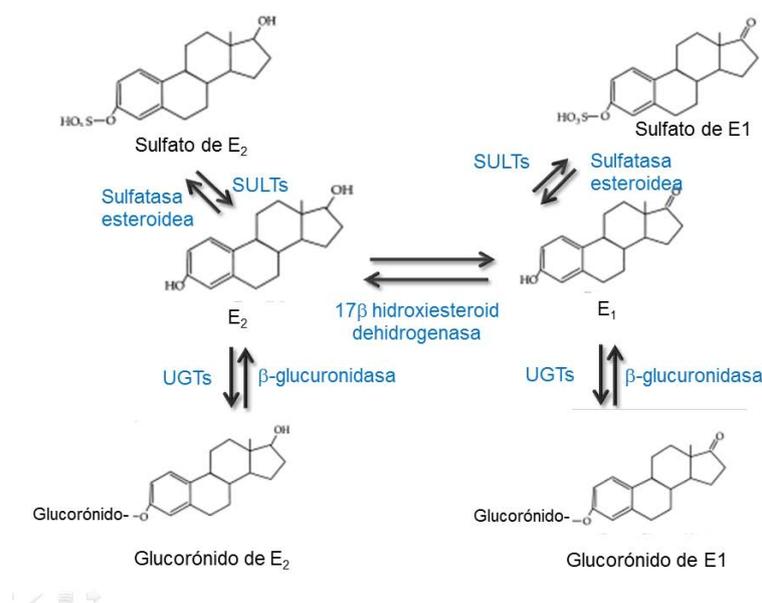
El metabolismo de los estrógenos es fundamentalmente hepático, donde existe mayor expresión de CYPs, pero también tiene lugar en otros órganos, tales como útero, mama, intestino, riñón e hipófisis [109]. E1 y E2 están sujetos a un metabolismo de fase I (procesos de oxidoreducción e hidrólisis) y un metabolismo de fase II (procesos de glucoronidación, acetilación y sulfación).

Mediante *procesos metabólicos de fase I*, E1 y E2 dan lugar a catecol estrógenos y a 16 α -hidroxiestrógenos. De los compuestos 16 α hidroxilados (generados a través CYP2D6 o CYP3A4), no se conoce bien su papel, ni a nivel fisiológico ni carcinogénico. De mayor interés, en cambio, son los catecol estrógenos, de los cuales existen cuatro compuestos: 2-hidroxiE1/E2 y 4-hidroxiE1/E2. Esta conversión química viene catalizada por el complejo enzimático CYP1A1 a nivel hepático o por CYP1B1 en tejidos extrahepáticos (mama, ovario, o útero). A su vez, estos compuestos pueden ser oxidados mediante enzimas oxidativos o iones metálicos, como Cu²⁺ o Fe³⁺, para dar lugar a semiquinonas u o-quinonas. La reacción inversa, es decir, la reducción de semiquinonas u o-quinonas a catecol estrógenos implica la liberación de especies oxígeno reactivas (EOR), como son los radicales anión superóxido y radicales hidroxilo, con el consiguiente potencial de daño oxidativo al ADN.

El *metabolismo de fase II* incluye procesos de conjugación destinados a hacer los estrógenos más solubles en agua, por tanto más fácilmente excretados, o más lipofílicos, lo que les confiere vidas medias más largas (Figuras 13 y 14). Los conjugados estrogénicos más abundantes en plasma son los sulfatos, seguidos de los glucorónidos. El sulfato de estrona (E1S) es el estrógeno circulante más abundante, con concentraciones séricas hasta 10 veces las de la E1 no conjugada. Se considera que la vía de conjugación representa un mecanismo de protección ante el daño causado por EOR. Entre estos procesos destaca el enzima catecol O-metil transferasa (COMT), que cataliza la metoxilación de 2-hidroxiestrona/estradiol o 4-

hidroxiestróna/estradiol a O-metoxiestrógenos. La O-metilación reduce las moléculas catecol circulantes, y por tanto la generación de quinonas, semiquinonas, y consiguiente reducción y formación de EOR, por lo que se considera un vía detoxificante. De hecho, hoy se acepta universalmente que altos niveles de 4-catecol-estrógenos y, en menor proporción, de 2-catecol estrógenos, así como bajos niveles de sus compuestos metoxilados, aumentan el riesgo de CM. Los metoxiestrógenos han demostrado, además, tener efectos antiproliferativos en líneas celulares de CM y se han asociado a una disminución de riesgo de enfermedad cardiovascular. Ello se ha relacionado, al menos en parte, con una disminución del metabolismo oxidativo de los estrógenos, ya que se ha demostrado que los metoxiestrógenos ejercen un *feed back* negativo sobre esta vía, al inhibir CYP1A1 and CYP1B1 [110]. Los mecanismos de carcinogénesis mamaria propuestos en relación al metabolismo de los estrógenos se muestran en la Figura 15 e incluyen iniciación tumoral a partir de mutaciones generada a partir de daño oxidativo y formación de aductos RE-DNA, así como promoción por acción del estrógeno sobre el RE y aumento consiguiente de actividad transcripcional y proliferación celular.

Figura 13. Principales vías de conjugación de E₂ y E₁



SULTs: Sulfotransferasas; UGTs: Glucuronosil transferasas

Figura 14. Formación y conjugación de Catecol Estrógenos y Estrógeno-Quinonas.

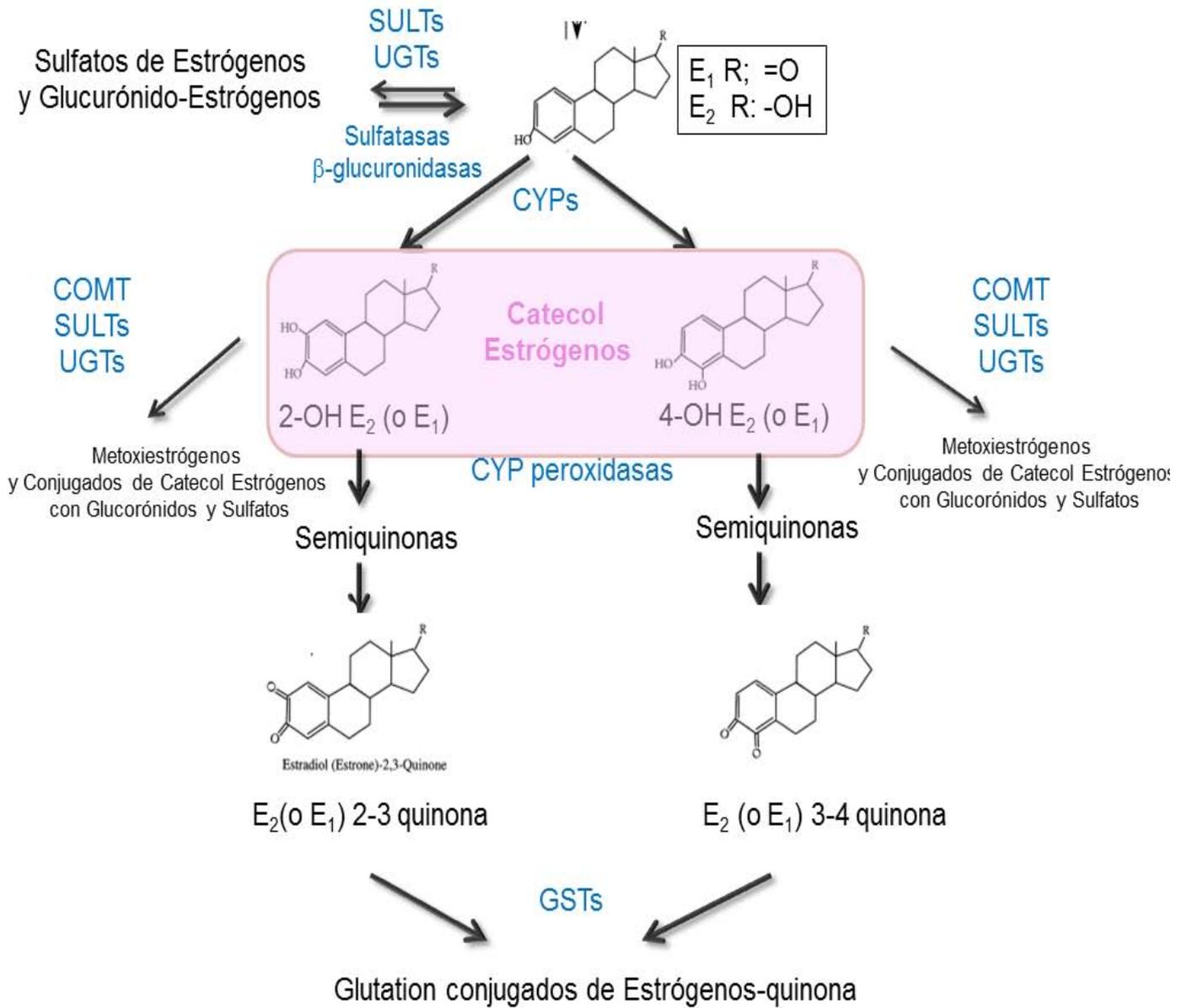
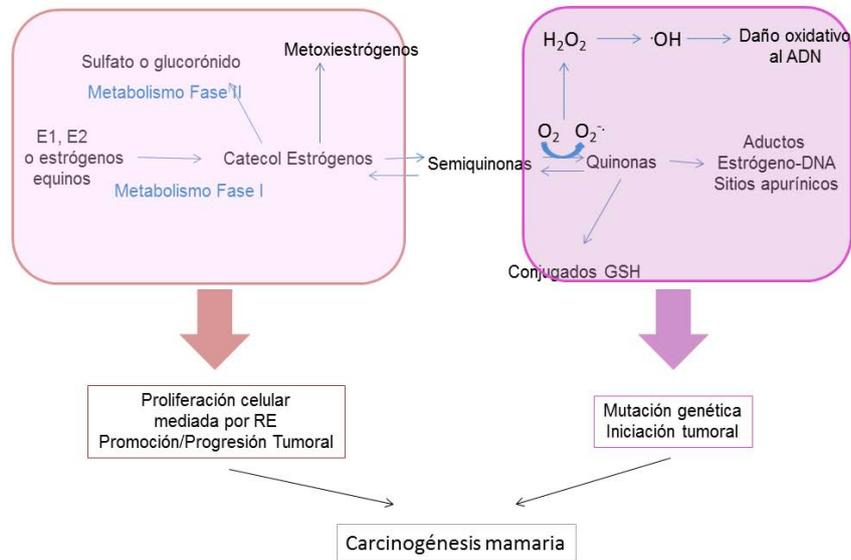


Figura 15. Metabolismo de los estrógenos y mecanismos propuestos de carcinogénesis mamaria [111]



1.2.4 Transporte en el torrente sanguíneo

La mayoría de las hormonas circulantes viajan en el torrente circulatorio unidas a proteínas séricas. En las mujeres, aproximadamente un 37% del E2 se une con alta afinidad a la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales (SHBG, del inglés *Sex Hormone Binding Globulin*), 61% a la albúmina, en este caso con baja afinidad, y sólo el 2% se encuentra libre. Tanto la fracción libre, como la unida a la albúmina son biológicamente activas, y ambas están sujetas a procesos metabólicos. E2 y E1 tienen una vida media de unos 20-30 minutos [112]. Los metabolitos de los estrógenos se unen a las proteínas séricas en proporciones variables. Mientras los metabolitos 2-OH tienen poca afinidad por la SHBG, los 2- metoxiestrógenos tienen el doble de afinidad por SHBG que el propio E2 [113]. En cuanto a E1S, ésta viaja en un 99% unida a la albúmina con una relativa alta afinidad, lo cual le confiere una vida media larga de unas 10-12 horas [112].

1.2.5 Excreción

Los metabolitos principales excretados en la orina son 2-OH-E1 y 2-OH-E2, 2-metoxi-E1, E1 no metabolizado y los productos 16 α -hidroxilados (16 α -OH-E1 and 16 α -OH-E2). La conjugación de E1 y E2 por enzimas hepáticas e intestinales genera sulfatos, que se encuentran en plasma, y glucorónidos, que son excretados en bilis y orina. Los conjugados de estrógenos de la bilis se hidrolizan en el colon por enzimas de la flora intestinal y sufren una circulación enterohepática [114].

1.2.6 Niveles fisiológicos de estrógenos circulantes

En la mujer premenopáusica existe una considerable variabilidad individual en la síntesis y metabolismo de los estrógenos, en la duración de las diferentes fases del ciclo ovárico y en los niveles séricos de hormonas sexuales. Antes de pasar a describir dichos niveles, debe mencionarse la gran diversidad de métodos de medida utilizados, con las correspondientes diferentes sensibilidades y especificidades de cada uno de ellos (Ver también Sección 1.6). Ello agranda, aún más, la variabilidad de los niveles descritos y dificulta enormemente establecer un *cut-off* generalmente aceptado para distinguir las diferentes fases y, lo que es más importante, discriminar menopausia de premenopausia.

En las mujeres con ciclos ovulatorios normales, el folículo ovárico secreta entre 70 y 500 μ g de E2 por día. En la mujer postmenopáusica, en cambio, la producción de estrógenos por parte del ovario está muy reducida y se reduce a <100 pmol/L (0 to 60 pg/mL), mayoritariamente en forma de E1.

La Tabla 13 esquematiza los niveles de E1, E2 y E1S obtenidos en un grupo de 87 mujeres pre-menopáusicas según la fase del ciclo menstrual. Las determinaciones se hicieron por duplicado y con un año de diferencia mediante métodos indirectos [115]

Tabla 13. Niveles de E1, E2 y E1S en mujeres premenopáusicas en función de la fase del ciclo menstrual [115]

	N	Muestra 1		Muestra 2*	
		Media	(SD)	Media	(SD)
Fase folicular					
E2 (pg/mL)	84	51.3	(31.8)	50.9	(36.2)
E1(pg/mL)	85	43.4	(18.7)	40.9	(17.0)
E1S (pg/mL)	32	389	(280)	410	(309)
Fase lútea					
E2 (pg/mL)	85	137	(70.8)	136	(80.8)
E1(pg/mL)	85	90.0	(43.7)	89.3	(41.3)
E1S (pg/mL)	30	668	(364)	674	(308)
Progesterona (ng/dL)	85	1107	(738)	1080	(829)

D: desviación estándar

En lo que respecta a los niveles medios de estrógenos en mujeres postmenopáusicas, se detallarán en la Sección 1.7, puesto que en este caso es todavía más crítico el método de medida utilizado.

1.2.7 Acciones fisiológicas de los estrógenos

Las acciones fisiológicas de los estrógenos vienen mediadas a través de su receptor natural (RE), del que existen 2 isoformas principales, α y β (ver Sección 1.2.8). Asimismo se sabe que una proteína de la familia GPCR (del inglés *G protein-coupled receptor*) es capaz también de unirse a E2, y no a otros estrógenos, con alta afinidad. Esta proteína, conocida como GPER (del inglés, *G protein-coupled estrogen receptor*) está situada en el retículo

endoplasmático y se le atribuyen parte de las acciones rápidas del E2 via no genómica (Sección 1.2.8) [116]

RE α está expresado en útero, vagina, células del estroma ovario, glándula mamaria e hipotálamo; en hombres se expresa en el epitelio de los ductos eferentes [117]. RE β está altamente expresado en células de la granulosa del ovario y próstata, y en menor cantidad en pulmón, corazón, intestino, cerebro y hueso [118, 119]. Ambas formas están expresadas tejidos grasos subcutáneos, así como en el sistema vascular [120]. Por último, GPER está presente en cerebro, tejidos periféricos, vena safena y arteria mamaria interna [121]. La amplia distribución, pues, de estos tres receptores justifica una gran variedad de funciones que se exponen a continuación:

- *En órganos y tejidos reproductivos*

E2, el estrógeno con mayor actividad biológica, actúa como una hormona de crecimiento para los tejidos de los órganos reproductivos. Aparte de su papel en el desarrollo de la glándula mamaria colabora en el alineamiento de la vagina, de las glándulas del cérvix, del endometrio, y de las trompas de Falopio, así como en el mantenimiento de los oocitos en el ovario. Estimula, asimismo, el crecimiento del miometrio.

- *En el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios*

El desarrollo de los caracteres sexuales secundarios también viene mediado por E2. Dicho desarrollo empieza durante la pubertad, se acentúa durante la edad reproductiva y posteriormente declina con la menopausia, a medida que el ovario deja de producir estrógenos. E2 es responsable del desarrollo normal del tejido mamario, alteración de la forma corporal, cambios en la piel y distribución de la grasa corporal característica de la mujer.

- *En el ciclo menstrual*

Durante el ciclo menstrual el incremento de niveles de E2 producido por el folículo en crecimiento (fase folicular) desencadena, a través de un *feed-back* positivo, un aumento de LH, que producirá la ovulación. Después de la

ovulación, en la fase luteal, E2 actúa conjuntamente con la progesterona para permitir la implantación en el endometrio del óvulo fecundado

- *En el embarazo*

Durante el embarazo, los niveles de E2 aumentan porque son producidos además por la placenta, y colaboran en el mantenimiento de la gestación y probablemente en el inicio del trabajo de parto.

- *En órganos no reproductivos*

E2 tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la salud ósea y de las articulaciones. Tiene un impacto muy relevante en el mantenimiento de la mineralización del hueso, de manera que la deficiencia de E2 (ya sea fisiológica, en la menopausa, o inducida por tratamientos hormonales) se asocia a un riesgo incrementado de osteopenia/osteoporosis.

A nivel del cerebro, los estrógenos han demostrado tener un efecto neuroprotector. Asimismo los estrógenos (particularmente metoxiestrógenos, (Veáse Sección 1.2.3) han demostrado tener propiedades antioxidantes y un efecto vasodilatador a nivel coronario [120, 122]. En cuanto a su acción sobre los niveles de lípidos, sabemos que las mujeres premenopáusicas tienen un perfil lipídico menos aterogénico que los hombres de edad similar, debido a un nivel mayor de lipoproteínas de alta densidad o HDL (del inglés *High Density Lipoprotein*) y a un menor nivel de triglicéridos, lo cual está claramente relacionado con una menor acumulación de grasa central. La menopausia natural o quirúrgica se asocia a un rápido cambio en esta distribución grasa y, en consecuencia, la aparición, ya a los 3 meses, de un perfil lipídico adverso [123].

1.2.8. Mecanismo molecular de acción de los estrógenos: Receptor de Estrógeno

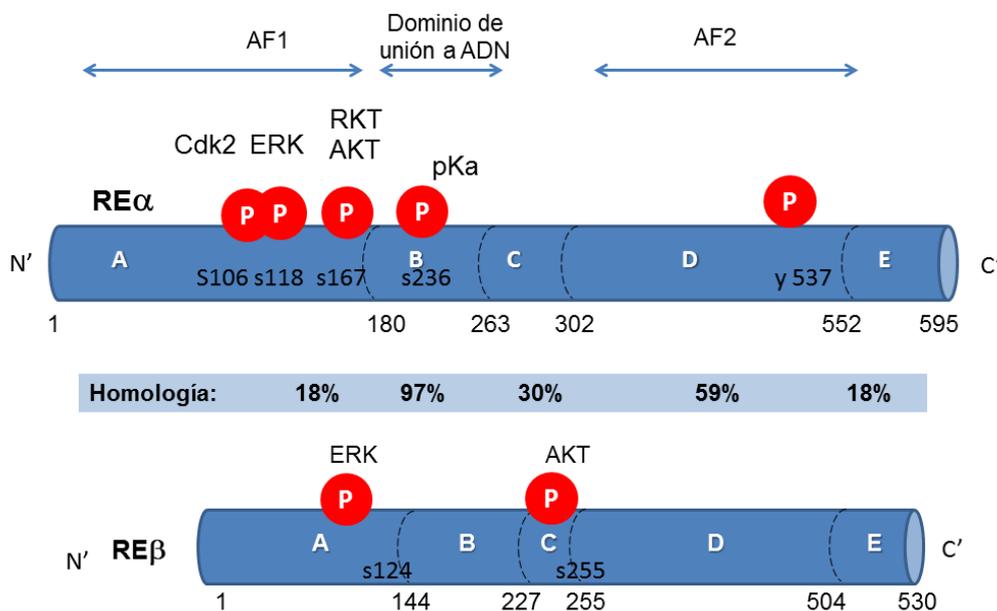
El RE es una proteína que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, que incluye los receptores de la hormona tiroidea, del ácido

retinoico y de la vitamina D [124]. RE es, básicamente, un factor de transcripción que se une al ADN, pero tiene también funciones adicionales independientes de la unión a éste [125].

Las dos isoformas más comúnmente expresadas del RE, α y β , están codificadas por sendos genes, ESR1 y ESR2. ESR1 está localizado en el cromosoma 6q (25.1), mientras que ESR2 se localiza en 14q (23-24.1) [106]

Las proteínas codificadas por dichos genes están constituidas por 5 dominios (A, B, C, D y E) y presentan una alta homología (Figura 16) [126]. RE α y RE β tienen un peso molecular de 45–66 y 53–59 kDa, respectivamente [127, 128]

Figura 16. Estructura proteica de RE α y RE β



Los números determinan la secuencia de aminoácidos. En los círculos rojos se indican los lugares de activación del dominio (por fosforilación) y de la/s molécula/s responsable/s de dicha fosforilación.

El dominio N-terminal A/B es capaz de transactivar la transcripción génica en ausencia de ligando, aunque esta activación es leve y más selectiva

comparada con la activación asociada al dominio E. También se conoce como AF-1 (del inglés *Activating Factor 1*). El dominio C, también conocido como dominio de unión al ADN, se une a zonas concretas de éste conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE). El dominio D es una región bisagra, flexible, que conecta los dominios C y E, y que, se cree, influye en el tráfico distribución subcelular de RE. Finalmente, el dominio E contiene la cavidad que se une al ligando, así como a proteínas coactivadoras y corepresoras. A nivel terciario, está configurado por hasta 12 hélices.

Es el dominio que activa la transcripción génica en presencia del estrógeno y también es conocido como AF2 (del inglés *Activating Factor 2*). En el extremo C terminal existe además el dominio F, que es variable en longitud, incluye la hélice 12 (H12) y podría explicar en parte las diferencias de respuesta de ER entre E2 y SERMs (del inglés *Selective Estrogen Receptor Modulators*) [129]

RE α y RE β se unen a su ligando natural, E2 con igual afinidad, pero, en cambio, interaccionan de forma diversa con otros estrógenos naturales o sintéticos. Así, E1 y raloxifeno se unen preferentemente al RE α , mientras que E3 y genosteína se unen preferentemente al RE β .

En respuesta a la señalización estrogénica, RE α normalmente promueve la proliferación del epitelio normal y neoplásico, mientras que RE β tiene en general un efecto antiproliferativo y pro-apoptótico.

El RE, activado por su ligando, forma dímeros, que pueden ser homodímeros RE α ($\alpha\alpha$) o RE β ($\beta\beta$) o heterodímeros ($\alpha\beta$) [130]

En principio se considera que ER es un receptor citoplasmático en su estado inactivado, pero estudios de visualización lo localizan prácticamente siempre en el núcleo celular [131].

Hoy en día se considera que el estrógeno actúa a nivel celular a través de tres mecanismos, vía genómica, no genómica y post-transcripcional (Figura 17)

Vía genómica, nuclear o clásica

Según esta vía, el estrógeno difunde libremente a través de la membrana fosfolipídica citoplasmática. En el citoplasma se une al RE, provocando que éste se disocie de la *Heat Shock Protein 90* (HSP-90), y se produzca la translocalización del complejo estrógeno-ER al núcleo. Ya en el núcleo, el complejo estrógeno-ER forma homo- o heterodímeros. Éstos se unen a secuencias específicas del ADN, los ERE, y reclutan una serie de proteínas co-represoras y co-activadoras. Las proteínas co-activadoras tienen actividad histona-acetiltransferasa, y gracias a ella, promueven la apertura de la cromatina, facilitando la transcripción génica. En cambio las proteínas co-represoras son básicamente deacetilasas que actúan sobre las histonas promoviendo la compactación de la cromatina [132]. Entre las proteínas co-represoras y co-activadoras destacan PAX2 (del inglés *Paired box gene 2*) y AIB1 (del inglés, *Amplified In Breast 1*) respectivamente, las cuales tienen un papel fundamental en la eficacia de tamoxifeno [133] (Sección 1.3.1.3).

El complejo estrógeno-ER puede interactuar directamente con el ADN a través de los ERE, o indirectamente a través de factores de transcripción, como son AP1 (del inglés *Activation Factor 2*), o Sp1 (*specificity protein 1*) [125]. Adicionalmente la presencia de E2 aumenta la expresión de los factores de transcripción relacionados con la proliferación *fos*, *myc* y *jun*. Por último, otras regiones del genoma diferentes a los EREs, como son la secuencia TGF- α (del inglés *Transforming Growth Factor α*) estrógeno-respuesta, presentan respuestas a E2, pero con menor afinidad [134]. La consecuencia final de esta transcripción génica es la activación de procesos de invasión, migración, proliferación y angiogénesis.

De la interacción ligando-RE, concentración relativa de isoformas α y β y de proteínas co-activadoras y co-represoras en cada tejido, y del tipo de ligando, el balance entre co-activación y co-represión será distinto, con lo que predominará una actividad agonista o bien antagonista [135]. Ello explica el mecanismo de acción de los llamados SERMs (del inglés *Selective Estrogen Receptor Modulators*). Como consecuencia el mismo ligando puede actuar como agonista en un tejido (en el que predominan co-

activadores) y antagonista en otro (en el que predominen co-represores). Así el tamoxifeno, el SERM más antiguo y utilizado, actúa como antagonista en mama y células de cáncer de mama, agonista sobre el hueso y tiene una actividad agonista parcial en endometrio

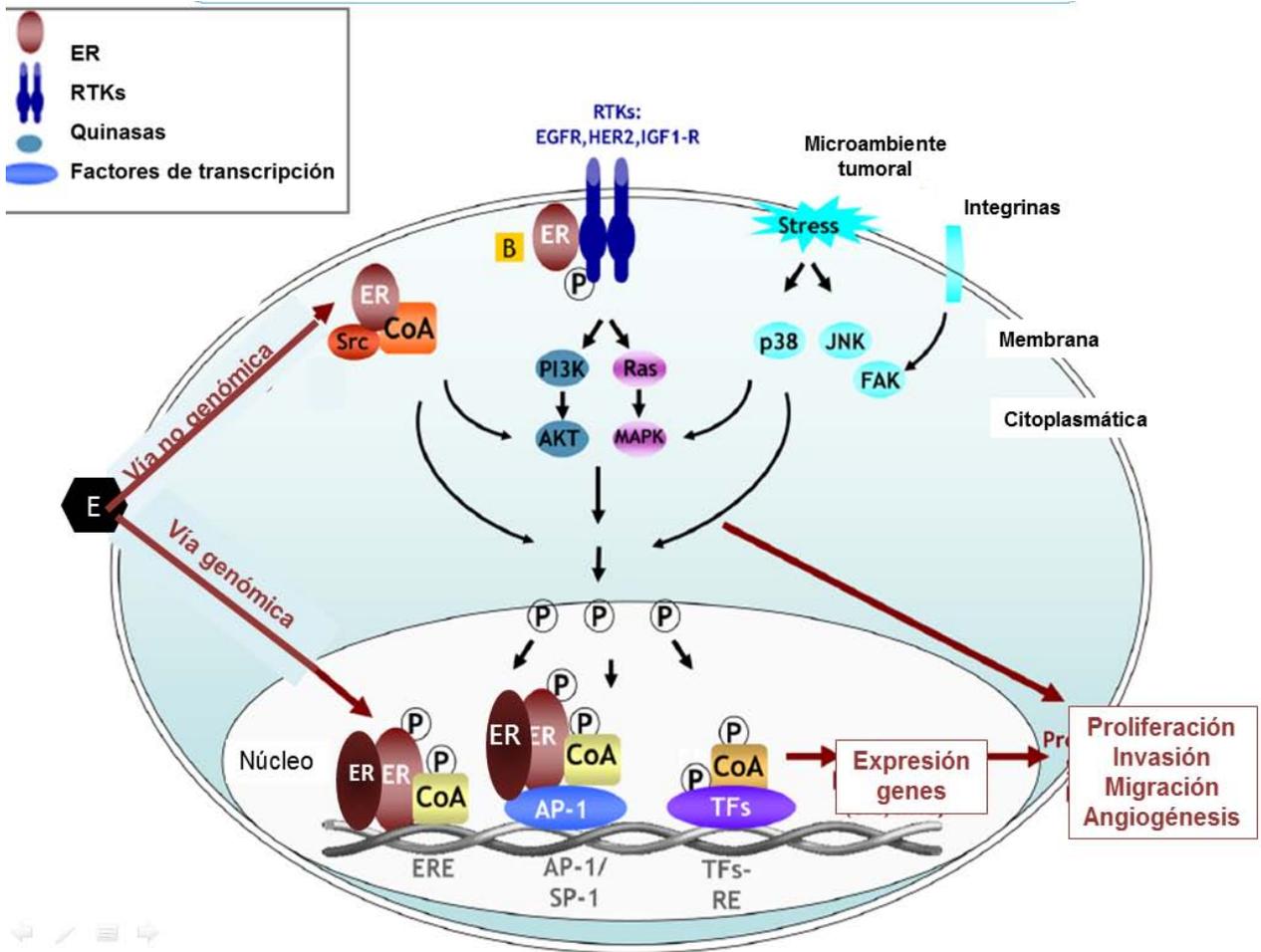
Vía no genómica

Algunos RE se encuentran asociados a la membrana celular y pueden ser, por tanto, rápidamente activados por la exposición a los estrógenos que viajan por el torrente circulatorio. Adicionalmente, algunos RE se localizan en la parte interna de la membrana celular porque forman complejos con otras moléculas, como son la caveolina-1, proteínas G, receptores tirosín-quinasa (RTK) como EGFR (del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*), y IGF-1 (del inglés *Insulin Growth Factor 1*), y proteínas con actividad quinasa que no son receptores de membrana, como Src. De la interacción RE-RTKs se deriva el envío de señales de proliferación al núcleo mediante las vías de *mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase* (MAPK/ERK) y de *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K/AKT).

Post-transcripcional

Los estrógenos pueden inducir modificaciones post-transcripcionales y post-translacionales de su propio receptor. En este sentido se sabe que E2, mediante la regulación transcripcional del factor estabilizante del ARNm, puede aumentar los niveles de ARNm del propio RE, al dificultar su degradación. De esta manera asegura la estabilidad de ER en determinados tejidos [136]. Se ha visto, además, que los SERMS pueden tener diferente eficacia, en parte, debido a diferencias en la capacidad del complejo SERM-RE de alterar la propia expresión de RE [118].

Figura 17. Mecanismo de acción del RE en CM



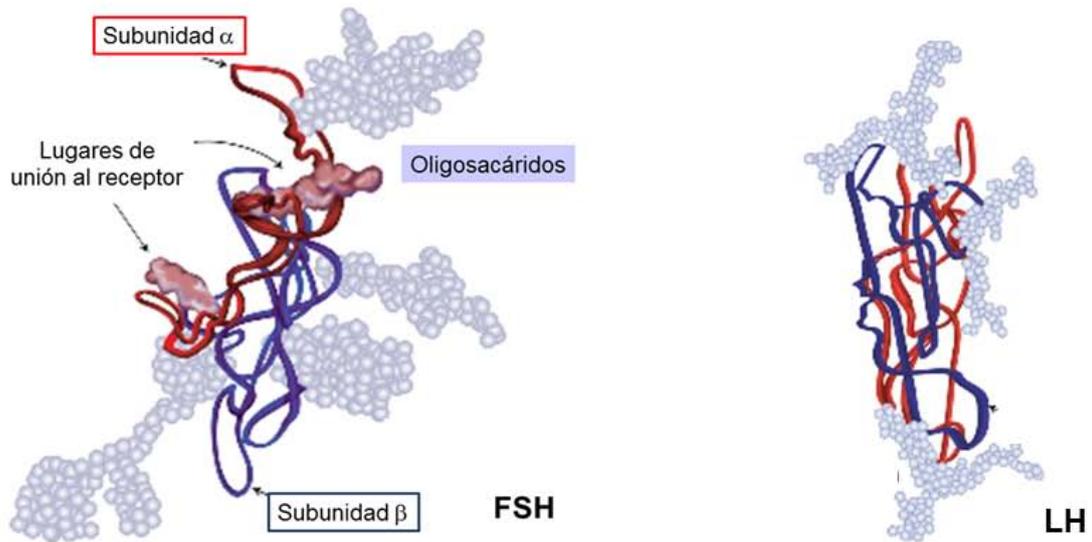
1.3 HORMONA FOLÍCULOESTIMULANTE Y HORMONA LUTEINIZANTE

1.3.1 Origen y formulación química [137, 138]

Las gonadotropinas constituyen una familia de hormonas de estructura glicoproteica (Figura 18). Dicha familia incluye la Hormona Folículoestimulante (FSH, del inglés *Follicle-Stimulating Hormone*), la Hormona Luteinizante (LH, del inglés *Luteinizing Hormone*), secretadas ambas por las células gonadotrofas de la hipófisis, y la gonadotropina coriónica (hCG, *human Chorionic Gonadotrophin*), que tiene su origen en la placenta. La Hormona Estimulante del Tiroides (TSH, del inglés *Thyroid-Stimulating Hormone*), también llamada tirotropina, es una glicoproteína estructuralmente relacionada secretada por las células hipofisarias tirotrofas. Por último, la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH, del inglés *Gonadotrophin Releasing Hormone*) es un decapeptido secretado a nivel de los núcleos pre-óptico y arcuato del hipotálamo y que, a través de la circulación hipófisis-portal, es transportada a la hipófisis anterior. Es a este nivel donde la GnRH estimula la secreción de LH y FSH. El recorrido que debe hacer para hacerlo es muy corto, lo que explica, por un lado, que pequeñas cantidades de GnRH adquieran fácilmente concentraciones suficientes como para ejercer su acción, y, por otro, que GnRH sea indetectable en la circulación periférica.

LH, FSH, TSH y hCG son glicoproteínas diméricas, formadas por 2 unidades polipeptídicas, α y β , interconectadas mediante puentes disulfuro. Cada una de las unidades va unida a un oligosacárido. La unidad α de la LH, FSH, TSH, y hCG son idénticas, y contienen 92 aminoácidos. En cambio, la unidad β varía según la hormona, confiriéndole su función biológica específica. La unidad β de la LH es similar a la de la hCG, con la que comparte el mismo receptor; sin embargo, la β -hCG contiene 24 aminoácidos adicionales y difiere de la LH en la composición del oligosacárido. La diferencia en la composición de los oligosacáridos afecta la bioactividad y la velocidad de degradación. La vida media biológica de la LH es de 20 minutos, mucho más corta que la vida media de 3-4 horas de la FSH o de las 24 horas de la HCG.

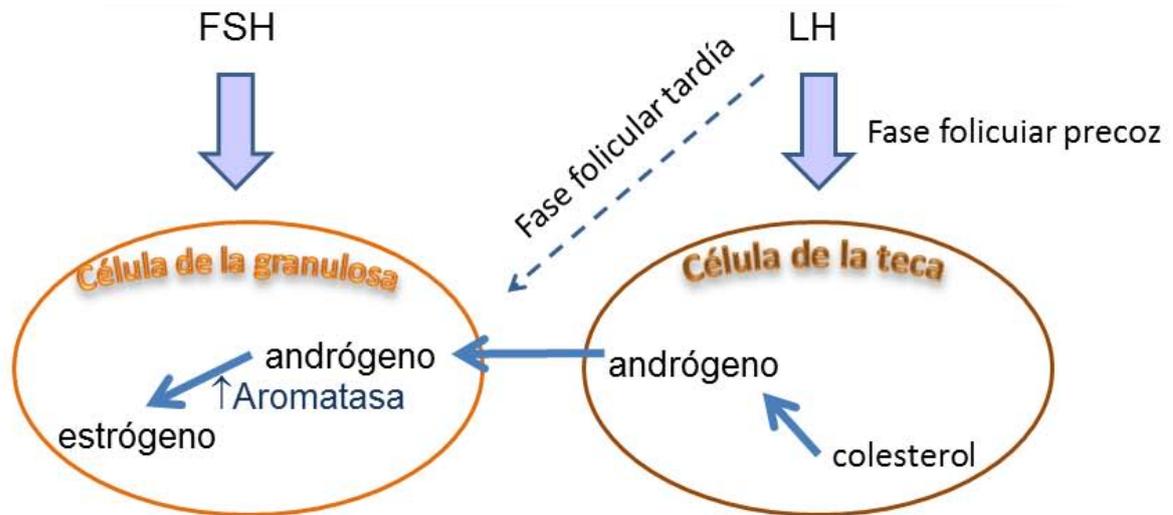
Figura 18. Estructura química de FSH y LH



1.3.2 Funciones de la LH y FSH sobre el ovario. Ciclo menstrual y mecanismos de regulación hormonal [139-142]

La LH y la FSH cooperan en su función sobre los órganos reproductivos. En la mujer FSH actúa básicamente sobre las células de la granulosa del ovario, mientras que LH lo hace sobre las células de la teca (teoría de dos hormonas, 2 células). La FSH controla el crecimiento de las células de la granulosa y la producción de estrógeno, mientras que la LH controla la ovulación y la luteinización del folículo. Las funciones principales de ambas gonadotropinas sobre el ovario se esquematizan en la Figura 19, mientras que la anatomía ovárica y las fases de desarrollo folicular se representan en la Figura 20.

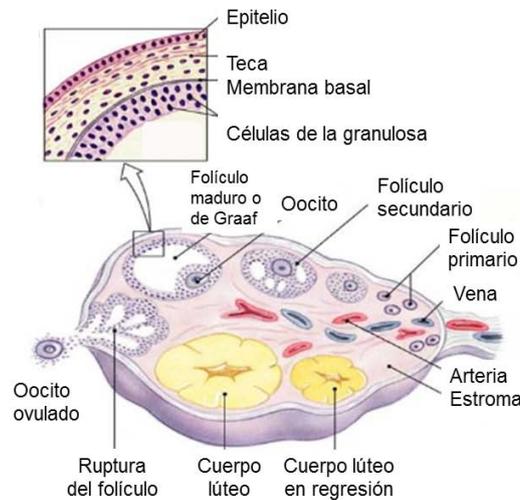
Figura 19. Acciones de la FSH y LH. Teoría de “dos hormonas, dos células”



- Crecimiento y desarrollo de las células de la granulosa
- Maduración del folículo antral
- Aumento niveles aromatasa y producción de estrógeno
- Inducción de receptores de LH en el folículo dominante
- Síntesis de inhibina

- Ruptura del folículo y ovulación 36 horas después del pico de LH
- Re-inducción de la maduración meiótica del oocito.
- Luteinización de las células de la granulosa.

Figura 20. Anatomía del ovario. Fases de desarrollo del folículo

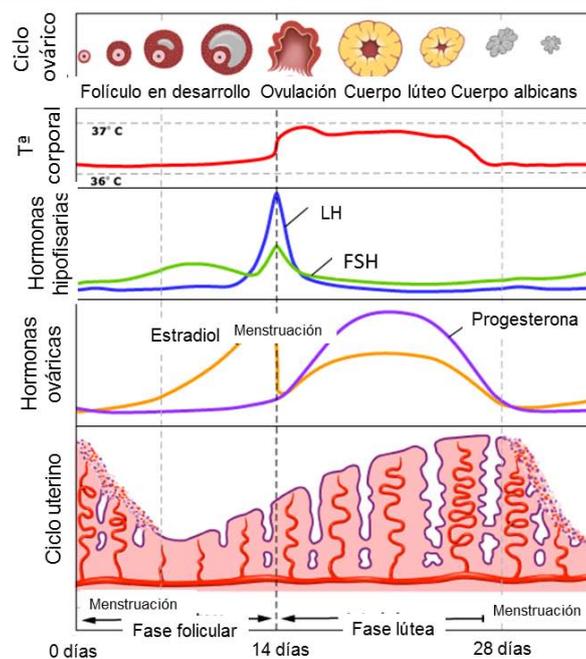


Como se ha comentado, la liberación de FSH y LH responde al control de la GnRH, que se libera en forma de pulsos. Pulsos de GnRH de baja frecuencia estimulan un ligero aumento de los niveles de FSH en la primera fase del ciclo menstrual de la mujer, lo que propicia el crecimiento del folículo, mientras que pulsos de alta frecuencia conducen a una brusca elevación de LH justo antes de la mitad del ciclo, lo cual desencadena la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Ver también Figura 21).

El ovario también desempeña un papel clave en la regulación de este proceso. Así, para asegurar la liberación de oocitos en el momento adecuado y el mantenimiento del cuerpo lúteo, ejerce un *feedback* directo sobre hipotálamo e hipófisis. Por ejemplo, los estrógenos producidos por el folículo en crecimiento inhiben la producción de GnRH en el hipotálamo, ello aumenta la frecuencia de pulsos de GnRH, con lo que se desencadena el pico ovulatorio de LH. Además de los estrógenos, otras hormonas sintetizadas en las células de la granulosa participan en la regulación de

estos procesos, como son las activinas, la folistatina, las inhibinas y la hormona antimülleriana (AMH, del inglés *Antimüllerian Hormone*). Las activinas colaboran en la función de la FSH, ya que facilitan la secreción de ésta, promueven el desarrollo folicular e inhiben la producción de andrógeno. La folistatina se une a la activina para inhibir su función biológica. En cuanto a la inhibina B, se sabe que sus niveles aumentan de forma paralela, aunque más tardía, a la FSH, y al igual que el estrógeno, es un factor inhibitorio de la secreción de FSH. Por último la AMH participa en la foliculogénesis, restringiendo la progresión del desarrollo de folículos primordiales en etapas iniciales, mientras que en etapas tardías inhibe la sensibilidad del folículo antral a la FSH, así como la actividad aromatasa. A diferencia de lo que ocurre con la inhibina y E2, sus niveles son estables a lo largo del ciclo y no están sometidos a la regulación de las gonadotropinas

Figura 21. Ciclo ovárico femenino: fases folicular y lútea, niveles hormonales y desarrollo del folículo y del endometrio en cada fase



La FSH actúa de forma sinérgica a la LH. En la mujer inicia y mantiene la maduración de los folículos, estimula la secreción de estrógenos y, en menor medida, de inhibina y de otros productos proteicos producidos por las células de la capa granulosa del folículo ovárico. Además, aumenta el número de receptores de la LH en las células diana, aumentando la sensibilidad de dichas células a la LH e induce la enzima aromatasa en estadios precoces del desarrollo folicular (al inicio, por tanto, de la fase folicular del ciclo menstrual). Durante los últimos días de dicha fase, las activinas y el E2 aumentan la acción de la propia FSH. En la segunda fase del ciclo, la secreción de la FSH se ve disminuida por la acción de los estrógenos y la inhibina B.

En base al uso de FSH en fertilización asistida, sabemos que existen polimorfismos tanto del receptor de FSH (FSHR) [143, 144] como del receptor de la LH [145], que se relacionan con niveles basales alterados de gonadotropinas y respuestas anómalas a la administración de FSH o LH exógenas.

1.3.3 Niveles fisiológicos circulantes de FSH y LH

Los niveles de la LH son altos en el momento del nacimiento por unos pocos meses y están normalmente bajas durante la infancia hasta la pubertad. Durante los años reproductivos de la mujer los valores habituales oscilan entre los 5-25 mIU/ml. Los niveles fisiológicos altos de LH se ven durante el pico de la ovulación, típicamente durando unas 48 horas, después de lo cual vuelven a sus valores normales. En la mujer menopáusica, debido a la disminución de E2 circulante, éste deja de ejercer su inhibición sobre la LH y los niveles de ésta aumentan, siendo habitual detectar valores de entre 14.2 a 52.3 mIU/ml.

En cuanto a la FSH los niveles habituales en la mujer son los siguientes: entre 0-4.0 mIU/ml antes de la pubertad, entre 0.3 y 10 mIU/ml durante la pubertad, entre 4.7 y 21.5 mIU/ml en la mujer menstruante y entre 25.8 y 134.8 mIU/ml después de la menopausia [146].

Junto con E2, los niveles circulantes de FSH y LH ayudan a establecer el estado menopáusico de la mujer. Aunque la definición de menopausia es inicialmente clínica (cese de menstruaciones durante 12 meses consecutivos, en ausencia de una condición médica o tratamiento que pueda justificarlo), existe amplia variabilidad en la definición bioquímica de ésta. No obstante, y en términos generales, se acepta que una FSH >45 mUI/mL y un estradiol <20 pg/mL definen adecuadamente el estado de menopausia siempre que sea ello congruente con la clínica, y sobre todo si se confirma en sucesivas determinaciones.

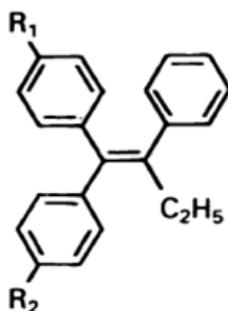
1.4. FARMACOLOGIA DE LOS AGENTES HORMONALES UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO ADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA.

1.4.1. Tamoxifeno

1.4.4.1. Categorización y formulación química

El tamoxifeno (Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, (Figura 22) es un fármaco no esteroideo utilizado durante décadas para el tratamiento del CM. Actúa antagonizando el RE a nivel del tejido mamario, aunque en otros tejidos, como el endometrio o el hueso, puede ejercer una acción estimuladora. Por este motivo se considera un *modulador selectivo del receptor estrogénico (SERM)* más que un antiestrógeno puro.

Figura 22. Fórmula química del tamoxifeno y de sus metabolitos

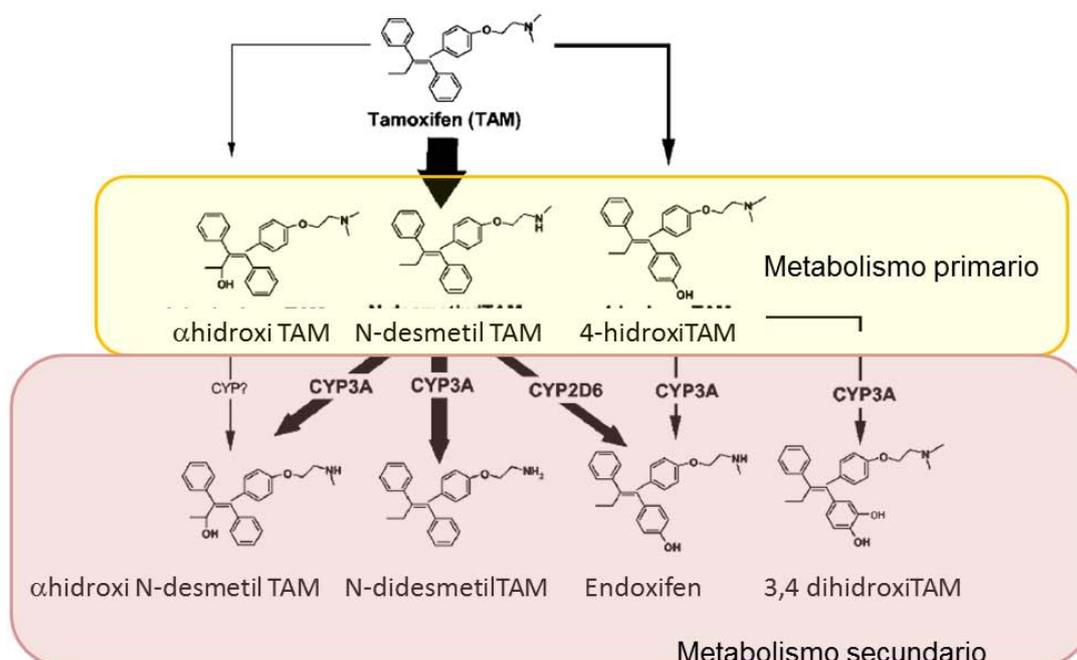


	R ₁	R ₂
Tamoxifeno	(CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ O	H
N-Desmetil tamoxifeno	CH ₃ NHCH ₂ CH ₂ O	H
γ	OHCH ₂ CH ₂ O	H
N-Desdimetil tamoxifeno	NH ₂ CH ₂ CH ₂ O	H
4-hidroxi tamoxifeno	(CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ O	OH

1.4.1.2 Farmacocinética y farmacogenómica del tamoxifeno. Interacciones farmacológicas

La formulación del tamoxifeno es oral, con una dosificación habitual de 20 mg 1 vez al día. Tras la ingesta de una única dosis oral se produce un pico plasmático hacia las 5 horas. El tamoxifeno se une a proteínas plasmáticas en un 99%. Se considera que el estado estable (*steady state*) se consigue a partir de las cuatro semanas con la ingesta oral diaria [147], mientras que el de su metabolito primario, el N-desmetil tamoxifeno se consigue a partir de las 8 semanas. La vida media calculada de éste es de unos 14 días. El metabolismo del tamoxifeno es hepático, principalmente a través de las formas 3A4/5, 2D6 y 2C19 del citocromo P450 (CYP)[148]. Dichos enzimas darán lugar a los metabolitos primarios y secundarios. Entre ellos los metabolitos dehidroxilados, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno son los que se consideran propiamente activos (Véase Figuras 22 y 23), de manera que en realidad el tamoxifeno debe considerarse como una prodroga. 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno tienen actividad biológica similar, pero las concentraciones plasmáticas de endoxifeno son 10 veces mayores, aunque existe en éstas una alta variabilidad interpaciente. Los metabolitos del tamoxifeno, a su vez, son desactivados a través de sulfotransferasa (SULT)1A1 y por UDP-glucoroniltransferasas (Figura 16). La vía de desactivación más importante es la glucoronidación, de manera que el 75% de la dosis de tamoxifeno es excretada por la bilis en forma de glucorónidos [149]

Figura 23. Metabolismo del tamoxifeno



4hidroxiTAM y endoxifeno son los metabolitos considerados activos. El grosor de las flechas explica la contribución relativa de cada complejo enzimático a la formación de cada compuesto

Puesto que el endoxifeno se considera hoy en día el metabolito del tamoxifeno con mayor actividad biológica *in vivo*, la eficacia y toxicidad de éste último se han relacionado de forma directa con la actividad enzimática del citocromo P450, en particular de CYP2D6, que es el complejo enzimático que más contribuye a su la formación de endoxifeno. La actividad de CYP2D6 dependerá tanto de polimorfismos génicos individuales como del consumo concomitante de fármacos que lo inhiban de forma potente. Hoy en día se reconocen más de 100 variantes alélicas de CYP2D6; en función de éstas la población puede clasificarse en 4 grupos: ultrametabolizadora metabolizadora, pobre metabolizadora o con metabolismo intermedio. En la población Europea aproximadamente 5-10% de los individuos serán metabolizadores pobres, y un 10-15% tendrán una actividad metabólica intermedia [150]. La población pobre metabolizadora tiene una actividad enzimática muy reducida de CYP2D6 y, en consecuencia, unos niveles

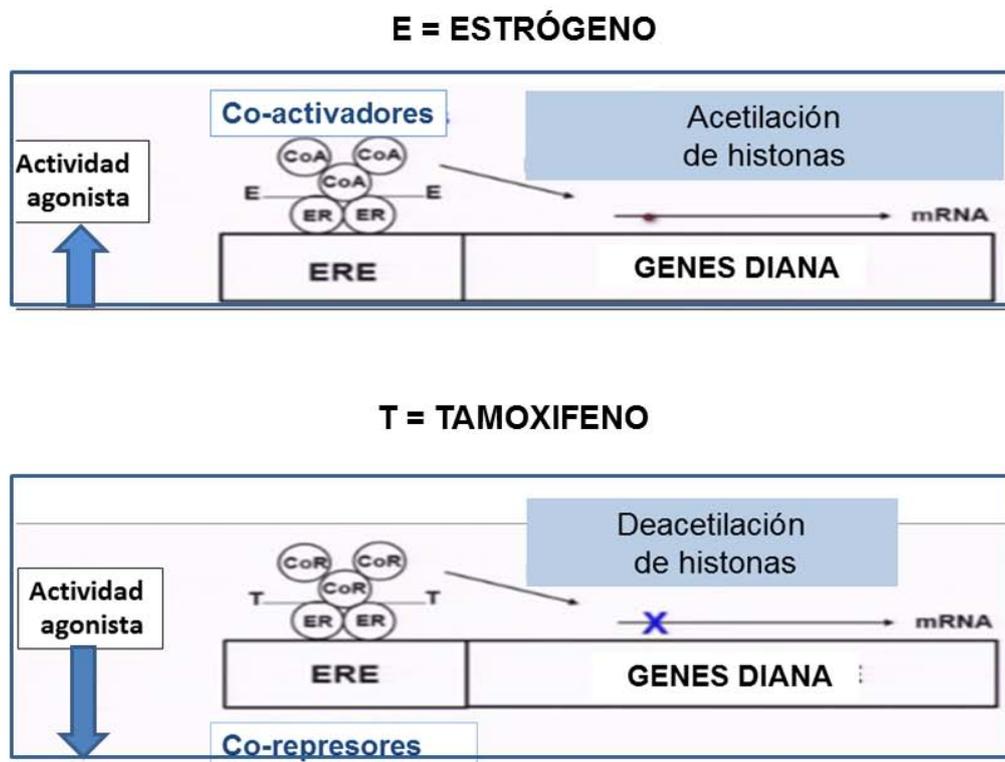
séricos de endoxifeno muy bajos [151]. Así, un estudio pionero basado en 190 pacientes tratadas con tamoxifeno adyuvante comunicó una peor SLE y una menor tasa de sofocos en la población homocigota para la variante hipofuncionante 4* (CYP2D6 4*/4*) [152]. Hoy sabemos que múltiples variantes alélicas de CYP2D6 pueden determinar un estado metabolizador pobre y no simplemente la variante 4*/4* inicialmente reportada. El beneficio clínico relativo del tamoxifeno adyuvante en pacientes según el estado metabolizador de tamoxifeno es actualmente objeto de controversia [153], de manera que, aun existiendo tests diagnósticos disponibles que determinan el estado de CYP2D6[154], su uso para decisiones clínicas no está recomendado. De hecho, se sabe que hasta un 24% de pacientes consideradas metabolizadoras pobres de CYP2D6 pueden alcanzar niveles terapéuticos de endoxifeno[155], por lo que necesariamente en la obtención de los niveles de endoxifeno deben estar implicados otros complejos enzimáticos. Así, por ejemplo, se ha visto que la población germana con dos alelos de actividad reducida de *CYP2C9* tiene niveles de endoxifeno más bajos que los individuos con los 2 alelos normofuncionantes [156].

Por lo que se refiere a fármacos que inhiben de forma potente CYP2D6, destacan los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), principalmente paroxetina y fluoxetina, sertralina y duloxetina. Su administración concomitante a tamoxifeno se relaciona con una disminución significativa de los niveles de endoxifeno séricos en pacientes con variantes alélicas que comportan metabolización rápida o intermedia de tamoxifeno [157]. En la actualidad existe un amplio consenso sobre la necesidad de evitar en lo posible la prescripción concomitante de medicación inhibidora de CYP2D6 en cualquier paciente que recibe tratamiento con tamoxifeno. En lo que respecta a los enzimas responsables de la inactivación de los metabolitos activos de tamoxifeno, no existen datos todavía en cuanto a su posible papel en la predicción de la respuesta al tratamiento. Finalmente, en lo que se refiere a la excreción de tamoxifeno, se ha demostrado que el 65% de la dosis administrada se excreta del cuerpo en dos semanas, siendo la excreción fecal la ruta primaria de eliminación [158]

1.4.1.3 Farmacodinamia

Los metabolitos del tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno y endoxifen, difunden libremente desde el torrente circulatorio hasta el citoplasma celular, donde, por un lado impiden la unión de estradiol a su receptor natural, el RE, a través de un mecanismo competitivo y, por otro, inducen un cambio conformacional diferente a dicho receptor, de manera que al complejo resultante RE-tamoxifeno (Figura 24) se unen menos agentes co-activadores y más co-represores, con lo que finalmente genes críticos para la replicación celular no pueden transcribirse.

Figura 24. Mecanismo molecular de acción del tamoxifeno



E: estrógeno; T: Tamoxifeno

Algunas de estas proteínas co-represoras incluyen NCoR 1 (del inglés, *Nuclear receptor co-repressor 1*) y SMRT (del inglés, silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors), también llamado NCoR 2)[159].

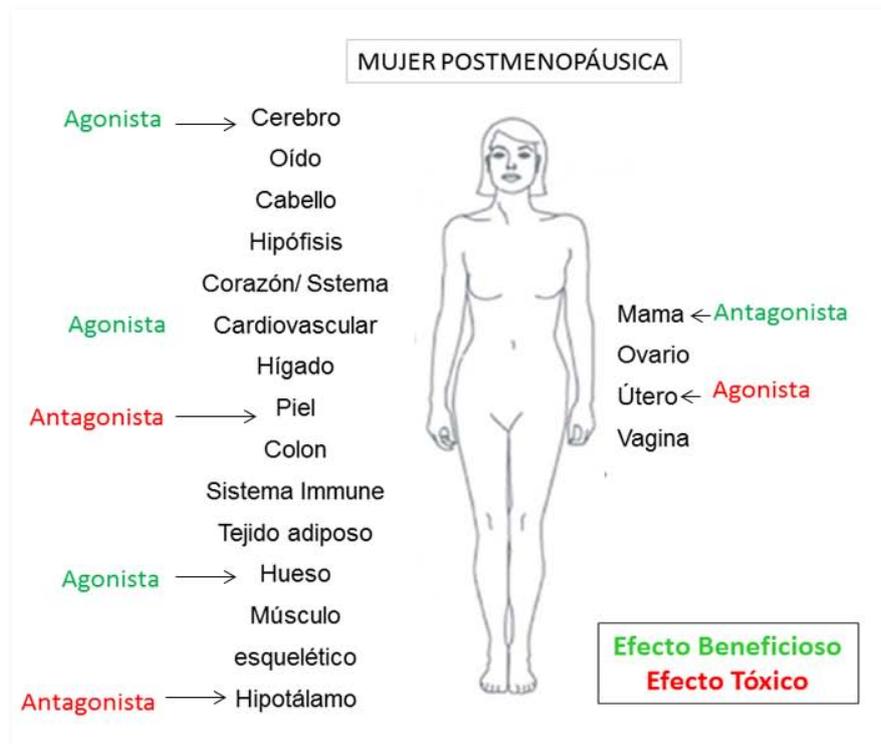
La función de tamoxifeno puede ser regulada por múltiples señales, entre las que cabe mencionar aquéllas derivadas de factores de crecimiento de membrana. Así, se ha dicho que la expresión de EGFR y HER2 conlleva la resistencia a tamoxifeno por mecanismos no genómicos, puesto que la función genómica de supresión de ER continúa inalterada. En cuanto a la vía de IGF, cabe decir que IGF-IR (*Insulin Growth Factor Receptor I*) es un gen estrógeno-dependiente, y su transcripción permanece suprimida en presencia de tamoxifeno. Sin embargo, los niveles de IGF-IR fosforilado (p-IGF-IR), la forma activa, aumenta claramente en líneas celulares de CM que desarrollan resistencia[160]. Más recientemente hemos sabido que, para tener actividad plena, tamoxifeno necesita bloquear a HER2 [133], porque altos niveles de éste se relacionan con tumores tamoxifeno-resistentes [161]. Para ello necesita la cooperación de la proteína PAX2[133], en cuya presencia el complejo tamoxifeno/ER puede suprimir la expresión de la proteína de HER2. Por el contrario, si la expresión de la proteína co-activadora AIB-1 es mayor que la de PAX2, el complejo tamoxifeno/ER regula al alza la expresión de HER2, lo que resulta en el aumento de la proliferación celular[133]

Estudios in vitro demuestran que tamoxifeno y sus metabolitos ejercen un efecto dual; en general, a concentraciones entre 5 y 12.5 μM , actúan como citostáticos, arrojando las células tumorales en fase G_0 y G_1 , y este efecto es dosis-dependiente y relacionado con su afinidad por el RE; sin embargo, a mayores concentraciones podrían tener un efecto citotóxico independiente de la presencia de RE[162]. También se ha observado en modelos animales que tiene una actividad anti-angiogénica independiente de su acción sobre el RE [163]

De la interacción tamoxifeno/RE se derivarán múltiples efectos. Como ya se ha comentado en la Sección 1.2.5, dependiendo de la concentración y proporción relativa de $\text{RE}\alpha$ i $\text{RE}\beta$ en órganos dianas y de las concentraciones

de estradiol circulantes, predominará una acción agonista (similar a un estrógeno débil) o antagonista (actividad propiamente antiestrogénica). En la Figura 25 se muestra la acción predominante del tamoxifeno sobre los órganos hormonosensibles de la mujer postmenopáusica. En ésta última, la acción antagonista en mama y carcinomas de mama se relacionará con su efecto quimiopreventivo y en eficacia antitumoral, pero a nivel del centro termorregulador del hipotálamo y a nivel de piel la misma acción antiestrogénica condicionará síntomas vasomotores (sofocos y sudoración) y sequedad cutánea; en cambio su actividad predominantemente agonista condiciona efectos beneficiosos en hueso (efecto antiresortivo), mixtos a nivel cardiovascular (descenso de colesterol, pero aumento de triglicéridos y riesgo de trombosis), y claramente perjudiciales a nivel del útero, favoreciendo el desarrollo de cáncer endometrial.

Figura 25. Actividad predominante (agonista vs antagonista) del tamoxifeno sobre los órganos hormonosensibles de la mujer postmenopáusica



En la mujer premenopáusicas, en la que los niveles de estradiol son claramente más elevados, el efecto agonista del tamoxifeno no es tan evidente a nivel del útero y a nivel del hueso predomina el efecto antagonista, por lo que el tratamiento con tamoxifeno se relaciona con pérdida de densidad mineral ósea [164].

1.4.1.4. Actividad clínica en el contexto metastásico

Desde hace más de tres décadas se sabe que el tamoxifeno es capaz de inducir respuestas clínicas y estabilizaciones prolongadas de la enfermedad en CMM.

Si nos limitamos a los estudios más recientes fase III en el que el tamoxifeno se utilizó como tratamiento hormonal de primera línea en cáncer de mama metastásico en mujeres *postmenopáusicas* vemos que en el tamoxifeno ofrece una tasa de respuestas (TR) y de beneficio clínico (BC) del 17-33% y del 38-63%, respectivamente, con medianas de tiempo hasta la progresión clínica (TTP) que oscilaron entre los 5.6-8.3 meses [165-170]. En estos estudios entre el 2 i el 23% de las pacientes había recibido previamente tamoxifeno adyuvante y se permitía la inclusión de pacientes con RH desconocidos. En mujeres *premenopáusicas* la experiencia es más limitada. Tres estudios individuales en primera línea de CM avanzado [171-173] y un metaanálisis de todos ellos (N=220) [174] describen tasas de respuesta (TR) entorno a 25%, con Tiempo a la progresión (TTP) y SG similares a las conseguidas con ooforectomía, sin que dichos TTP y SG queden claramente especificados.

En *mujeres postmenopáusicas*, dada la superioridad demostrada en estudios fase III de los IA vs tamoxifeno (ganancia media en TTP: 4.5 meses) [165-170], éste último se reserva para líneas de tratamiento más avanzadas, tras progresión a IA. En un estudio fase II randomizado de segunda línea hormonal a la progresión a IA no esteroideo (IANE) el tratamiento con tamoxifeno en monoterapia se asoció a un 13% de TR, 32% de BC y 4.5 meses de TTP [175] En pacientes premenopáusicas la estrategia secuencial hormonal a utilizar en CMM no está tan definida, pero se basa en combinación de aGnRH con tamoxifeno o IA, máxime cuando actualmente la

mayoría de pacientes ya han recibido tamoxifeno como tratamiento adyuvante.

1.4.1.5. Toxicidad

A pesar de los beneficios demostrados del tamoxifeno, tanto en el contexto adyuvante y metastásico del CM, como en el campo de la quimioprevención, debe tenerse en cuenta que se trata de un fármaco no exento de toxicidad

El efecto adverso más frecuentemente descrito son los *sofocos*, que afectan entre el 20-80 % de pacientes, según las series, y que pueden llegar a comprometer el cumplimiento del tratamiento a largo plazo. En el estudio de quimioprevención NSABP P1, en el que más de 13000 mujeres con riesgo de CM (61% mayores de 50 años) fueron randomizadas a recibir placebo vs tamoxifeno durante 5 años [176], el 68.6 vs 81.6% de las participantes, según estuvieran en uno u otro brazo de tratamiento respectivamente, experimentaron sofocos que percibían como “molestos”. El porcentaje de mujeres que experimentaron sofocos descritos como “extremadamente molestos” fue también superior con tamoxifeno (17.6 vs 10.1% de casos). Hoy sabemos que fármacos antidepresivos como la venlafaxina o antiepilépticos como la gabapentina pueden aliviar esta toxicidad, sin afectar a la eficacia del tamoxifeno.

También frecuente es el *flujo vaginal*, que se describió como molesto en 55.2 % de las pacientes tratadas con tamoxifeno en el NSABP P1, frente al 35% en el grupo que recibió placebo.

Pero los efectos tóxicos más preocupantes son la mayor predisposición a la *trombosis venosa profunda (TVP)* y al *tromboembolismo pulmonar (TEP)*, así como el incremento de riesgo de *cáncer endometrial*.

Así, el estudio NSABP-P1 describe una tasas anuales medias de *TVP* y de *TEP* de 1.34 y de 0.69 por cada mil mujeres, respectivamente, lo que representa unas unas Razones de Riesgo (RR) con respecto a placebo de 1.60 (IC 95% 0.91-2.86) para TVP y de 3.01, IC95% 1.5-9.27] para TEP. Dichos riesgos son mayores para las mujeres >50 años. En los estudios de

primera línea con CMM el riesgo de evento tromboembólico es comprensiblemente mayor, al tratarse de contexto oncológico avanzado, y oscila entre el 2.1 y el 8.2% [167, 169, 177]

En lo que se refiere al *cáncer de endometrio invasivo*, y también en base a datos del NSABP P1, el riesgo de desarrollarlo aumenta también con la edad (RR 1.21 IC95% 0.41-3.60 para las mujeres ≤ 49 años, RR 4.01 IC95% 1.70-10.90 para las mujeres ≥ 50). El RR calculado para todas las pacientes con tamoxifeno fue de 2.53 (IC 95% 1.35–4.97), de manera que las tasas de incidencia anual media pasaron de 0.91/1000 en el grupo que recibió placebo a 2.30/1000 en el grupo de tratamiento. Este riesgo es similar al descrito en el estudio NSABP-B14 [178] en el que pacientes con CM estadio I recibieron 5 años de tamoxifeno o placebo, y en el que se comunicó una tasa anual de cáncer de endometrio de aproximadamente 2 de cada 1000 mujeres tratadas con tamoxifeno. Se sabe que el riesgo aumenta con la duración del tratamiento [179], de manera que los estudios randomizados que han valorado tratamiento con tamoxifeno más de 5 años (estudios ATLAS y aTTOM y re-randomización en estudio NSABP B14 [180-182]) describen incidencias o riesgos acumulados de cáncer de endometrio entorno al 3%, superiores a los de las pacientes que interrumpieron el tratamiento a los 5 años (riesgo acumulado de 1.6% en estudio ATLAS e incidencia de 1.3% y 1.5% en estudio aTTOM y NSABP B14, respectivamente). Estas tasas se ven aumentadas en mujeres que acumulan otros factores de riesgo, tales como obesidad o tratamiento previo con THS. Afortunadamente la mayoría de estos tumores endometriales son de buen pronóstico. En el estudio NSABP-B14, 21 de 24 cánceres de endometrio asociados a tamoxifeno se diagnosticaron en estadio I de la FIGO y 18 fueron grado 1 o 2. Sin embargo, 4 de estas 24 mujeres (16%) murieron de cáncer uterino [183],.

Otros efectos adversos del tamoxifeno observados en estudio NSABP P1 se comentan en la Tabla 14. Como puede apreciarse, y en línea con lo que hemos comentado, existe en general menor toxicidad en las pacientes menores de 50 años.

Tabla 14. Otros efectos descritos del tamoxifeno con respecto a placebo en estudio NSABP P1 (N=13388) [184]

Toxicidad	Tasa anual media por cada 1000 mujeres		RR (IC 95%)
	Placebo	Tamoxifeno	
Eventos cardíacos isquémicos	2.37	2.73	1.15 (0.81-1.64)
Ictus*	0.92	1.45	1.59 (0.93-2.77)
≤ 49 años	0.39	0.30	0.76 (0.11-4.49)
≥ 50 años	1.26	2.20	1.75 (0.98-3.20)
Fractura	5.28	4.29	0.81 (0.63-1.05)
≤ 49 años	2.24	1.98	0.88 (0.46-1.68)
≥ 50 años	7.27	5.76	0.79 (0.60-1.05)
Desarrollo cataratas	21.72	24.82	1.14 (1.01-1.29)
Necesidad faulectomía	3.00	4.72	1.57 (1.16-2.14)

No se incluyen sofocos, eventos tromboembólicos ni cáncer de endometrio previamente comentados

*No incluye accidentes vasculares transitorios

1.4.1.6. Indicaciones

El tamoxifeno recibió la aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento del cáncer de mama avanzado en mujeres postmenopásicas en 1977, mientras que en 1986 obtuvo la indicación de adyuvancia hormonal en mujeres postmenopásicas con cáncer de mama precoz y afectación ganglionar [185]. Posteriormente ha demostrado su eficacia en el tratamiento de pacientes premenopáusicas, con ganglios negativos [186], CDIS [187], cáncer de mama masculino [188] y prevención del cáncer de mama [189]. En éste último contexto, y para CDIS, es el único agente hormonal aprobado, aunque también exemestano y anastrozol han demostrado eficacia en esta misma situación [190]

1.4.2 Inhibidores de la aromatasa: letrozol, anastrozol y exemestano

1.4.2.1. Enzima aromatasa. Categorización y formulación química de los inhibidores de la aromatasa

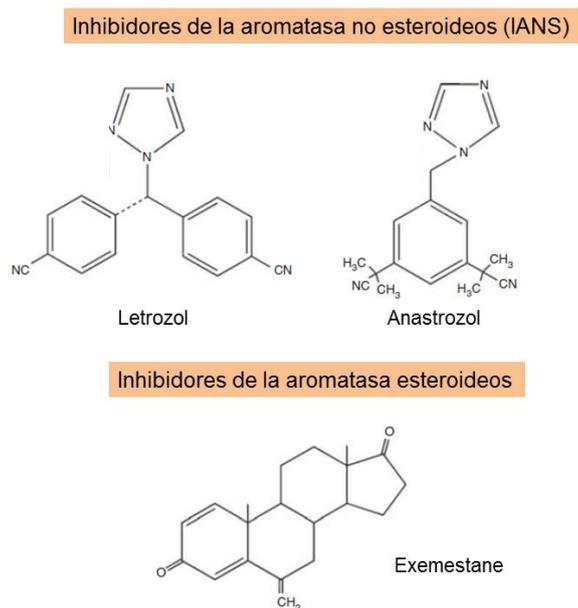
Tal y como se ha explicado en la Sección 1.2.2 la enzima aromatasa es la que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos. Este enzima está presente en la placenta y en las células de la granulosa del ovario. En el ovario su expresión dependerá de la estimulación cíclica de las gonadotropinas. La aromatasa también está presente, aunque a niveles menores, en los llamados tejidos periféricos, esto es, grasa subcutánea, hígado, músculo, cerebro, tejido mamario normal y también tejido mamario neoplásico. Con la menopausia, y con el cese de la actividad ovárica, la fuente de estrógenos predominante es el tejido graso, por lo que la actividad aromatasa y los niveles de estrógenos dependerán del índice de masa corporal [191]

Este enzima está codificado por el gen CYP19A1, localizado en el cromosoma 15q21.1. El gen comprende nueve exones codificantes, así como un número de exones no codificantes que regulan la expresión del enzima en los diferentes tejidos y ante diferentes estímulos. El tejido mamario normal expresa bajos niveles de aromatasa en condiciones fisiológicas, pero una vez tiende a la carcinogénesis se produce un cambio en los exones codificantes y la actividad catalítica del enzima aumenta significativamente en el tejido [192]. De este gen se conocen hasta 88 variantes alélicas; algunas de las cuales, se han relacionado o bien con un riesgo incrementado de CM [193], o bien con una mayor o menor eficacia al tratamiento [194, 195], o con incluso determinados efectos adversos de los IA, tales como sofocos o desmineralización ósea [196] [197]. También existe una regulación post-transcripcional de la aromatasa; así, se sabe que en CM, TGF α , EGF, FGF

(*Fibroblast Growth Factor*) e IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) aumentan la actividad aromatasa en las células de CM [198].

Los IA son compuestos que inhiben el enzima aromatasa. Los fármacos más potentes y que se utilizan en la actualidad son los de tercera generación. Disponemos de tres compuestos: letrozol y anastrozol, que son derivados triazólicos, y por tanto moléculas no esteroideas (IA no esteroideos, IANE o IA tipo II). Se caracterizan por inactivar el enzima de forma reversible. El tercer compuesto es el exemestano, que es una molécula esteroidea, y que pertenece a la clase I, inhibiendo el enzima de forma irreversible. En la Figura 26 se representa la estructura química de los 3 IA de tercera generación y en la Sección 1.3.2.3 se amplía la información sobre su mecanismo de acción.

Figura 26. Estructura química de los tres inhibidores de la aromatasa (IA) de tercera generación.



Letrozol: 4,4'-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)dibenzonitrile

Anastrozol: 2,2'-[5-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-phenylene]bis(2-methylpropanenitrilo)

Exemestano: 6-methylideneandrosta-1,4-diene-3,17-diona

1.4.2.2. Farmacocinética y farmacogenómica de los IA

Existen diferencias en los parámetros farmacocinéticos de letrozol, anastrozol y exemestano, diferencias que se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. IA de tercera generación: Parámetros farmacocinéticos

	Letrozol	Anastrozol	Exemestano
Administración	oral	oral	oral
Dosis (mg/día)	2.5	1	25
Semivida plasmática (horas)	96	21	24-47
Tiempo a la máxima supresión de E₂ (días)	2-4	2-4	7*
Tiempo al <i>Steady State</i> (días)	60**	7	7
Relación con complejos enzimáticos	Inhibición# de CYP2A6 CYP2C19	Inhibición# de CYP1A2 CYP2C8/9 CYP3A4	Metabolizado por CYP3A4

*No estudiado más precozmente,

**datos sugieren farmacocinética no linear con múltiples dosis

#Listado ordenado de mayor a menor inhibición

Con respecto al fármaco utilizado en nuestro estudio, el exemestano, se trata de un compuesto que es reconocido como un falso substrato por el enzima aromatasa y transformado, mediante un mecanismo nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) -dependiente en un compuesto intermedio que será el que inhiba irreversiblemente el enzima, y cause la inactivación de éste. Tras una única dosis de 25 mg es rápidamente absorbido, observando el máximo efecto de supresión enzimática a los tres días, efecto que puede persistir hasta 5 días [199]. El principal metabolito de exemestano, el 17-hidroexemestano, tiene una concentración plasmática 10 veces inferior a

exemestano, y es menos activo que este en cuanto a inhibición de la aromatasa, pero se une al receptor de andrógeno con una afinidad 100 veces mayor que el compuesto parental, lo que explicaría ciertas diferencias en el perfil tóxico, con respecto a los IANE, principalmente la menor resorción ósea observada [200].

1.4.2.3. Farmacodinamia y farmacogenómica

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.3.2.1, los IA se dividen en 2 tipos, a) *Tipo I, suicidas o no competitivos* y b) *Tipo II o competitivos*.

Los *tipos I* son compuestos esteroidales, análogos a la androstenediona, mientras que de tipo II son fármacos no esteroideos. En ambos casos simulan los sustratos normales (andrógenos), compitiendo con éstos por el acceso al lugar de unión del enzima. Una vez se ha unido el inhibidor no competitivo, el enzima inicia la típica secuencia de hidroxilación, pero ésta produce un enlace covalente irrompible entre el inhibidor y la proteína con actividad enzimática. Así, la actividad enzimática resulta permanente bloqueada de manera que, incluso si se retira todo el IA aún no unido, la actividad aromatasa no se reestablecerá hasta la síntesis de nuevas moléculas. En cambio, los IA competitivos pueden disociarse de su lugar de unión, permitiendo una nueva competición entre el IA y su sustrato natural. En consecuencia, la efectividad del IA competitivo dependerá de las concentraciones relativas de éste y de los sustratos naturales, así como de las afinidades relativas de ambos con respecto al enzima. Y la actividad clínica dependerá de la presencia constante del IA [201]. A diferencia de los IA de segunda generación (por ejemplo aminoglutetimida y fadrozol), que tenían efecto supresivo también sobre cortisol y/o aldosterona, los IA de tercera generación tienen una especificidad casi completa, con poco o nulo efecto sobre éstos últimos. Anastrozol es el fármaco con mayor evidencia de selectividad. Se ha visto que dosis de hasta 10 mg/día de anastrozol no impactan en los niveles de cortisol ni aldosterona [202]. El tratamiento con exemestano tampoco altera dichos niveles [203]. En cambio, varios estudios clínicos han reportado significativos descensos de

cortisol y de aldosterona con letrozol, pero en general manteniéndose éstos dentro de los límites de la normalidad y sin clínica asociada [204, 205].

Los IA están indicados únicamente en mujeres postmenopáusicas, puesto que en mujeres premenopáusicas no son eficaces o tienen incluso, una actividad estimuladora [206]. Así, en presencia de función ovárica preservada, el uso de IA lleva a un aumento de la secreción de gonadotropinas debido al reducido *feedback* negativo que conlleva el descenso de estrógenos sobre hipófisis e hipotálamo. Dicho aumento de gonadotropinas acaba neutralizando el descenso de estrógenos inicial [191].

Son varios los estudios que han estudiado la eficacia de los IA de tercera generación en cuanto a porcentaje de supresión estrogénica con respecto a los valores basales pre-tratamiento. Debido a la marcada supresión estrogénica que consiguen, y a la limitada sensibilidad de la mayoría de métodos de determinación, a menudo se ha usado como medida la aromatización total (*Total Body Aromatization*). Con ello se ha visto que los tres IA de tercera generación consiguen una media del 97% de inhibición [207-210], frente el aproximadamente 90% que conseguía la aminoglutetimida [211]. En cuanto a la mayor o menor potencia de supresión estrogénica de uno u otro fármaco, debe remarcarse que es difícil detectar diferencias, dado que los valores de estrógenos resultantes del uso de IA de 3^a generación suele estar por debajo del límite inferior de cuantificación de la mayoría de métodos, sobre todo si éstos son poco sensibles. Los porcentajes de inhibición de la aromatasa y el grado de supresión estrogénica obtenida tras tratamiento con IA de 3^a generación en diferentes estudios se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del enzima aromatasa (TBA, del inglés *Total Body Aromatization*) y descenso de estrógenos séricos obtenido con respecto a los niveles basales tras tratamiento con los diferentes IA de 3^a generación en mujeres postmenopáusicas

	Letrozol	Anastrozol	Exemesta no	Método LLQ (pmol/L)
Geisler 1996[207]				
TBA(%)	-	96.7	-	
Descenso respecto basal (%)				RIA**
E2	-	≥83.5	-	2.1
E1	-	≥86.5	-	6.3
E1S	-	> 93.5%	-	2.7
Dowsett 1995[208]				
TBA (%)	> 98.8%		-	
Descenso respecto basal (%)				RIA
E2	80%		-	3
E1	68.1		-	10
E1S	-	-	-	-
Geisler 1998[209]				
TBA (%)	-	-	97.9	
Descenso respecto basal (%)				HPLC-RIA
E2	-	-	92.2	2.6
E1	-	-	94.5	6.7
E1S	-	-	93.2	22.2
Geisler 2002 [210](estudio randomizado, cruzamiento)				RIA**
TBA (%)#	>99.1	97.3	-	
Descenso respecto basal (%)				

E2	87.8	84.9	-	2.1
E1#	84.3	81.0	-	6.3
E1S#	98.0	93.5	-	2.7
Geisler 2008[212] (reanálisis muestras 2002)				HPLC→RIA Ultra-sensible
Descenso respecto basal (%)				
E2#	95.2	92.8	-	0.67
E1#	98.8	96.3	-	1.14
E1S#	98.9	95.3	-	0.55
Dixon 2008[213] (randomizado, con cruzamiento)				RIA
Proporción de pacientes con niveles E2≥ LLQ#	2	37	-	3
E2 (media, pMol/L)∫	1.56	2.71	-	
E2 residual (%)	5.9	10.1	-	
E1S residual(%)#	2	4.6	-	15

TBA: *Total Body Aromatization*; solo se mencionan los trabajos que estudiaron letrozol, anastrozol y exemestano a dosis habituales (2.5, 1 y 25 mg/día, respectivamente). LLQ: Límite bajo de Cuantificación, del inglés *Low Limit of Quantification*. Los números de pacientes incluidos en cada estudio oscila entre 10 y 13, con la excepción del estudio de Dixon (N=54); el porcentaje de descenso respecto valor basal viene representado en media geométrica en todos los casos

Las casillas en blanco representan No evaluado o No aplicable

*Método de determinación de niveles de estrógenos circulantes

RIA: radioinmunoensayo: **para E1S se utilizó RIA precedido de técnica de purificación

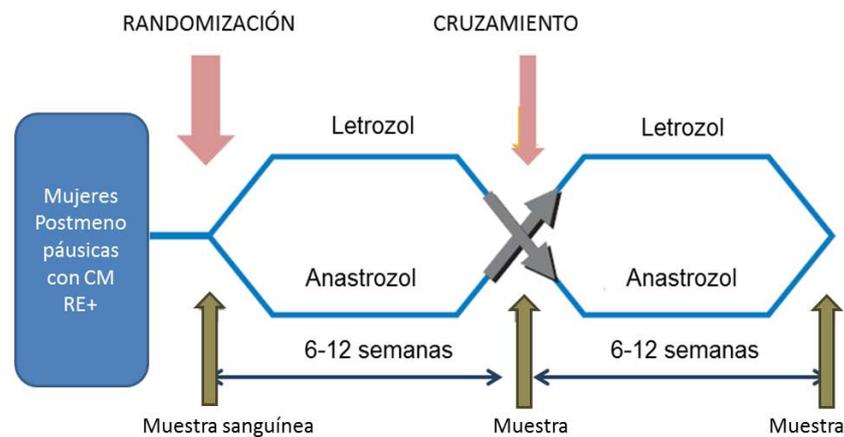
#diferencias estadísticamente significativas

∫ Valores medios calculados por extrapolación

Entre los estudios mencionados en la tabla anterior y que comparan el grado de supresión estrogénica de los diferentes IA, destacan, por su diseño, los de Geisler [212] y Dixon [213]. Ambos estudios fueron randomizados, doble

ciego, y con cruzamiento (ver esquema en Figura 27). En ambos estudios las pacientes recibían anastrozol y letrozol, de forma secuencial y durante un período corto de tiempo cada uno de ellos (6 o 12 semanas, según el estudio) La asignación consistía en recibir una u otra secuencia: letrozol→anastrozol, o bien anastrozol→letrozol. En ambos quedó demostrada la mayor potencia supresiva de letrozol. En el estudio inicial de Geisler, llevado a cabo en 12 mujeres, se observaron diferencias significativas a favor de letrozol en E1, E1S, y TBA, pero no en E2. Cuando dichas muestras se re-analizaron años más tarde utilizando técnicas ultrasensibles, con límite de detección para E2 mucho más bajo, se consiguió demostrar que también existía superioridad de letrozol en términos de supresión de E2. El estudio de Dixon, realizado en 54 mujeres, confirmó estos resultados, demostrando además que sólo 2% de pacientes en tratamiento con letrozol tenían niveles de E2 por encima del límite bajo de cuantificación (LLQ) del método (3 pmol/L), mientras que, bajo tratamiento con anastrozol, 37% presentaban niveles de $E2 \geq 3$ pmol/L.

Figura 27. Diseño de los estudios comparativos [212, 213] de los niveles de estrógenos obtenidos con letrozol y anastrozol



1.4.2.4. Actividad clínica en el contexto metastásico

Los IA, en especial los IANE, representan la primera línea hormonal en las pacientes menopáusicas con CMM que no han recibido tratamiento adyuvante hormonal, han recibido tamoxifeno adyuvante, o han recibido IA y han recaído a un año o más de haber finalizado éste. En los estudios que describieron la superioridad de IA vs Tamoxifeno se describieron tasas de respuesta (TR) de entre 21 y 33% y tiempos a la progresión (TTP) que oscilaron entre los 8.2 y 11.1 meses[165-168]. Exemestano también demostró beneficios similares en un estudio fase 3 de menor tamaño (TR 41%, TTP 10 m) [169]. En general los IA se han impuesto a tamoxifeno gracias a un incremento en la mediana de TTP de unos 4.5 meses, sin demostrar un aumento significativo en la SG, al menos en los estudios individuales. En los estudios más actuales, que han seleccionado mejor a las pacientes (todas ellas RE+, e idealmente también HER2-) la SLP es mayor a la de los estudios realizados hace 15 años, de manera que la mediana actual oscila entre los 10-14 meses [214-217], y se describen tasas de SG de entre 37.8 y 41.3 meses [112, 214].

1.4.2.5 Toxicidad

La toxicidad de los IA es diferente de la comunicada con tamoxifeno. En la Tabla 17 se detallan los efectos secundarios más comunes con respecto a tamoxifeno en los dos estudios de mayor tamaño de adyuvancia [218, 219].

Tabla 17. Toxicidad de IA vs Tamoxifeno en los estudios ATAC y BIG 1.98

	ATAC[218]	BIG1.98[219]
Comparación	A vs T	L vs T
N	6186	8010
Seguimiento	68	60.5
Efectos adversos		
Sofocos	35.7 vs 40.9	35.2 vs 39.5
	P<0.0001	

Artralgia	38.6 vs 29.4 <i>P</i> <0.0001	21.9 vs 16.5 <i>p</i> NC
Osteoporosis	NC	NC
Fracturas	11.0 vs 7.7. <i>p</i> <0.0001	7.5 vs 5.7 <i>p</i> NC
Hipercolesterolemia	NR	4.7 vs 24.1
Eventos cardíacos	NR	5.6 vs 5.4 <i>p</i> NC
Isquemia cardiovascular	4.1 vs 3.4 <i>p</i> <0.01	2.1 vs 1.7 <i>p</i> NC

A: anastrozol; T: tamoxifeno; L: letrozol; *p*NC: no comunicado: valor *p* no comunicad

Como puede observarse en la tabla 17, los IANE provocan más artralgias, fracturas poróticas, hipercolesterolemia e isquemia cardiovascular que tamoxifeno. En cambio este último tendrá mayor riesgo de sofocos, eventos tromboembólicos y cáncer endometrial.

Puesto que en la mayoría de estudios clínicos el brazo control ha sido tamoxifeno, en algunos casos es difícil saber a qué fármaco atribuir la causalidad de las diferencias observadas: así, por ejemplo, la mayor tasa de hipercolesterolemia observada con IA en estudios adyuvantes podría deberse tanto a un efecto deletéreo de IA como a un efecto beneficio de tamoxifeno, o bien a ambos. En este sentido, de cara a conocer la toxicidad intrínseca de IA, los estudios comparativos de IA vs placebo resultarán más útiles. Por ello, y porque en el presente estudio se utilizó exemestano en uno de los brazos de tratamiento, se incluye a continuación una tabla (Tabla 18) con los efectos adversos de éste vs placebo en el estudio de quimioprevención EXCEL [190]

Destaca en la Tabla 18 el hecho de que no se mencionem diferencias significativas con respecto a placebo por lo que respecta a efecto resortivo sobre el hueso clínicamente relevante, o eventos cardiovasculares. Un segundo estudio randomizado que comparó exemestano vs placebo en

pacientes con CM de bajo riesgo [220] ya había comunicado resultados similares. En este segundo trabajo, y mediante densitometrías (DMOs) seriadas, se observó que exemestano no aumentaba la pérdida mineral ósea a nivel de la columna y que ésta sólo empeoraba levemente a nivel de cuello femoral con respecto a placebo. Curiosamente se vio, además, que exemestano promovía el metabolismo óseo aumentando los niveles tanto de marcadores de resorción como de formación ósea.

Tabla 18. Efectos adversos de exemestano vs placebo con diferencias significativas en el estudio de prevención de CM EXCEL [190]

	Efectos adversos con E* (%)	Efectos adversos con P* (%)
N	2240	2248
Seguimiento(meses)	35	
Edad (mediana)	62.5	62.4
Efectos adversos		
Cuaquiera	88	85
Sofocos	40	32
Fatiga	23	21
Sudoración	22	19
Insomnio	10	8
Diarrea	5	13
Náusea	7	5
Artritis	11	9
Dolor en EEII	7	5
Dolor articular	30	27
Dolor muscular	7	9

No hubo diferencias en cuanto a proporción de HTA, pirosis, alteración del humor, depresión, sequedad vaginal, ni en los efectos adversos específicos considerados como objetivos secundarios, esto es, proporción de fracturas esqueléticas clínicas, nuevos diagnósticos de osteoporosis, eventos cardiovasculares o segundos tumores

Los IANE, en concreto anastrozol, se ha comparado directamente con exemestano, comprobándose que el perfil de toxicidad entre ambos es algo diferente. Así, un estudio fase III adyuvante que enfrentó anastrozol con exemestano en 7.576 mujeres con CM describió, con una mediana de seguimiento de 4.1 años, una mayor tasa de osteoporosis/osteopenia, hipertrigliceridemia, sangrado vaginal e hipercolesterolemia con anastrozol, mientras que la alteración de pruebas hepáticas y los episodios de fibrilación auricular, aunque raros, fueron más frecuentes con exemestano. En cuanto a síntomas vasomotores no hubo diferencias entre ambos brazos de tratamiento [221]. Se confirmó una menor resorción ósea y un perfil lipídico más favorable asociados al tratamiento con exemestano. Dichas diferencias se atribuyen, en parte, a la actividad androgénica de su principal metabolito, el 17-hidroxiexemestano [200].

Con respecto al perfil lipídico otros estudios han confirmado el perfil relativamente beneficioso de exemestano con respecto a IANE. La Tabla 19 resume dichas diferencias. [222]. En cuanto a las pacientes premenopáusicas sometidas a supresión de la función ovárica y que reciben AI, la toxicidad observada es similar a las de las pacientes con menopausia natural. En la Sección 1.5. se desarrollará también este punto.

Tabla 19. Efectos de la hormonoterapia en el perfil lipídico

	cLDL	cHDL	Total c	TG	Lp(a)	apoB
T	↓	-	↓	-/↑	↓	↓
A	↑/-	↑/-	↑/-	-	↑/-	↑/-
L	↑/-	-	↑/-	-	¿	↑/-
EXE	↓/-	↓/-	↓/-	↓	-	-

T: tamoxifeno, A: anastrozol, L: letrozol: Exe: exemestano, cLDL, colesterol en lipoproteínas de baja densidad; cHDL: colesterol en lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos, Lp(a): lipoproteína A, apoB: apoproteína B

1.4.2.6 Indicaciones

Anastrozol tiene la indicación para el tratamiento de mujeres postmenopáusicas con CM avanzado RH+, y para el tratamiento adyuvante tras 2-3 años de tamoxifeno [223]. Letrozol tiene la aprobación para el tratamiento de mujeres postmenopáusicas con CM avanzado RH+ o desconocido, y también para CM precoz de forma inicial, o tras 5 años de tamoxifeno [224]. Exemestano está indicado en el tratamiento del CM avanzado RH+ que ha progresado a tamoxifeno y también para el tratamiento adyuvante del CM precoz, tras 2-3 años de tamoxifeno, y hasta un total de 5 años de hormonoterapia [225, 226]. En la práctica los tres fármacos se usan en el contexto adyuvante (inicial, tras 2,3 o 5 años de tamoxifeno), neoadyuvante, y metastático, en situación de postmenopausia y en mujeres premenopáusicas que reciben aGnRH, aun sin disponer aún de indicación formal en este último caso. Entre los usos no aprobados de estos fármacos destaca el uso de letrozol para la estimulación ovárica, puesto que ha demostrado asociarse a una menor tasa de malformaciones congénitas que clomifeno [227]. Además, su inclusión en programas de estimulación ovárica se relaciona con menor elevación de estradiol circulante [228], lo que resulta particularmente interesante en pacientes con diagnóstico reciente de CM y que desean congelación de ovocitos o embriones previamente a la exposición a QT y a su consiguiente toxicidad gonadal.

1.4.3. Análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH)

1.4.3.1. Categorización y formulación bioquímica

Como se ha comentado en la Sección 1.3, la GnRH es un decapeptido originado en el hipotálamo que estimula la secreción hipofisaria de gonadotropinas, esto es, de LH y de FSH por parte de la hipófisis, con la finalidad última de estimular la producción de estrógenos ováricos o de andrógenos testiculares. La GnRH se libera de forma pulsátil cada 90-120 minutos. Modificaciones en la posición sexta o décima de su cadena decapeptídica (Pyr-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) produce

fármacos análogos con mayor potencia y vida media más larga que la hormona nativa. Cuando se administran de forma pulsátil, los análogos de la GnRH (aGnRH) aumentan las concentraciones de gonadotropinas en pacientes con deficiencias de éstas. Sin embargo, exposiciones continuas a estos compuestos, administrados vía subcutánea (s.c) o intramuscular (i.m), producen una regulación a la baja de los receptores de GnRH en la hipófisis [229], de manera que, paradójicamente, acaban inhibiendo la liberación de LH y FSH, con el consecuente descenso de estrógenos ováricos o de andrógenos testiculares hasta niveles de castración. A diferencia de los procedimientos quirúrgicos (ooforectomía, orquiectomía) o rádicos, esta castración médica resulta reversible al retirar el fármaco, lo que la hace particularmente atractiva en el manejo clínico de pacientes. Desde la década de los 80 estos compuestos se han utilizado para el tratamiento de neoplasias hormonosensibles, ya sea cáncer de próstata [230] o CM [231]. Los análogos GnRH disponibles en España son leuprolida, goserelina, triptorelina y buserelina. En la Tabla 20 se presenta la estructura química de todos ellos, tipo de administración, y dosis habituales.

Tabla 20. Análogos de la GnRH comercializados en España: Características

Compuesto	Fórmula química	Secuencia peptídica [∞]	Formulación galénica Mensual#	Dosis (mg)
Triptorelina (usado como sales de acetato o pamoato)	$C_{64}H_{82}N_{18}O_1$ 3	pGlu-His-Trp-Ser-Tir-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gli-NH ₂	Solución Para Inyección Im o sc	3.75 (1m) 11.25(3m)
Leuprorelina **o acetato de leuprolida	$C_{59}H_{84}N_{16}O_1$ 2	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH ₂ (Pir = L-Piroglutamil)	Micro-Cápsulas im	3.75 (1m) 11.25(3m)
Goserelina	$C_{59}H_{84}N_{18}O_1$ 4	Pyr-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly	Implante sc	3.6 (1m) 10.8 (3m)
Buserelina o acetato de buserelina	$C_{62}H_{90}N_{16}O_1$ 5	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Ser-Leu-Arg-Pro	Implante Nasal sc	1.3 (vía nasal)

[∞]Secuencia peptídica de hormona nativa: Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

referido a preparados retard o depot

*recientemente se ha desarrollado formulación sc

** aprobado inicialmente para cáncer de próstata a dosis de 7.5 mg/vial mensual y posteriormente a dosis de 22.5 mg/vial y 30 mg/via para inyección intramuscular depot cada 3 y 4 meses

1m: formulación mensual; 3m: formulación trimestral

1.4.3.2. Farmacocinética y farmacodinamia. Concepto de fenómeno de fin de dosis

- *Goserelina*: La mayoría de estudios sobre farmacocinética de los aGnRH se han realizado en pacientes con cáncer de próstata y en muchos casos, con goserelina. En base a ellos sabemos que la administración trimestral de un implante depot de 10.8 mg, se obtiene una concentración máxima de 8-10 ng/mL a las 2 horas, con un segundo pico plasmático a las 7 semanas de la administración. La unión a proteínas plasmáticas de la goserelina es baja, de entre el 20-30%. El mecanismo principal de aclaramiento de la goserelina y de otros aGnRH es la hidrólisis de los aminoácidos del extremo C terminal. La excreción es urimaria. En pacientes que han recibido formulaciones de liberación rápida la vida media de goserelina es 2 a 4 horas en pacientes con función renal normal, mientras que pacientes con insuficiencia renal presentan vidas medias del fármaco más prolongadas. La farmacocinética de goserelina no se altera en pacientes con insuficiencia hepática. La vida media de eliminación es de unas 4 horas. La relación farmacocinética/farmacodinámica es no-lineal (respuesta *on-off*) y tiempo-dependiente debido a que la desensibilización de la hipófisis, una vez conseguida, se puede mantener con dosis muy bajas de goserelina. Se desconoce la concentración exacta de ésta requerida para desensibilizar los receptores de la hipófisis [232, 233]. La mayoría de estos conceptos son aplicables al resto de aGnHR.
- Con *leuprorelina* sabemos que después de la administración del preparado mensual de 3.75 mg, el pico sérico se consigue en 1 hora, seguido de una rápida caída en las siguientes 24 horas. A partir de entonces se consigue una meseta que se mantiene unas 5 semanas, y que se debe a la liberación a velocidad constante de leuprorelina a partir de su implante. Con la formulación trimestral (11.25 mg), al igual que pasa con la mensual, se consigue un pico

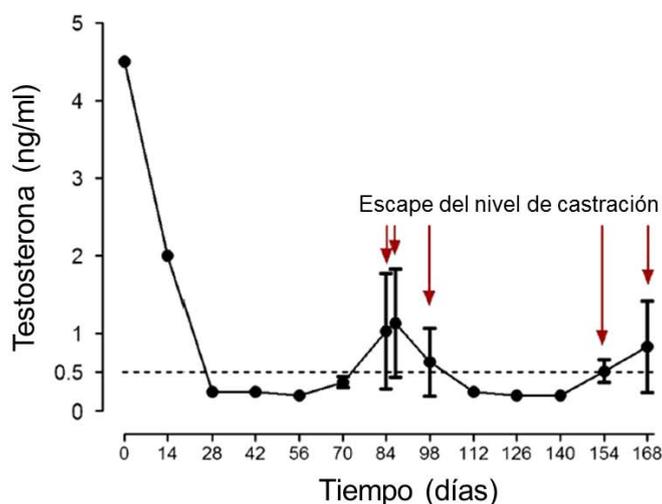
inicial, seguido de una liberación constante. El preparado trimestral muestra una mayor concentración máxima (C_{max}) media (20.8 mg/mL) que la mensual (10.7 ng/ml), pero ello no influye en el aumento de los niveles de testosterona. La C_{max} ocurre a las 3 horas con la formulación trimestral y después de una hora, en la mensual. Durante el estado de equilibrio se observa una liberación constante, que empieza el día 3 en el preparado mensual y el día 7 con el trimestral [234].

- *Buserelina subcutánea depot*: el perfil de liberación es bifásico: la liberación inicial (Tiempo a C_{máx} <1 día) es seguida por una fase de liberación lenta continuada a lo largo del intervalo de dosificación de 3 meses (dosis total 9,9 mg). La biodisponibilidad del implante de buserelina es aproximadamente del 72% tras la inyección subcutánea. La exposición sistémica a la buserelina es suficiente para originar la supresión de testosterona hasta niveles de castración durante el intervalo de dosificación. En mujeres, tras administración de una dosis única de 3.6 mg, la supresión de la secreción de E2 tuvo una duración aproximada de 42 días (intervalo: 21 a 56 días). Tras la inyección, se observó una elevación del nivel de progesterona (indicativa de ovulación) transcurridos 83 días, aproximadamente (intervalo: 62 a 99 días) y la menstruación se reinstauró transcurridos aproximadamente 98 días de la inyección. La buserelina circula en el suero predominantemente en forma inalterada. La unión a proteínas es de aproximadamente el 15% [235]
- *Triptorelina*: En mujeres, tras la inyección intramuscular, el nivel máximo de triptorelina en sangre se obtiene entre las 2 y 6 horas posteriores a la inyección, el valor máximo que se alcanza es de 11 ng/ml. No hay evidencia de acumulación del producto después de 6 inyecciones mensuales. El nivel mínimo en sangre oscila entre 0,1 y 0,2 ng/ml. La biodisponibilidad del producto de liberación sostenida es de aproximadamente el 50%[236].

Con *todos estos aGHRH* puede producirse el llamado *fenómeno de fin de dosis*, que consiste en el agotamiento prematuro de la formulación depot, con la consiguiente elevación de los niveles de hormonas sexuales [232]. Este fenómeno, que viene ilustrado en la Figura 28, se ha descrito particularmente en cáncer de próstata y, en general, con preparados trimestrales. No existen

referencias específicas a este fenómeno como tal en mujeres que han recibido aGHRH, ya sea por patología ginecológica benigna o por CM, pero parece razonable suponer que este fenómeno también puede existir en este contexto y dar lugar a una supresión estrogénica subóptima.

Figura 28. Fénomeno de *fin de dosis*: escape de los niveles de testosterona por encima de los niveles de castración por agotamiento prematuro del preparado trimestral depot de aGHRH en pacientes con cáncer de próstata



1.4.3.3. Comparación entre compuestos y formulaciones. Datos sobre supresión estrogénica obtenida

Se asume que la potencia de estos compuestos, en términos de capacidad de supresión estrogénica es similar. Sin embargo, pueden existir pequeñas diferencias. Filicori M. *et al* [237] compararon la eficacia relativa de formulaciones depot mensuales de goserelina, leuprolide y triptorelina, administrados durante 3 meses, en relación a un preparado de buserelina a altas dosis, cada 12 horas. Se estudiaron 40 mujeres que menstruaban regularmente, 10 en cada grupo de tratamiento. A todas ellas se les realizó un test de estimulación de gonadotropinas (100 microgramos endovenoso) antes del tratamiento y los días +1 y +28 de la última dosis de éste. En el día +1 de

la última dosis (día +57 desde el inicio del tratamiento) se observó que los niveles de E2 estaban en el rango de la castración (75pmol/L = 20 pg/mL en todas las mujeres tratadas con busarelina cada 12 horas, mientras que en los grupos tratados con preparados depot existía un total de 5 mujeres con niveles de E2>20 pg/mL (2 con goserelina, 1 con leuprolide y 1 con triptorelina). Además en el día +28 des de la última dosis (día +84 desde el inicio del tratamiento), 2 de las 10 mujeres asignadas a goserelina presentaron sangrado vaginal y niveles de E2 superiores a los de castración, hallazgos que no se observaron en los otros tres grupos. Los autores concluyeron que existían signos de bloqueo incompleto de la función ovárica en el tercer mes de tratamiento, en particular cuando se utilizaba goserelina. Adicionalmente también observaron: a) una tendencia a incremento de la FSH con las formulaciones depot, hecho que no se observaba con la administración de busarelina cada 12 horas y b) existía un marcado descenso de la LH y una inhibición profunda de la respuesta de ésta a la estimulación por GnRH en todos los grupos. La existencia de una posible supresión subóptima con goserelina se corroboró en un trabajo adicional, llevado a cabo en 119 pacientes con endometriosis y tratadas con goserelina durante 6 meses, en el que se describió persistencia de sangrado uterino en 11 casos (9%) [238] .

Continuando con los estudios comparativos entre compuestos, un segundo estudio randomizado, doble ciego, de 6 meses de duración y con cruzamiento en un subgrupo de pacientes, enfrentó triptorelina con acetato de leuprorelina en 48 mujeres con endometriosis [239]. En ambos grupos la dosificación fue de 3.75 mg cada 4 semanas. Algunas pacientes recibieron tres meses de cada fármaco. Se observaron similares niveles de E2, FSH y LH en ambos grupos, aunque el retorno de menstruaciones fue significativamente más rápido con leuprorelina ($p=0.002$). Finalmente, goserelina 3.6 mg s.c.se comparó con triptorelina 3.75 i.m., ambas cada 28 días, en 32 mujeres a las que se iba a efectuar cirugía de leiomiomas uterinos [240]. Se observó similar reducción de E1 y E2 a nivel del tejido endometrial.

En cuanto a la vía de administración, y en referencia al compuesto que se utilizó en la presente tesis, triptorelina, cabe decir que existe tanto en

formulación sc como im. Ambas se han comparado a la dosis de 3.75 mg cada 28 días en 40 mujeres con miomas uterinos o endometriosis [241]. Se demostró similar equivalencia a nivel clínico y bioquímico pero más efectos adversos (irritación local, cefalea, sudoración y dolor, prurito, depresión) con la formulación subcutánea, que además se asoció a períodos de amenorrea significativamente más largos.

En lo que se refiere a la potencia relativa de los preparados mensuales vs trimestrales, debe mencionarse que en el tratamiento del cáncer de próstata se usa habitualmente la formulación trimestral, mientras que en CM clásicamente se ha considerado más segura la administración mensual (supuesta menor posibilidad de fenómeno de fin de dosis). La supresión estrogénica hasta niveles de menopausia, como se comentará repetidamente en este trabajo, resulta crucial si se utilizan concomitantemente IA, ya que éstos sólo actúan plenamente en situación de óptima castración.

Un estudio realizado en el contexto adyuvante (Estudio TABLE), publicado en 2007[242], utilizó acetato de leuprorelina trimestral en monoterapia en 299 pacientes con CM precoz, demostrando la existencia de un 10.4% de mujeres con supresión estrogénica subóptima con este esquema ($E_2 > 30$ pg/mL en 2 determinaciones consecutivas). En este estudio no existió un brazo comparador con leuprorelina mensual. Más recientemente se han publicado estudios randomizados que han comparado preparados mensuales con trimestrales en CM y/o patología ginecológica benigna y que, en realidad, no han demostrado diferencias [243, 244]. Así, un estudio japonés comparó las formulaciones de goserelina mensual vs trimestral en 170 pacientes premenopáusicas con CM, concluyendo no inferioridad del preparado trimestral en cuanto a supresión estrogénica (la AUC de E_2 semanal fue de 18.32 y 18.95 pg/mL/semana para goserelina de 10.8 y 3.6 mg, respectivamente) [243]. Un segundo trabajo, realizado en 72 mujeres con endometriosis, comparó 4 dosis de triptorelina cada 28 días a dosis de 3.75 mg im (dosis real 3 mg) con el preparado trimestral de triptorelina a 11.25 mg [244], observándose que en el día +84 se obtenían niveles de E_2 en rango de castración en el 97% de mujeres con el preparado trimestral y en el 94% de casos con el preparado mensual, y que el tiempo hasta obtener niveles de

castración era más corto con la formulación trimestral. Un tercer estudio comparó los niveles de E2 en 79 mujeres con CM que recibieron, o bien goserelina mensual o bien leuprolide trimestral. Los niveles de E2 se midieron al mes de iniciar el tratamiento. En el grupo tratado con leuprolide se observó una proporción numéricamente mayor de pacientes (12.2 vs 7.9%, $p=0.7$) con niveles de E2 no compatibles con menopausia inducida [245]. Debe tenerse en cuenta que en este caso la proporción numéricamente mayor de “escape hormonal” con leuprolide no puede explicarse por el fenómeno de fin de dosis, puesto que los niveles de estrógeno se determinaron al mes de la administración, y no al final del período trimestral.

En el estudio SOFT, contexto en el que se realizó la presente tesis, se eligió como aGnRH la triptorelina 3.75 mg cada 28 días, puesto que en el momento de su diseño (aproximadamente en el año 2000) no existían apenas datos sobre la eficacia de los preparados trimestrales en CM.

1.4.3.4. Actividad clínica en el contexto metastásico en monoterapia

El tratamiento con aGnRH se ha comparado con ablación ovárica en CM avanzado en dos estudios randomizados, ambos de pequeño tamaño y con un poder estadístico limitado [246, 247]. En ambos estudios no se observaron diferencias en términos de TR, TTP y SG. La TR descrita en éstos y otros estudios [248, 249] está en el rango del 27.2-53%. El beneficio clínico podría ser todavía mayor en pacientes RH positivos, ya que se trata de estudios antiguos en la que se incluyeron pacientes con RH desconocidos o incluso negativos. Dado el escaso tamaño de los estudios individuales, se llevó a cabo un meta-análisis en 2001 [250]. Este meta-análisis reunió 506 pacientes tratadas con aGnRH (N=256) o en combinación con tamoxifeno (N=250). El aGnRH utilizado fue goserelina en un 79% de casos y busserelina en un 21%. La proporción de pacientes según el estado de RH fue el siguiente: 66% positivos, 22% negativos, 16% desconocidos, y la localización predominante fue ósea en un 48% de pacientes, visceral en 31% y de partes blandas en un 21% de casos. Sólo un 6% de mujeres había recibido HT previa. Teniendo en cuenta estos datos, y con una mediana de seguimiento de 6.8 años, se

describió una TR del 29% y una mediana de SLP y SG de 5.4 meses y de 2.5 años, respectivamente, cuando se utilizaron los aGnRH como agente único.

El tratamiento con aGnRH se ha comparado con tamoxifeno en un estudio randomizado [251] que incluyó 161 pacientes con CM avanzado y RH positivos o desconocidos, sin que se demostraran diferencias en eficacia. En este caso el aGnRH utilizado fue buserelina. Por otro lado tamoxifeno se ha comparado con ablación ovárica (quirúrgica o radica) en este mismo contexto en tres estudios randomizados [171, 173, 252], que presentaron similares limitaciones (pequeño tamano muestral, selección subóptima por estado de RH). En ninguno de los tres estudios se detectaron diferencias en eficacia (TR, TTP, SG) entre ambos grupos de tratamiento. Cuando estos tres trabajos, junto con un cuarto no publicado, se analizaron conjuntamente en un meta-análisis (N=220) [174], tampoco se vieron diferencias (Vease también Sección 1.4.1.4). Debe mencionarse que, aunque el diseno de los cuatro estudios permitió el cruzamiento al otro brazo de tratamiento a la progresión, menos del 50% de pacientes llegaron a realizar dicho cruzamiento: Sí se vio que la respuesta a tamoxifeno era predictiva de respuesta a ooforectomía, y viceversa.

1.4.3.5. Toxicidad

La toxicidad de los aGnRH es la propia de una menopausia inducida: sofocos, sudoración, náuseas, sequedad vaginal, dispareunia, disminución de la líbido, dolor de cabeza, labilidad emocional, aumento de peso, así como pérdida de densidad mineral ósea (entre un 2 y un 8% en 6 meses) [237, 253, 254]. Muy raramente, el tratamiento con aGnRH puede revelar la presencia de un adenoma hipofisario de células gonadotrofas previamente desconocido. Estos pacientes pueden presentar una apoplejía hipofisaria caracterizada por cefalea repentina, vómitos, alteración visual y oftalmoplejia [236].

En el contexto metastásico, y en relación a una estimulación inicial de las gónadas y aumento transitorio de estrógenos (o de testosterona en hombres con cáncer de próstata), se ha descrito un empeoramiento inicial de la sintomatología derivada de las metástasis (efecto llamada o *flare*) [247].

Típicamente puede existir un aumento de dolor óseo, e incluso desarrollo de compresión medular, que suele ir paralelo a un aumento de marcadores tumorales y a un aumento de captación generalizado en la gammagrafía ósea. Clásicamente se ha indicado tamoxifeno previamente a iniciar el aGnRH para mitigar este efecto, aunque no existe evidencia demostrada de la efectividad de esta estrategia. Lo que sí se sabe es que la combinación con IA no consigue disminuir el aumento de estrógenos inicial [255]. Los nuevos fármacos antagonistas de la GnRH (degarelix, ganirelix, abarelix, cetorelix) están exentos de este efecto *flare*, ya que no provocan un aumento de estrógenos o testosterona inicial.

1.4.3.6 Indicaciones

Los aGnRH están indicados en el tratamiento del cáncer de próstata, y de condiciones benignas ginecológicas como son la endometriosis y los fibromas uterinos, o en reproducción asistida. El preparado trimestral de triptorelina (11.5 mg) tiene también indicación para el tratamiento de la pubertad precoz. Aunque se han realizado estudios en CM utilizando los 3 compuestos (leuprolide, goserelina y triptorelina), sólo goserelina tiene indicación aprobada en mujeres pre- o perimenopáusicas con CM (situación avanzada y precoz). Otros usos habituales de estos fármacos, aún sin indicación, incluyen la estimulación ovárica controlada en reproducción asistida, el tratamiento del transtorno de identidad de género y el de pedofilias. Tras años de controversia, y en base a estudios randomizados recientes, los estudios *Prevention of Early Menopause Study* (POEMS) y *Prevention of Menopause Induced by Chemotherapy* (PROMISE-GIM6) [256, 257] se está aceptando su papel en cuanto a protección ovárica durante la quimioterapia (neo)adyuvante en pacientes con CM precoz y deseo posterior de gestación, sobre todo en pacientes con RE negativos.

1.4.4. Combinación de los aGnRH y tamoxifeno / IA. Datos clínicos y endocrinos

A continuación se resumen los datos clínicos y /o endocrinos de estudios fase II y fase III con aGnRH en combinación con tamoxifeno o IA (Tablas 21 a 25), con especial énfasis en los datos endocrinos de los estudios en CM precoz (Tablas 29 y 30). Algunos de los estudios mencionados en estas tablas disponen de un brazo control con aGnRH en monoterapia, y en algunos casos se ha utilizado IA de segunda generación (ej. formestane o vorozol). Adicionalmente a lo resumido en las tablas, debe comentarse que, en CMM, tamoxifeno se ha enfrentado en monoterapia a aGnRH, con eficacia clínica similar [249], mientras que la combinación de aGnRH con tamoxifeno se ha demostrado significativamente superior en términos de TR, TTP y SG con respecto a aGnRH en monoterapia en el meta-análisis mencionado en la Sección 1.4.3.4 [250].

En cuanto a la supresión estrogénica obtenida, en todas las tablas se presta atención a los niveles medios de E2 obtenidos y a la posibilidad de la existencia de un subgrupo de pacientes que presente niveles de E2 superior a lo esperado, esto es, superiores al rango de la menopausia. En todos los casos, excepto en el estudio TABLE, se utilizaron formulaciones mensuales de aGnRH.

Tabla 21. Datos clínicos y endocrinos en estudios fase II y III que han utilizado combinaciones de aGnRH con tamoxifeno para tratamiento de mujeres premenopáusicas con CM avanzado

Referencia Tipo de estudio	N	Tto.	Duración del muestreo	Método det E2	Resultados
Robertson[258] (Grupos consecutivos)	24	G	12m	RIA	FSH claramente suprimida, pero tendió a ↑ con el tiempo E2 _(3-12m) (Media): ~ 13.62 pg/mL
	15	G + T			Menores niveles de E2 que con G en monoterapia entre los 6 y 12 meses FSH más suprimida con la combinación
Klijn [251] (Grupos randomizados)	37	B	Sólo 12 pacientes seguidos 2 a	Lab locales	TR 34%, TTP 6.3m SG 2.5a Media de E2 (6s a 2a): 19-23 pg/mL
	34	B+T			TR 48%, TTP 9.7m SG 3.7a Media de E2 (6s a 2a): 18-23 pg/mL

Goserelina; T: tamoxifeno; B: buserelina; TR. Tasas de respuestas; TTP: Tiempo a la progresión; tto: tratamiento; SG: supervivencia Global; RIA: Radioinmunoanálisis; m: meses; a: años;

Tabla 22. Datos clínicos y endocrinos derivados de los estudios fase II que combinan aGnRH e IA en mujeres premenopáusicas con CM avanzado

Referencia	N	Tto.	Seguim	Método det E2	Resultados
Forward [259]	16	G + A (Previo G+T)	12m	NR	BC 62%, TTP 10m Descenso de E2 adicional del 75% tras cambio a G+A No picos de E2 a los 12 m (N=12) G+T: Caída 90% en FSH y LH. Nuevo ascenso de FSH, pero no de LH al cambiar a G+A
Carlson [260]	35	G+A SERM previo	6m	NR	TR 37.5%;BC 71%, TTP 8.3m 1 paciente no suprimida a los 6 m (E2=68 pg/mL) Niveles FSH y LH NC
Celio [261]	21	Trip + F vs T sólo	12s	RIA indirecto	Mayor supresión estrogénica con la combinación Niveles similares de FSH y LH
Dowsett [262]	13	G+ V (después de inicio G x2 m)	12s	RIA	E2 ↓ 74% a los 3 m Niveles de E1, E2 y E1S 2-3 veces superiores que en grupo control de mujeres postm. FSH similar tras adición V LH ↓ tras adición V
Jannuzzo [255]	28	Trip +E vs Trip + Plac	8s	GC- MS/MS	Mayor supresión estrogénica con la combinación. 2 mujeres con E2 >20 en día +29
Park [263]	35	L+G	32s	ECLIA	BC 71%, SLP 8.9 m (similar a grupo paralelo de mujeres postmenopáusicas) Niveles medios de E2 <10 pg/mL*
Cheung[264]	63	G+A (primera línea)	6m	NC	BC 67%, TTP 12m G+A asociado ↓ 98% de E2 respecto basal (de 574 a 13 pmol/L, sólo datos endocrinos de 4 pacientes)

	13	G+E (segunda línea después de G+A)	6m	NC	BC 38%, con duración media de 13 meses
--	----	--	----	----	---

G: goserelina; A: anastrozol; *SERM*. *Selective Estrogen Receptor Modulator*; Trip; triptorelina; F; formestane (IA de 2ª generación); V: vorozol (IA de 2ª generación), E: exemestano; BC. Beneficio Clínico; TTP: tiempo a la progresión; RIA: radioinmunoanálisis; GC-MS/MS: *Gas Chromatography/tandem mass spectometry*; ECLIA: inmunoensayo de electroquimioluminiscencia; E1; estrona, E2; estradiol; E1S: sulfato de estrona; S. semanas; m: meses; * inferido de gráfico presentado en el manuscrito; NC: no comunicado; Seguir: seguimiento de los niveles hormonales

Tabla 23. Datos clínicos y endocrinos derivados de los estudios fase II y III que combinan aGnRH con tamoxifeno o IA en mujeres premenopáusicas con CM precoz (contextos adyuvante y neoadyuvante)

Referencia	N	Tto.	Seguim	Método det E2	Resultados
Rossi E (Estudio HOBEO adyuv) [265]	51	Trip+L ± ZOL	Sólo 1 muestra postbasal a los 6m	ECLIA	Niveles E2 a 6 (M):<5 (rango <5-24.5 pg/mL)
	30	Trip + T ± ZOL			Niveles E2 a 6 (M):7.95 (rango <5-43.9 pg/mL) P= 0.008
Schmid (Estudio TABLE) [242]	294	Leuprolide trimestral x 2 a	2a	NC	Amenorrea en 88% de pacientes y > del 95% durantes los restantes 18m Inicio amenorrea; 22±38d E2>30 pg/mL en ≥2 determinaciones consecutivas: 10.4% SG mejor con leuprolide (obj. exploratorio)
	295	CMF			Amenorrea en 45% (inicio día +110±138)
Torrisi (Neoayuvante, estadío localmente avanzado)	35	T+L (G en 4 pacientes)		NC	TR 50% RCp 3%
Masuda N (Estudio STAGE neoady. en mujeres ER+HER2-)[266]	98	G+A x 24 s	0.4,8,16,2 0 y 24s	NC	TR (palpación): 70.4%
	99	G+T x24s			TR (palpación): 50.5% P= 0.004 Mayor supresión estrogénica plasmática (E1 y E2) con A Mayor supresión en E1 (no E2) en el tumor con A

Tto: Tratamiento; Adyuv: Adyuvante; Neoady; neoadyuvante; Trip: triptorelina; ZOL:ácido zoledrónico; CMF: Ciclofosfamida, Metotrexate, 5-Fluorouracilo; ECLIA: inmunoensayo de electroquimioluminiscencia; Seguim: Seguimiento referido a determinaciones hormonales; NC: no comunicados; a: años; s: semanas; TR: tasa de respuestas, RCp : respuesta Completa patológica

*En realidad el estudio TABLE administra aGnRH en monoterapia, pero por su importancia en tamaño muestral se ha preferido añadir en esta tabla

Del análisis detallado de estos estudios, así como del contenido de las tablas, se deduce que la mayoría de pacientes tratadas con aGnRH + tamoxifeno/IA obtiene un beneficio clínico y una SLP sustanciales, y no muy diferentes a los obtenidos con tamoxifeno o IA en la población con menopausia natural. Desde el punto de vista endocrino, además, los niveles medios de E2, o de las tres fracciones estrogénicas en caso de haber sido estudiados, están al menos en el rango de la castración en la mayoría de pacientes ($E2 < 20$ pg/mL con los métodos de determinación habitualmente usados en la clínica), pero en algunos casos estudios existe evidencia, o bien de niveles medios de estrógenos superiores a los de las mujeres menopáusicas con tratamiento similar, sobre todo si se combinan con IA [262], o bien de la existencia de una minoría de pacientes que no alcanza los niveles de estrógenos esperados con aGnRH en monoterapia o en combinación [242, 251, 255, 260, 265]. En línea con lo comentado en la Sección 1.4.3.3 existe, incluso, una proporción variable (generalmente entre 2-9% según los estudios) [238, 251] de pacientes presentan pérdidas vaginales. Además, el seguimiento de los niveles hormonales en muchos de estos estudios es muy corto (como media 6 meses), y en ningún caso supera los 2 años. Y, por último, como limitación adicional, algunos de estos trabajos, o bien no han descrito en detalle las características del método de medida de estrógenos utilizado, o bien han utilizado métodos con poca sensibilidad y especificidad, por tanto poco adecuados para estudiar los niveles estrogénicos que se consiguen con aGnRH, sobre todo si se combinan con IA (ver Sección 1.6).

En el contexto adyuvante, y por las similitudes que presenta con el trabajo de la presente tesis, debemos destacar el estudio *Hormonal Bone Effects* (HOBOE) [265], en el que el objetivo principal era la descripción de los niveles hormonales (E2, FSH, LH y función suprarrenal) basales y a los 6 meses en un grupo de mujeres consideradas premenopáusicas antes de iniciar QT adyuvante, si ésta se consideraba necesaria. Las pacientes (N=81) fueron randomizadas a recibir triptorelina más letrozol o bien triptorelina más tamoxifeno (con o sin zoledrónico). Se demostró que los niveles de E2 y LH a los 6 meses eran significativamente inferiores en el grupo que recibió letrozol, mientras que los niveles de FSH fueron significativamente más elevados en este último grupo. Los niveles basales de FSH y

LH y E2 fueron, como mediana, más compatibles con situación de postmenopausia, ya que el 88% de las pacientes recibieron previamente QT y la selección de las pacientes se realizó previamente a recibirla. El método de determinación de E2 utilizado fue electroquimioluminiscencia, con un límite de detección de 5 pg/mL, por tanto con limitada sensibilidad (Ver Sección 1.6). Más detalles sobre este estudio se comentarán en el apartado de Discusión.

También merece mención especial, por su tamaño (N=599), el estudio *Takeda Adjuvant Breast Cancer Study* (TABLE) [242], también en el contexto adyuvante; en este estudio fase III se comparó la QT basada en CMF e.v. (6 ciclos, C y M días y 8 cada 28 días) con acetato de leuprorelina trimestral. Con un seguimiento mediano de 5.8 años, no se detectaron diferencias en SLR entre ambos grupos de tratamiento. Detalles sobre proporción de amenorrea y niveles hormonales se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24. Niveles de E2, FSH y LH en estudio TABLE, basales y a los 1 y 2 años.

	Leuprolide		CMF		P
	M	DE	M	DE	
E2					
Basal	53	96.1	50.2	80.2	NS
1 año	5.0	51.9	14.0	52.2	.001
2 años	8.3	58.0	6.5	20.3	NS
LH					
Basal	4.1	9.9	3.7	9.4	NS
1 año	0.5	3.8	20.9	12.2	< .001
2 años	0.5	4.9	18.1	12.7	< .001
FSH					
Basal	6	12	7	17	NS
1 año	5	2	59	33	< .001
2 años	5	2	51	30	< .001

M: Mediana; DE: desviación estándar; NS: no significativo;

Método de determinación de E2 y características (sensibilidad y especificidad) no comunicados

1.5 EFECTO ENDOCRINO DE LA QT EN MUJERES PREMENOPÁUSICAS: AMENORREA QUIMIOINDUCIDA. FACTORES PREDICTORES. IMPACTO EN LA SLE Y SG

1.5.1 Concepto de amenorrea quimioinducida. Factores predictores. Reversibilidad

Se sabe desde hace décadas que la mayoría de agentes quimioterápicos, y particular los agentes alquilantes (melfalán, ciclofosfamida) tienen una toxicidad sobre las gónadas. En la mujer premenopáusica, la administración se relaciona con un stop de las menstruaciones, que puede ser reversible o no. A este hecho se le conoce como *amenorrea quimioinducida*. La definición de amenorrea quimioinducida no es homogénea y difiere en la literatura, dependiendo del punto del seguimiento (3, 6 meses de fin de QT, o incluso al año o 2,3 años) y la duración de ésta (sin especificar, o entre 3 y 6 meses habitualmente). La presentación de amenorrea quimioinducida se ha asociado a descenso de los niveles de E2 y aumento de gonadotropinas en la gran mayoría de estudios que se han centrado en esta cuestión [267], por lo que en sí misma podría considerarse una maniobra supresiva hormonal. De hecho se cree que parte del beneficio del tratamiento quimioterápico adyuvante en mujeres premenopáusicas RH positivos viene mediado por este efecto endocrino de la QT (Ver también Sección 1.5.2)

La proporción de pacientes que presentan amenorrea quimioinducida dependerá sobretodo, del esquema quimioterápico utilizado y de la edad de la paciente. La utilización de tamoxifeno adyuvante también aumenta en aproximadamente un 5% la proporción de pacientes que presentan amenorrea quimioinducida al año de completar la QT [267-269].

En general puede decirse que la población más joven (<40 años, i sobre todo <35 años) tiene menor probabilidad de presentar amenorrea quimioinducida, y mayor probabilidad de que ésta sea reversible [270, 271]. El patrón de amenorrea difiere entre los esquemas citotóxicos que incluyen mayores dosis acumuladas de ciclofosfamida (esquemas basados en CMF) y las QT basadas en antraciclinas y/o taxanos. Así, con antraciclinas o taxanos, y sobre todo con ambos, la proporción de amenorrea quimioinducida (y los niveles hormonales de E2, FSH y LH en el rango de

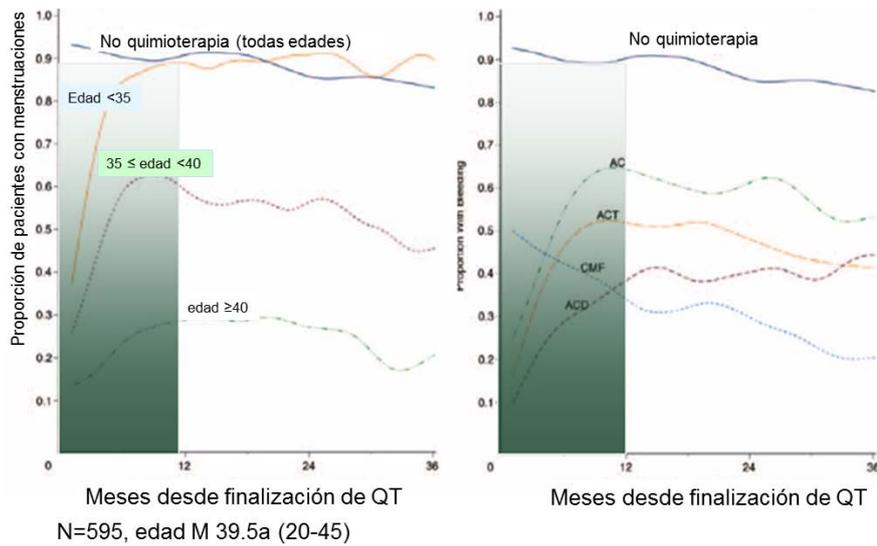
la menopausia) son casi universales en el momento de finalizar la QT, pero existe una fase de recuperación de niveles estrogénicos y/o menstruaciones de hasta unos dieciocho meses. En cambio con QT tipo CMF la proporción de amenorrea es menor al inicio, pero aumenta con el tiempo [269]. La proporción de pacientes que presentan amenorrea en función de edad y esquema quimioterápico, así como las tasas de reversibilidad y el patrón de recuperación se resumen e ilustran en la Tabla 25 y en la Figura 29, respectivamente.

Tabla 25. Proporción de amenorrea quimioinducida, definición y patrón de reversibilidad según el esquema de QT administrado

Ref	Esquema	AQI (%)	Definición AQI	Reversibilidad AQI
Goldhirsch [272]	CMFx6-7	<40 a:61% >40 a:95%	Ausencia de menstruaciones ≥3 m dentro de los 9 m desde cirugía del tumor primario	NC
Bines[270]	ACx4	34%	NC	NC
Hortobagyi [273]	FACx6	59%	NC	No reversible en la mayoría de mujeres >40a 50% de reversibilidad en mujeres <40 ^a
Nabholtz[274]	FAC	32.8%	NC	NC
	DAC	51.4%		
Martin [275]	FAC	52.4%	NC	NC
	DAC	61.7%		
Levine [276]	CEF	51%	NC	NC
Berlière [277] (PACS 01)	FECx6	93% al fin de QT	Ausencia de menstruación a los 12 meses o más de fin de QT	29%
	FECx3 →D x3	92.8% al fin de QT		42%
Swain [278] (NSABP B30)	ACx4 →Dx4	83% Amenorrea A los 6 m	Al menos 1 episodio de amenorrea de 6 o más m de duración	Recuperación menstruaciones a los 2 años. 45.3% si <40 a, 10.9% entre 40–50, 3.2% si >50 a

Ref: referencia; a: años; m: meses; CMF:ciclophosphamide, metotrexate, 5Fluorouracilo; AC: adriamicina, ciclofosfamida;FAC: 5Fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida; D: docetaxel;; CEF:ciclofosfamida,epirubicin, 5Fluorouracilo; AQL: amenorrea quimioinducida

Figura 29: Proporción de pacientes con menstruaciones en función de edad, esquema quimioterápico recibido y meses transcurridos desde finalización de QT adyuvante [269].



*El recuadro en verde señala el período de recuperación de menstruaciones según puede apreciarse en la gráfica

1.5.2 Impacto de la amenorrea quimioinducida en la SLE y SG

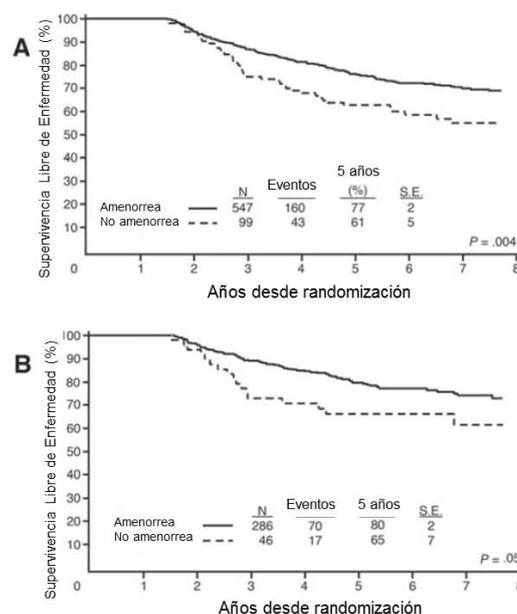
Existen múltiples ensayos clínicos que han estudiado el papel pronóstico de la amenorrea quimioinducida, y que en general, han relacionado ésta con una mejoría en SLR e, incluso, de la SG. Así, una revisión exhaustiva de esta cuestión llevada a cabo en 2006 [267] identificó hasta 23 estudios, de los cuales 15 demostraron un beneficio en SLR y/o SG, aunque sólo en 7 de ellos se efectuó un análisis de supervivencia en función del estado de RH. A estos datos debe añadirse la asociación positiva hallada en estudios más recientes [277, 279]. De este cuerpo de literatura destacamos dos publicaciones que estudiaron de forma prospectiva la asociación entre el desarrollo de amenorrea quimioinducida y el pronóstico del CM. En ambas las pacientes con tumores RH positivos recibieron HT adyuvante con tamoxifeno,

considerado el único tratamiento endocrino estándar para mujeres premenopáusicas desde 1998 [280] hasta fechas muy recientes.

El primero de estos dos trabajos es el estudio XIII del *International Breast Cancer Study Group* (IBCSG), en el que 1246 pacientes premenopáusicas con afectación ganglionar recibieron QT (AC/EC seguidos de CMF de forma inmediata o retardada) y tamoxifeno durante 5 años vs control en un diseño 2x2 factorial, y ello independientemente del estado de RH [281]. La amenorrea quimioinducida se definió como al menos un comunicado de ausencia de menstruaciones durante los primeros 15 meses desde la randomización. Globalmente 73% de mujeres presentaron amenorrea (91% en mujeres >35 años, 42% en mujeres <35 años), que fue reversible en un 11 % de casos. Tal y como se aprecia en la Figura 29 la presentación de amenorrea se asoció a una mejoría de la SLE en pacientes RH positivos, independientemente de si éstas habían recibido o no tamoxifeno.

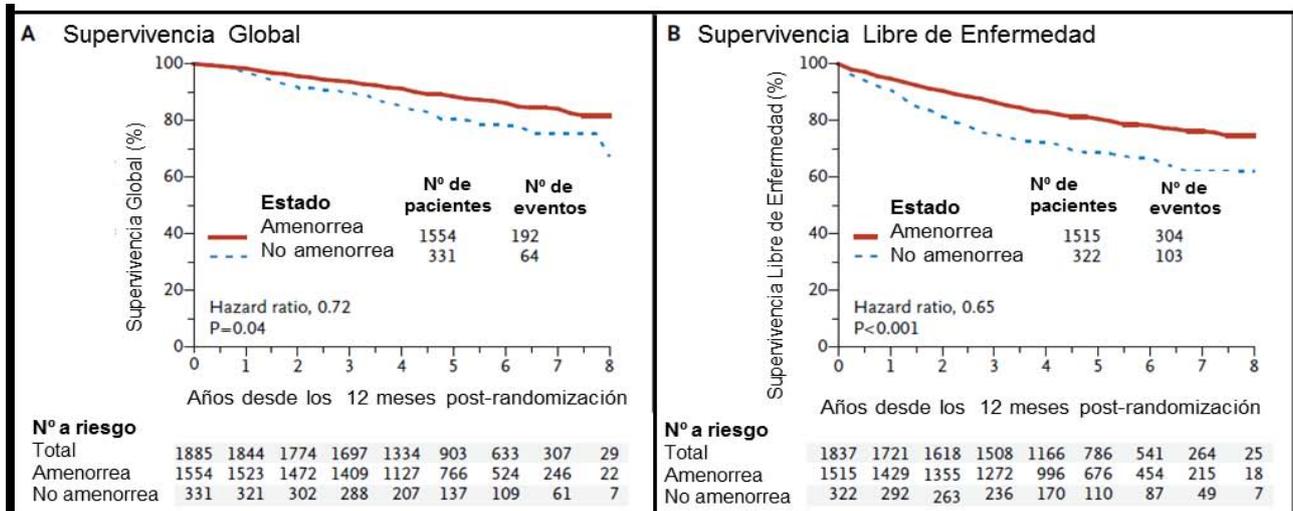
Figura 30. SLE en pacientes RE positivos según hayan desarrollado o no amenorrea. en estudio XIII del IBCSG

A: todas las pacientes; B: subgrupo de pacientes randomizadas a recibir tamoxifeno [281]



El segundo estudio es el del *National Surgery and Breast Cancer Study Group* (NSABP) B30 [279]. En este estudio la presentación de amenorrea quimioinducida (al menos un episodio de amenorrea de 6 o más meses de duración) se asoció a un beneficio muy significativo SG en todas las pacientes, independientemente del estado de RH, lo que llevó a pensar que quizá ese beneficio estaba relacionado con haber recibido una mayor intensidad de dosis de QT, más que con la amenorrea en sí misma. Para aclarar estas cuestiones, se realizó un nuevo análisis, que se publicó posteriormente [282], y que tuvo en cuenta el posible sesgo introducido por las pacientes que habían presentado recurrencias precoces y no tenían datos completos de amenorrea durante 24 meses. Se tomó como referencia entonces la SLE y SG a partir de los 12 meses de la randomización. Se vio que la amenorrea se asociaba a una mejoría en la SLE y SG (HR 0.65 y 0.72, respectivamente, ambas estadísticamente significativas) y que ello era expensas de las pacientes con RH positivos. Así, en este grupo se observó una dramática reducción, del 49% y del 48%, en las probabilidades de recaída y muerte, respectivamente. Por el contrario, no se observó ningún beneficio pronóstico en el grupo RH negativo. Asimismo, cuando se analizó la intensidad de dosis de QT recibida entre las mujeres que experimentaron o no amenorrea, no se detectaron diferencias relevantes, descartando que éste fuera un factor clave al que atribuir el beneficio pronóstico asociado a la amenorrea quimioinducida.

Figura 31. SG (A) y SLE (B) de las pacientes incluidas en estudio NSABP B30 en función de la presentación o no de amenorrea quimioinducida (pacientes RH positivos y negativos)



1.5.3 Determinación del estado menopáusico tras QT adyuvante. Factores relacionados con la recuperación de la función ovárica (RFO) en mujeres que han recibido o no QT

En presencia de amenorrea quimioinducida la determinación del estado hormonal supone a menudo un reto para el clínico, ya que, dependiendo del esquema recibido y de la edad de la paciente, puede existir una recuperación posterior de la toxicidad gonadal. Ello es especialmente relevante a la hora de escoger el tratamiento hormonal adyuvante, ya que sabemos que los IA no son eficaces en presencia de función ovárica residual, e incluso pueden estimular la recuperación de ésta.

En el caso de recuperación de menstruaciones, sobre todo precoz, no existirán dudas de que los IA no están indicados. Tampoco en mujeres muy jóvenes, donde sabemos que la tasas de recuperación de la amenorrea, en caso de presentarse, es superior al 50%. El problema se presenta ante una mujer mayor de 40 años que ha presentado

amenorrea con la QT, puesto que sabemos que puede darse o no una recuperación de menstruaciones posterior, y que, además, en un número sustancial de casos existe una recuperación de niveles estrogénicos sin menstruaciones evidentes, situación esta última en la que la introducción de un IA tampoco funcionará óptimamente. [283]

En la Tabla 26 se presentan los resultados de cinco estudios que se han centrado en esta situación clínica. En cuatro de ellos han descrito los métodos utilizados de determinación de E2 (ultrasensibles en 3 de ellos y con adecuada sensibilidad el cuarto). Si nos centramos únicamente en estos cuatro trabajos, se describe globalmente una tasa de recuperación de menstruaciones y/o niveles hormonales en el rango de la premenopausia en pacientes en tratamiento con IA de entre el 27-39% con un tiempo aproximado de recuperación desde la introducción del IA de 2.1 a 8.8 meses [206, 284, 285]. El quinto estudio [286], efectuado en 56 pacientes con amenorrea quimioinducida, pero sin tratamiento hormonal, y en las que las determinaciones de E2, FSH y LH se efectuaron entre los 1-34 meses después del fin de la QT, sin que se reportara el método utilizado, reveló que un 75% de las mujeres presentaban en algún momento niveles estrogénicos superiores a los esperados en la menopausia pese a la ausencia de reglas, aunque este resultado, desproporcionadamente elevado con respecto a los otros estudios debe contemplarse con cautela por desconocer las características, sobre todo la especificidad y sensibilidad del método de medida utilizado.

Tabla 26. Recuperación clínica y bioquímica de la función ovárica en pacientes inicialmente premenopáusicas con amenorrea quimioinducida.

Autor	Población	Método	N	Resultados
Smith [206]	Pacientes ≥ 40 a RE+ y con AQI y tratamiento con IA Edad (M) 47 años (rango 39 a 52)	Método ultra sensible *	45	12 pacientes (27%) mostraron RFO (10 recuperaron menstruaciones, 1 embarazo, 1 recuperación E2 en rango premenopausia) 9 de éstas 12 recibieron T previo
Braverman [286]	Mujeres con AQI entre 1y 34 m post QT 18 mujeres con 2 determinaciones	Método NC	56	E2 >9pg/mL al menos una vez en 42 pacientes (75%). En 75 determinaciones E2 osciló entre 10-344 pg/mL (M 25 pg/mL, media 41 pg/mL)
Guerrero [284]	Pacientes RE+ con AQI que habían recibido 2a de T adyuvante y tenían niveles de E2 en el rango postmenopáusicos en el momento de cambiar a EXE adyuvante Pacientes consecutivas	Dos métodos simultáneos Directo: MEIA** Indirecto: RIA precedido de purificación***	53	Ambos métodos (D e I) mostraron similar RFO: 32 vs 30% Tiempo (M) a RFO: 5.4 vs 6 m En análisis multivariado solo la edad al momento de inicio EXE se relacionó con RFO , estableciéndose un punto de corte de <48 años
Henry [283]	Pacientes con >8 s de AQI ≥ 57 a en el momento de iniciar anastrozol y que tenían niveles de E2 >20 pg /mL antes de iniciar anastrozol	Método: LC-MSMS (LLQ 2 pg/mL)	45	Tras modificación de la definición inicial, 13 de 45 (29%) con RFO 10 pacientes con sangrado vaginal, sólo 3 con niveles de E2 elevados Tiempo (M) a RFO: 2.1 m Edad joven fue único factor predictivo de RFO en análisis uni y multivariante
Krekow [285]	Pacientes 40 a 49a Tto previa con QT que incluyera CFM	2 laboratorios Diferente Método NC (LLQ 3 pg/mL)#	173	RFO 39% 6% recuperaron menstruaciones Tiempo (M) a RFO: 8.8m Edad <45 años e inhibina B basal predictores de RFO

AQI: amenorrea quimioinducida; M: mediana; m: meses; a: años, T: tamoxifeno adyuvante; EXE: exemestano; RFO: RFO; LLQ: límite de detección o límite inferior de cuantificación, *del inglés, Lower Limit of quantification*; QT: quimioterapia; CMF: ciclofosfamida; NC: no comunicado. M: Mediana

*Método ultrasensible: límite de detección 3 pmol/L, valor de referencia postmenopausia 60 pmol/L=16.34

**MEIA: Microparticle enzyme immunoassay; LLQ 73.4 pmol/L=19.9 pg/mL; valor de referencia de postmenopausia 146 pmol/L=39.77 pg/mL

***RIA radioinmunoensayo precedido de purificación: con extracción orgánica previa para evitar reacciones cruzadas, particularmente con exemestano; límite de detección 3 pmol/L = 0.82 pg/mL; referencia postmenopausia <60 pmol/L=16.3 pg/mL

#inferido de los valores presentados

En los estudio de Guerrero *et al*, Henry *et al*, así como en el más reciente de Krekow *et al*, la edad joven fue factor predictivo de recuperación de la función gonadal en el análisis univariante y multivariante. En el primero de estos trabajos, y mediante la prueba del área bajo la curva del receptor operador o curva ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*) se estableció la edad <48 años como factor predictor de RFO. Se observó que 50% de las pacientes <48 años presentaron recuperación, a diferencia de las pacientes >50 años, en las cuales dicho porcentaje fue tan sólo del 12% ($p=0.005$).

En cambio, los niveles de E2 basales no fueron predictivos de RFO en ninguno de los tres estudios mencionados, aunque en el estudio de Guerrero *et al* el E2 medido por el método más sensible (método indirecto) tendió a correlacionarse con dicha recuperación ($p=0.06$).

Otras variables analizadas y que se habían determinado en el momento de la inclusión (IMC, T score por DMO; contaje folículos antrales y volumen ovárico determinados por Ecografía trasnsvaginal, FSH, tipo de menstruaciones pre-QT, tiempo de amenorrea y tratamiento con tamoxifeno previo) no resultaron predictivas de recuperación ovárica considerando globalmente los tres estudios. En cuanto a la inhibina B, ésta se relacionó de forma independiente con la recuperación ovárica en la serie con mayor tamaño muestral [OR para RFO 1.933 (IC 95% 1.064 – 3.512), $p=0.03$][285], mientras que los otros 2 trabajos no describieron asociación. En cuanto a la AMH, ésta se había relacionado con recuperación de menstruaciones a largo plazo

en un estudio anterior en los que la determinación se había realizado antes de iniciar la QT adyuvante [287]. La serie de Krekow *et al* no analizó este parámetro, mientras que sí se determinó en los otros dos trabajos prospectivos, que coincidieron en sus hallazgos: los niveles de AMH determinados post QT fueron indetectables en prácticamente todas las pacientes, por lo que no fueron útiles para predecir la RFO.

Considerando los datos presentados, parece que en caso de amenorrea quimioinducida post-QT para CM precoz, y particularmente tras tratamiento con tamoxifeno (que por sí mismo dificulta la recuperación de menstruaciones), debe limitarse el cambio electivo a IA adyuvante, ya sean IANE o exemestano (ver también Sección 1.6) y considerarse probablemente sólo en pacientes >48 años, aunque siempre debe hacerse el seguimiento de niveles de E2, FSH y LH y, obviamente, de la posible recuperación de menstruaciones.

1.6 ESTADO DEL ARTE DEL TRATAMIENTO HORMONAL ADYUVANTE (THA)

Los objetivos del tratamiento adyuvante sistémico son disminuir la recurrencia y aumentar la SG. Se acepta que, tras el tratamiento primario quirúrgico, hasta el 40% de pacientes, considerando globalmente ganglios negativos y positivos, presentarán recurrencia a 10 años. Por otro lado, ya se ha mencionado que aproximadamente 60-70% de pacientes presentan tumores primarios con positividad para RE y/ o RP. Para este subgrupo de pacientes, el tratamiento hormonal sistémico representará una maniobra terapéutica crucial y, en muchos casos, la más relevante, para la reducción del riesgo de recidiva. El THA se considerará en prácticamente todos los casos, ya sea como opción sistémica única (en tumores de bajo riesgo, incluso en CDIS), o bien tras la quimioterapia, en tumores de alto riesgo. No se ofrecerá a pacientes con tumores RH negativos, dado que en este grupo no existe beneficio relevante [32, 288]. A la hora de plantear el THA nuevamente diferenciaremos las pacientes postmenopáusicas (12 meses sin menstruaciones) de aquellas pre- o perimenopáusicas.

1.6.1 THA en pacientes postmenopáusicas.

Durante décadas el tamoxifeno, a dosis de 20 mg/d por 5 años, ha sido considerado el *gold standard* de THA. El meta-análisis de Oxford [32, 288] le confiere una reducción del 37% y 22% en las tasas anuales de recurrencia y muerte, respectivamente, en la población postmenopáusica con o sin afectación ganglionar. Desde el año 2005 se han comunicado múltiples estudios [219, 221, 289-302] que han demostrado el beneficio de la implementación de los IA (letrozol 2.5 mg/d, anastrozol 1 mg/d, exemestano 25 mg/d) en el THA de las pacientes postmenopáusicas. Éstos se han evaluado, con respecto a tamoxifeno, ya sea sustituyéndolo de entrada (monoterapia de inicio) [289, 290, 292, 295], sustituyéndolo tras 2-3 años de adyuvancia con tamoxifeno (switch o secuencial) [295], o incorporándolos tras 5 años de tratamiento con tamoxifeno (terapia de

continuación) [302-304]. Los resultados de las últimas actualizaciones de los principales estudios dentro de cada estrategia se resumen en la Tabla 27. Puesto que los datos de toxicidad de los diferentes fármacos se ha ido exponiendo en en la Sección 1.4. no se comentarán de nuevo aquí.

1.6.1.1 IA vs tamoxifeno: Estrategia de inicio

El estudio *Arimidex, Tamoxifeno Alone or in Combination* (ATAC) [289] fue el primero en llevarse a cabo y comunicar resultados. A 10 años, y considerando únicamente la población RE+, el tratamiento con anastrozol se asoció a un beneficio significativo en SLE, recurrencia contralateral y recurrencia a distancia (SLRD), sin impacto en la SG. En el estudio *Breast International Group* (BIG) 1-98[290], con 8.1 años de seguimiento, se observaron beneficios en SLE, SLRD y SG en el brazo con letrozol comparado con el brazo con tamoxifeno. El beneficio en SG fue más aparente tras aplicar técnicas estadísticas adecuadas (*Inverse Probability of Censoring Weighting* o IPCW) que tuvieran en cuenta el cruzamiento que se produjo en el brazo de tamoxifeno a letrozol (25% de pacientes), una vez conocido el beneficio asociado a letrozol tras la primera publicación del estudio. El último ensayo clínico fase III en comunicar resultados fue el estudio *Tamoxifeno Exemestano Adjuvant Multinational* (TEAM) [292, 293], que se planteó inicialmente como una comparación directa de exemestano vs tamoxifeno durante 5 años. El diseño original del estudio se modificó, a 2.75 años de iniciado, tras conocerse los resultados positivos del ensayo IES (*Intergroup Exemestano Study*), de manera que el brazo de tamoxifeno en monoterapia pasó a ser un brazo secuencial (tamoxifeno x 2-3 años → exemestano x 2-3 años). Los primeros resultados comunicados del estudio TEAM censuraron los eventos a partir de los 2.75 años, por lo que en realidad se compararon ambas monoterapias, describiendo beneficios significativos en SLR y SLRD. En términos de SLE existió un beneficio no significativo en el análisis por intención de tratamiento, que alcanzó la significación estadística en el análisis por tratamiento realmente recibido.

En resumen, los tres estudios con IA de inicio describen beneficios modestos básicamente en SLE con respecto a tamoxifeno, sin que de momento pueda concluirse la superioridad de un IA u otro en esta estrategia de inicio. Dos estudios

ya finalizados comunicados, pendientes de publicación, han buscado responder a esta cuestión. El primero es el estudio MA.27, que randomizó 7576 pacientes a recibir exemestano o anastrozol durante 5 años, y que ha demostrado una SLE similar a 4 años, sin diferencias en toxicidad, a excepción de menor riesgo de osteoporosis en el brazo de exemestano [221]. El segundo estudio es el *Femara versus Anastrozole Clinical Evaluation* (FACE), que ha comparado 5 años de letrozol con 5 años de anastrozol y que con 86 meses de mediana de seguimiento tampoco ha comunicado diferencias [305]

Tabla 27. Estudios clínicos de tamoxifeno e IA como THA en mujeres postmenopáusicas. Estrategias de inicio, *switch* corto, y HT de continuación. Resultados

Estrategia Estudio	Esquema	N	Seg (años)	Supervivencia libre de recidiva		Supervivencia libre de recidiva a distancia		SG
				Reducción relativa de riesgo (%)	Red. absoluta de riesgo (%)	Red. relativa de riesgo (%)	Red. absoluta de riesgo (%)	
Inicio								
ATAC [289]a	A vs T	624 1	10	14 (p=0.003)	2.7 (5a) 4.3 (10a)	15 aa (p=0.02)	1.3 (5a) 2.6 (10a)	5 (p=0.4)
BIG 1-98 [290]	L vs T (sólo brazos monoterapia)	492 2	8.7	18 (p=0.007)	2.9	IPCW: 21 ITT: 14		IPCW: 21 ITT: 13
Metaanálisis [291] ATAC / BIG1-98	A/L vs T	985 6	5.8	23 (p=<0.0001)	2.9 (5a) 3.9 (8a)	18 (p=0.002)	NR	6 (p=0.3)
TEAM [292]	T vs E (análisis a los 2.75 años, antes del switch)	976 6	2.7	ITT (SLE): 11 (p=0.12) PP: 17 (p=0.02) ITT (SLR): 15% (p=0.02)	NR	ITT:19 (p<0.03)	NR	N

MA.27 [221]	E vs A	757 6	4.1	NR	1% (p=0.85)	NR	NR	NR
Switch o secuencial (tras 2-3 años de tamoxifeno)								
IES[295]	T → E vs T	459 9 b	7.6	19 (p<0.001)	3.1 (5a) 4.5 (8a)	16 (p=0.01)	NR	14 (p=0.04)
ARNO 95 [296] c	T → A vs T	979	2.5	34 (p=0.049)	4.2	NR	NR	47 (p=0.045)
ABCSG8 [297] (secuencial)	T → A vs T (ITT análisis)	371 4	4.8	20 (p=0.064)	NR	22 (p=0.04 6)	NR	13 (p=0.33)
TEAM [293]	E vs T → E	976 6	5.1	ITT (SLE): 3 (p=0.6) PP: 7 (p=0.22) ITT (SLR):15 (p=0.02)	1 (5a)	ITT:7 (p=0.3)	NR	0 (p>0.99)
ABCSG 8 / ARNO[298]	T → A vs T	322 4	2.3	40 (p=0.0009)	3.1	39	2	NR (p=0.16)
ITA [299]	T → A vs T	448	5.3	44 (p=0.01)	5.8	NR	NR	44 (p=0.1)
Metaanálisis ARNO / ITA ABCSG8 [300]	T → A vs T	400 6	2.5	41 (p=0.0001)	3	39 (p=0.00 2)	2	29 (0.04)
Metaanálisis [291] ARNO / ITA / ABCSG8 / IES	T → A/E vs T	901 5	3.9d	29 (p<0.0000 1)	3.1 (3a) 3.6 (6a)	24 (p=0.00 07)	NR	21 (p=0.004)
GROCTA4 B + ITA[301]	T → AG vs T T → A vs T	828	6.5	NR	NR	NR	NR	49 (p=0.007)
BIG1 98 + FEMTA[290] e,f	L vs T → L	309 4	5.9	HR 1.05 (0.84-1.34) (a favor L)	1.8 (2.3N+ , 1.4N-) 0%	HR 1.22 (0.88- 1.69) (a favor L)	NR	HR 1.13 (0.83- 1.53) (a favor L)
	L vs L → T	308 6		HR 0.96 (0.76-1.21) (a favor L → T)		HR 1.05 (0.75- 1.47) (a favor L)		HR 0.90 (0.65- 1.24) (a favor L → T)
Continuación (tras ~ 5 años de tamoxifeno)								

MA 17[302]	T → L x5 a vs T → Placebo	5170	5.3	ITT: 32 (p<0.001) Ajustado para cross-over: 48 (p<0.001)	4.6a	ITT: 19 (p=0.09) Ajustado: 49 p<0.001	2.9a	ITT: 1 (p=0.83) Ajustado: 39 (p<0.001)
NSABP 33[303]h	T → E x5a vs T → Placebo	1562	2.5	SLE:32 (p=0.07) SLR: 56 (p=0.004)	22	31 (p=0.13)	NR	NS
ABCSG 6a[304]	T(± AG)→ Ax 3a vs T(± AG) → ∅	856	5.2	SLR: 38 (p=0.031)	4.7 (SLR10a)	47 (p=0.034)	3.4 (5a)	NS (p=0.89)

T: tamoxifeno, A: anastrozol, L: Letrozol, E: exemestano, AG: aminoglutetimida; NS: no estadísticamente significativo; NR: no reportado: IPCW: "inverse probability of censoring weighting" analysis, tiene en cuenta la población asignada al brazo de tamoxifeno que fue cruzada selectivamente a letrozol durante el estudio (N=619); ITT: análisis por intención de tratamiento; PP: por protocolo, resultados en función del tratamiento realmente administrado: HR: razón de riesgo; SLE: Supervivencia libre de enfermedad; SLR: Supervivencia libre de recurrencia

a) desestimado brazo de combinación, resultados aplicables a población RE+, aa) Tiempo a la recurrencia a distancia; b) pacientes RE+ o desconocidos, excluidos 125 pacientes RE-, c) excluidos pacientes RE-, d) Después del cambio (secuencialidad); e) expresado en HR e intervalos de confianza del 99%. f) 60% de pacientes asignados a placebo fueron cruzados a letrozol tras conocerse resultados del primer análisis interino; g) Estimado a 4a; h) terminado prematuramente tras comunicarse resultados de estudio MA.17; i) Estimado a 4a.

1.6.1.2 IA tras 2-3 años de tamoxifeno: *Switching* y secuencialidad

Tanto el estudio con exemestano [el *Intergroup Exemestano Study* (IES) [295]] como los estudios que utilizaron anastrozol [el *Arimidex-Nolvadex* (ARNO) 95 [296], el *Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group* (ABCSG) 8 [297] y el *Italian Tamoxifeno Arimidex* (ITA) [299]] comunicaron beneficios en SLE para los brazos que recibieron IA tras 2-3 años de tamoxifeno. En la última actualización del estudio IES [295] se demostró un beneficio en SG para todas las pacientes RE+ o desconocido (HR 0.86, p<0.001). Un análisis conjunto de los tres estudios con anastrozol [300] reveló un beneficio significativo en SG (p=0.04), que se confirmó en

un segundo meta-análisis, esta vez incluyendo el ensayo con exemestano [291], con un incremento absoluto en SG a 6 años del 2.2%. Este segundo meta-análisis describió, además, que existía una reducción mayor de recurrencias durante los 3 años de tratamiento con IA (HR 0.60), que durante el periodo posterior (HR 0.92), sugiriendo la posibilidad de prolongar la duración de tratamiento con IA. En la mayoría de dichos estudios [295, 296, 299] la randomización se realizó a partir de los 2-3 años de la cirugía (*switching* propiamente dicho), lo que supone necesariamente un sesgo de selección de una población de mejor pronóstico, sin recaídas en los 2 primeros años. El único estudio que randomizó las pacientes inmediatamente tras la cirugía (secuencia propiamente dicha), el ABCSG 8 [306], comunicó inicialmente un beneficio en SLE que no resultó significativo. Estos resultados, aparentemente inferiores al *switching*, se atribuyeron en principio a la inclusión en el análisis de las pacientes con recaídas precoces. Sin embargo, una actualización posterior demostró que la estrategia secuencial también se relaciona con una mejor SLE y SG, y que la falta de beneficio previa se debía a la inclusión en el análisis de pacientes asignadas a tamoxifeno que habían sido cruzadas a anastrozol tras conocerse los resultados positivos de otros estudios. Por último, datos adicionales en cuanto a estrategia de secuencialidad vienen de la mano del estudio BIG1-98 [290]. Asumiendo la superioridad de letrozol vs tamoxifeno en base a datos previos, se comparó el brazo de letrozol en monoterapia vs ambas secuencias (tamoxifeno x 2 años seguido de letrozol x 3 años y Letrozol x 2 años, seguido de tamoxifeno x 3 años). El tratamiento con letrozol por 5 años se asoció a una mejor SLE, Supervivencia Libre de Enfermedad a distancia (SLED) con respecto a la secuencia tamoxifeno→letrozol, mientras que fue equivalente en SLE y SLED, con una tendencia a inferior SG, con respecto a la secuencia letrozol→tamoxifeno.

1.6.1.3 IA de continuación tras 5 años de tamoxifeno

Se sabe que más del 50% de recaídas en pacientes RE+ tratadas con tamoxifeno se producen más allá de los 5 años. En ello se basó el estudio MA.17, que randomizó las pacientes a recibir letrozol vs placebo tras 5 años de tamoxifeno. Un análisis interino, con 30 meses de seguimiento, reveló un beneficio significativo en SLE para todas las pacientes, así como un beneficio en SG para las pacientes con afectación

ganglionar. Ello hizo que se cerrara el estudio, se abriera el ciego y se ofreciera letrozol a las pacientes asignadas al brazo control. Tras esta decisión surgieron dudas sobre la duración óptima de tratamiento (2.5 vs 5 años, que era el diseño original). En una comunicación posterior se observó que las razones de riesgo de SLE y SLED mejoraban significativamente a medida que se prolongaba el tratamiento con letrozol hasta al menos 48 meses. De forma práctica la mayoría de investigadores ha ofrecido letrozol de continuación durante 5 años, incluso a pacientes de riesgo que habían permanecido algún tiempo sin THA, puesto que existen datos que sugieren beneficio en este subgrupo. El último análisis publicado del MA-17 [307], con 64 meses de seguimiento, y que utilizó técnicas estadísticas adecuadas para estudios randomizados con un alto porcentaje de cruzamiento en el brazo control (60%) comunicó un beneficio significativo en SLE, SLED y SG para todos los pacientes. Dos estudios más pequeños, el NSABP B33 [303] y el ABCSG6a [304], de diseño parecido, pero con exemestano y anastrozol, respectivamente, corroboran el beneficio en recurrencia con la continuación del IA tras haber recibido 5 años de tamoxifeno.

1.6.1.4 Tamoxifeno de continuación tras 5 años de tamoxifeno

Recientemente se han comunicado los resultados de los estudios ATLAS (*Adjuvant Tamoxifeno Longer Against Shorter*) [180] y aTTom (*Adjuvant Tamoxifeno To Offer More*) [308], que randomizaron a pacientes que habían recibido 5 años de tamoxifeno adyuvante y que no habían presentado recaída a continuar tamoxifeno durante 5 años más vs observación. La mayoría de pacientes incluidas eran postmenopáusicas. Ambos estudios describieron beneficio en SLR a partir del 7º año de seguimiento, objetivándose una reducción del riesgo de recaída del 15% en el estudio aTTom. En cuanto a mortalidad, y considerando únicamente la población RE positivo, se objetivó una reducción no estadísticamente significativa del riesgo de muerte por CM del 12% en el estudio aTTom, y del 17% en el estudio ATLAS, que en este caso sí alcanzó la significación estadística ($p=0.004$). Los datos combinados de ambos estudios mostraron una reducción del 15% de mortalidad por CM ($p=0.001$) y del 9% a nivel de mortalidad por todas las causas ($p=0.008$). La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) ha publicado recientemente un actualización de sus recomendaciones para el THA del CM [309], donde se

contempla el tratamiento con tamoxifeno por 10 años como una opción válida. Esta opción se aplicará sobre todo a pacientes premenopáusicas, puesto que 1) hoy en día se prefiere la introducción precoz del IA como THA en la población menopáusica, 2) las HR de SLR respecto placebo demostradas por los IA de continuación tras 5 años de tamoxifeno (por ejemplo HR 0.52, $p < 0.001$, en estudio MA.17 [302]) son mejores a las obtenidas con la continuación de tamoxifeno (HR 0.84 tanto en el estudio ATLAS como en el aTTom, $p = 0.003$ y $p = 0.006$ respectivamente).

1.6.1.5 Conclusiones y recomendaciones actuales del THA en pacientes postmenopáusicas

Los IA han demostrado consistentemente un beneficio en SLE, independientemente de la estrategia utilizada (inicio, *switching/secuencia*, o continuación), con un perfil de toxicidad aceptable. No todos los estudios individuales han descrito beneficios en SG, y en estos casos se han esgrimido razones diversas (mortalidad por causas intercurrentes, falta de seguimiento, alto porcentaje de cruzamiento o falta de poder estadístico). El incremento en SLE, y sobre todo en SLRD, se ha considerado un objetivo suficientemente válido para que la Sociedad Americana de Oncología recomendara en 2004 la inclusión de un IA en el tratamiento adyuvante de todas las pacientes postmenopáusicas RH positivos, ya sea de inicio, o tras 2-3 o 5 años de tratamiento con tamoxifeno, eso sí, estableciendo la necesidad de seguimiento, medidas de prevención y tratamiento precoz de los efectos adversos más comunes de éstos (pérdida de densidad mineral ósea e hiperlipemia) [310]. Desde la edición de 2009, el Consenso Internacional de St Gallen en relación al tratamiento adyuvante recomienda el tratamiento con IA en mujeres postmenopáusicas [311, 312]. El tratamiento inicial con IA resultará particularmente necesario en pacientes consideradas de alto riesgo, esto es, con tumores con alto índice de proliferación (Ki67), alto grado o afectación ganglionar, y actualmente constituye la estrategia más comúnmente empleada en nuestro medio. Además, los tumores con histología lobulillar parecen beneficiarse particularmente del tratamiento con IA de inicio [313]. En caso de mala tolerancia a IA de inicio (40% de artralgias a nivel asistencial) y, en base a los resultados de BIG 1-98, puede considerarse el cambio a tamoxifeno, sobre todo a partir de los 2 años. En caso de optarse por tamoxifeno de inicio, y

cambio a IA a los 2-3 años, las Guías Clínicas de ASCO 2016 recomiendan continuar el IA durante un mínimo de 5 años, con una duración, por tanto, de THA de 7-8 años [314]. Esta estrategia no se basa en resultados de ningún estudio individual, sino en la observación de la relativa pérdida de beneficio al discontinuar el IA tras sólo 2 o 3 años de tratamiento. En la última edición del Consenso de St. Gallen 2015, la mayoría de panelistas, al ser preguntados, subscribieron la opción de 5 años de IA tras 2-3 años de tamoxifeno [315]

Varios estudios (NSABP B-42, TEAM/NCT00279448, NCT 00036270, ABCSG 16/SALSA/NCT00295620, MA17R, IBCSG 35-07/SOLE/NCT01281137), algunos de ellos recientemente finalizados, han investigado la conveniencia de prolongar el IA durante más de 5 años. Sólo uno de ellos ha publicado ya resultados, el MA. R17 [316] que, efectivamente, describe una mejoría significativa (HR 0.66, $p=0.01$). Esta diferencia es del orden del 4% en términos absolutos de SLE invasiva y no se traduce en una mejoría de SG, puesto que la mayoría de recurrencias evitadas son a expensas de CM contralateral (HR 0.42, $p=0.007$)

1.6.2 THA en pacientes premenopáusicas

1.6.2.1 Tamoxifeno

A diferencia de las pacientes postmenopáusicas, el tamoxifeno durante 5 años, ha continuado siendo hasta fechas muy recientes el pilar indiscutible del THA en las mujeres premenopáusicas con CM cáncer de mama y positividad de RH. El meta-análisis de Oxford de 2005 [288] le confirió una reducción del 30 y 24% en los riesgos de recurrencia y muerte, respectivamente, para este subgrupo, beneficio que era independiente de la administración o no de QT. La última edición de dicho metaanálisis [32] ha confirmado unos beneficios absolutos a 15 años en mortalidad por CM en las pacientes menores de 45 años y RH positivos que recibieron 5 años de tamoxifeno respecto a las que no lo hicieron. Además el tratamiento con tamoxifeno se asoció a un menor toxicidad (cáncer endometrial y trombosis) en la población menor de 55 años.

En cuando a la extensión del tratamiento con tamoxifeno más allá de 5 años en población premenopáusica debemos referirnos de nuevo a los estudios ATLAS [180] y aTTom [308], cuyos datos de eficacia se resumen en la Tabla 28. Puesto que los IA no son efectivos en las mujeres premenopáusicas, la adyuvancia extendida con tamoxifeno se indica mayoritariamente a la población premenopásica. Debe mencionarse que sólo tres de los estudios del metaanálisis mencionado [317] describieron el estado menopáusico de las pacientes incluidas, y en éstos sólo 13% de las mujeres fueron premenopáusicas a la randomización, con lo cual la evidencia existente en esta población es menor. Sin embargo, este mismo meta-análisis no reveló diferencias en cuanto a eficacia de tamoxifeno extendido en función del estado menopáusico.

Tabla 28 Principales estudios randomizados de 5 vs 10 años de tamoxifeno y meta-análisis

Estudio	Población/ Seguimiento	Datos de recurrencia	Datos de mortalidad	Comentarios
ATLAS [180]	<p>RE+ N= 6846</p> <p>RE- N =1248</p> <p>RE? N = 4800</p> <p>Seguim(M): 10 años</p>	<p>Incidencia acumulada en población RE+:</p> <p>RR 5-9 años: 0.90 (0.79-1.02)</p> <p>RR ≥ 10 años: 0.75 (0.62-0.90)</p> <p>Log Rank (todo el período): p=0.002</p> <p>Riesgo acumulado de recurrencia en años 5-14: 10 vs 5 años de T: 21.4 % vs 25.2%</p>	<p>Incidencia acumulada en población RE+:</p> <p>RR 5-9 años: 0.97 (0.79-1.18)</p> <p>RR ≥ 10 años: 0.71 (0.58-0.88)</p> <p>Log Rank (todo el período): p=0.002</p> <p>Riesgo acumulado de muerte en años 5-14: 10 vs 5 años de T 12.2 % vs 15%</p>	<p>No eficacia en RE-</p> <p>Datos intermedios en ER-</p> <p>Incremento incidencia cáncer endometrio (de 1.6 a 3.1%) y de mortalidad por cáncer de endometrio (de 0.2% a 0.4%) con T >5 años</p> <p>Cumplimiento de tratamiento en brazo >5 años: 84% al 7º año, 60% a los 10 años</p>
aTTom [181]	<p>RE+ (n = 2,755) o ER desconocido (n = 4,198)</p> <p>Seguim (M): 9 años**</p>	<p>RR recurrencia global 0.86 [0.77–0.96], p = 0.006).</p> <p>RR recurrencia en función del período analizado</p> <p>Años 5–6: RR = 1.11 (0.89–1.37);</p> <p>Años 7–9: RR = 0.85 (:0.71–1.02);</p> <p>Años 10–14: RR = 0.72 (0.59–0.87);</p> <p>Años 15+: RR = 0.83 (0.56–1.24)</p>	<p>RR global de muerte por CM 0.91 (0.80–1.04), p = 0.2</p> <p>Beneficio en mortalidad por CM sólo observado a los 10–14 años des del inicio del tratamiento RR = 0.78 (0.64–0.95).</p> <p>RR muerte por cualquier causa RR = 0.95 (0.87–1.04) p = 0.2</p>	<p>Incremento incidencia cáncer endometrio (102 vs. 47, p <0.0001),</p> <p>Pero no aumento de mortalidad por cáncer de endometrio 10 vs. 5 years of tamoxifeno: 31 vs. 23, p = 0.27)</p>
Meta-análisis* [317]	<p>N =21554</p> <p>Seguim (M): 10 años</p>	<p>OR recurrencia (global): 0.89 (0.76-1.05), P=0.17</p> <p>-Durante tto extendido con T: OR 1.01 (0.79-1.29)</p> <p>-Una vez completado tto extendido con T: OR 0.80 (0.73-0.88)</p> <p>-En N+: OR 0.76, (0.63–0.92) Diferencia absoluta a 10años:4.1%</p> <p>-En N-: OR 0.93, 0.76–1.14), Diferencia absoluta a10años:2.1%</p> <p>OR recurrencia a distancia: 0.96 (0.66-1.38), P=0.81</p>	<p>OR muerte por cualquier causa (no selección por RE): 0.99 (0.84-1.16), P=0.82</p> <p>OR muerte por cualquier causa en ER+ : 1.11 (0.79-1.55), P=0.55</p>	<p>Incremento incidencia cáncer endometrio OR 2.06 (1.65-2.58)</p> <p>No aumento incidencia de otros cánceres</p> <p>No descenso de la mortalidad cardiovascular con tamoxifeno >5 años</p> <p>Datos sobre TVP/TEP no analizados (sólo reportados en 2 estudios)</p>

M: mediana; RE+/-/? : Receptor estrógeno positivo/negativo/desconocido; RR: razón de riesgo; OR: odds ratio,

IC95% expresados entre paréntesis; N+: ganglios positivos; N-: ganglios negativos; T= tamoxifeno;

TVP: tromboembolismo venoso profundo; TEP: tromboembolismo pulmonar

*Incluye, aparte de estudios ATLAS y aTTOm, estudios NSABP B14, Scottish Trial, ECOG 4181 y E51 81

** Seguimiento estimado en base al tiempo transcurrido entre comunicaciones de resultados

Con los datos mencionados, se considera hoy en día que la prolongación del tratamiento con tamoxifeno hasta 10 años debe valorarse particularmente en la paciente con larga expectativa vital y, sobre todo, de alto riesgo (con ganglios positivos), que persiste premenopáusica tras este período [309]. Siempre deberá sopesarse asimismo: a) la toxicidad atribuible a tamoxifeno en los primeros 5 años, y b) el deseo gestacional de la paciente, en cuyo caso obligadamente habrá de interrumpirse el tratamiento.

1.6.2.2. Supresión de la función ovárica en pacientes premenopáusicas: Evidencia previa a los resultados del estudio SOFT

Ya se ha indicado que la supresión de la función ovárica (SFO) puede obtenerse mediante maniobras ablativas definitivas (ooforectomía, irradiación ovárica) o reversibles (aGnRH). Su indicación como THA, después de más de 50 años de investigación, resulta todavía controvertida. Ello es así debido a limitaciones importantes en los estudios publicados hasta fechas muy recientes (2015), limitaciones tales como como falta de selección de la población por positividad hormonal, efecto propiamente castrante de la QT en muchos casos, que infravalora una maniobra supresiva adicional, y la falta de un brazo control estándar con tamoxifeno.

Hasta finales de 2014, los datos más relevantes sobre ablación/supresión ovárica adyuvante procedían de estudios individuales, del meta-análisis publicado en 2005 [288] y del meta-análisis del 2007 de ensayos con aGnRH en pacientes RH positivos [318]. En base a dicha evidencia, se podía afirmar lo siguiente:

- La ablación ovárica quirúrgica o rádica; como monoterapia; se ha asociado a una reducción significativa del 30% en los riesgos anual de recurrencia y de

muerte en ausencia de QT [288]. Por otro lado, la SFO con aGnRH en monoterapia se ha relacionado con una reducción del riesgo anual de recurrencia y muerte del 28 y 18%, respectivamente, sin significación estadística en este caso, probablemente por el número limitado de pacientes analizados y el menor seguimiento [318].

- El beneficio de la SFO (cualquier modalidad) es equivalente al obtenido con una QT basada en CMF (ésta causa amenorrea en un 60% de pacientes) y la asociación de SFO y tamoxifeno es o bien equivalente o bien superior a una QT con CMF o FAC/FEC.
- En cuanto al papel de la adición de SFO (cualquier modalidad) a QT en ausencia, y sobre todo, en presencia de tamoxifeno, los datos más relevantes publicados hasta 2014 procedían de seis estudios [319-324] y del meta-análisis de aGnRH. Los datos más relevantes de los mencionados seis estudios se resumen en la Tabla 29. Los tres ensayos de mayor envergadura (E 5188[320], IBCSG VIII[319]; FNCLCC[325]), no demostraron beneficio en SLE con la adición del aGnRH (2, 3 o 5 años) para el grupo global de mujeres, pero en todos ellos se sugirió un beneficio de éste tras QT para las mujeres menores de 40 años RE positivos. En el ZIPP trial [323] la adición de goserelina se asoció a una reducción significativa del 20% en riesgo de recurrencia y de muerte para el grupo global de pacientes, pero no para las pacientes tratadas previamente con QT. Un 5º estudio (GABG-IVB93) [322] no demostró diferencias con la adición de goserelina a una QT basada en CMF o E-CMF.

Tabla 29. Principales estudios sobre SFO en pacientes premenopáusicas con o sin tamoxifeno hasta 2015

Referencia	N	Tratamiento	Estado RH	Seguim (a)	Resultados
IBCSG VIII [319]	874 N-	Gx 2 a vs CMF oral vs CMF→G	RE+:68% RE-: 30% RE?: 3%	7	No beneficio con adición de goserelina Pacientes jóvenes tendieron a beneficiarse de CMF→G
E 5188/INT0101 [320]	1053 N+	CAF vs CAF+ G (5a) vs CAF+G (5a)+Tam (5a)	RE+100%	9.6	No beneficio con la adición de G a CAF (sí en pacientes < 40 años) CAF+G+Tam: mejor DFS
FNCLCC [325]	926 N+ o G2/3	RT ovárica o triptorelina x 3a Tras QT vs QT sola (77% con adria)	RH+69 RH- 19% RH?12%	9.5	No beneficio con SFO Mejor SLE en pacientes < 40 años y RH+
ZIPP trial[323] (4 estudios)	2710 Diseño 2x2 o simple random: G si/no 43% N+	G + T x 2 a vs G x 2 a vs T x 2 a vs nada 56% sin QT previa	RE+ 51% RE - 24% RE? 25%	5.5	Mejor SLR y SG con G en todos los pacientes Mejor SLR con G en pacientes sin QT SG (G vs nada): HR 0.71(0.52-0.96) Evidencia insuficiente para concluir superioridad de G+T vs T solo
GABG IV-A-93[322]	771 N-	G x 2a vs CMF x 3	HR ≈100%	4.9	SLR: Sin diferencias
ABC trial[324]	2144 Random. Previa a QT o no permitida	Ablación/aGnRH vs no T x 5 a QT previa: 78% 91% AO	RE + 39% RE -18% RE? 43%	5.9	SLE y SG: sin beneficio Tendencia a beneficio en mujeres<40 a sin QT

Seguim: seguimiento; a: años, RE+/-/? : receptores estrógeno positivos, negativos o desconocidos, goserelina; T: tamoxifeno, : CAF: Ciclosfosfamida, Adriamicina, 5

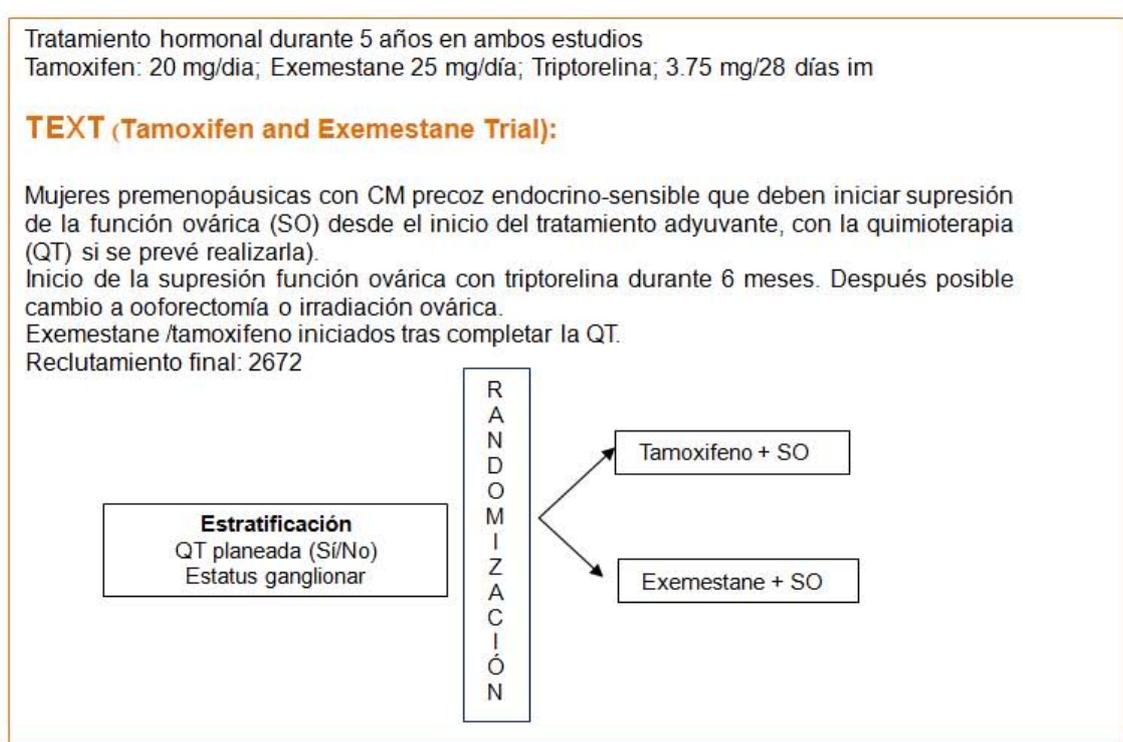
Fluorouracilo; CMF: ciclofosfamida, Metotrexate, 5 Fluorouracilo; SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad; SLR, Supervivencia Libre de Recurrencia, SG: Supervivencia Global

En el meta-análisis de SFO con aGnRH (2741 pacientes) [318] la adición de éstos ca QT con o sin tamoxifeno se relacionó con una mejoría significativa en el riesgo anual de recurrencia y muerte, del 12 y 13%, respectivamente. Dicho beneficio se limitaba a la población menor de 40 años, precisamente aquélla con menor probabilidad de amenorrea quimioinducida. De los 13 estudios que contribuyeron a este meta-análisis, sólo se utilizó tamoxifeno en 4 de ellos, en los estudios integrantes del *Zoladex In Pre-menopausal Patients* o ZIPP trials [323]). A estos datos se añadían los procedentes del estudio ABC [324, 326], en el que 2144 pacientes tratadas con tamoxifeno adyuvante fueron randomizadas a recibir o no SFO (cualquier método). El análisis por subgrupos también demostró beneficio estadísticamente significativo sólo en el subgrupo de pacientes menores de 40 años que no habían recibido QT. Tanto el estudio ZIPP como el ABC mostraron limitaciones metodológicas (tasa baja de pacientes RH positivos y asignación electiva de QT, e incluso de tamoxifeno). Dichos sesgos y, sobre todo, la falta de un estudio individual adecuadamente dimensionado que estudiara el papel de la adición SFO frente a un brazo puro de QT y tamoxifeno durante 5 años explican que esta cuestión, la más importante teniendo en cuenta los estándares de tratamiento hasta la actualidad, no estuviera definitivamente resuelta, aunque parecía razonable considerar la adición de SFO en pacientes menores de 40 años y/o sin amenorrea quimioinducida.

Afortunadamente esta pregunta ha sido abordada en el estudio SOFT, publicado en Enero 2015 [327] . En este estudio más de 3000 mujeres con tumores RE positivos y niveles de E2 tra QT (si la habían recibido) en el rango de la premenopausia fueron randomizadas a recibir tamoxifeno (brazo A), o SFO + tamoxifeno (brazo B), o SFO con exemestano (brazo C), siempre durante 5 años (Ver Figura 32). El objetivo primario fue la comparación de SLE entre los brazos A y B, mientras que la SLE entre los brazos C y A, así como el Intervalo libre de Recurrencia Invasiva (ILRI), la Supervivencia Libre de Enfermedad a Distancia (SLED) y la SG fueron objetivos

secundarios. Con 5.6 años de mediana de seguimiento, la adición de SFO a tamoxifeno se asoció a un beneficio en SLR que sólo alcanzó la significación estadística en el análisis multivariado. En un análisis pre-planificado se demostró que las pacientes que habían recibido QT (y que por definición, persistían premenopáusicas tras ella) se beneficiaban significativamente de la adición de SFO a tamoxifeno, mientras que no había diferencias significativas en la población sin QT previa y que, obviamente, tenía factores de buen pronóstico. Además se observó que las pacientes más jóvenes (<35 años, 94% de ellas con QT previa) se beneficiaban particularmente de la adición de SFO a tamoxifeno, y que, además, obtenían una ganancia adicional si éste se substituía por exemestano. No hubo en ningún caso diferencias en SG, aunque el estudio es muy inmaduro en este sentido. Resultados detallados del estudio SOFT (y adicionalmente del estudio TEXT, que se comentará más adelante) se presentan en las Tablas 30 y 31. En cuanto a calidad de vida se reportó una mayor carga de efectos adversos, sobre todo síntomas menopáusicos y de la esfera sexual, con la adición de SFO, particularmente durante los 2 primeros años, pero con una calidad de vida global similar [328]

Figura 32. Diseño de los estudios SOFT y TEXT



SOFT (Suppression of Ovarian Function Trial):

Mujeres premenopáusicas con CM precoz endocrino-sensible que continúan premenopáusicas después de QT o únicamente cirugía.
 Tamoxifeno iniciado con triptorelina y exemestane tras 6-9 semanas de inicio de triptorelina
 N prevista: 3000 pacientes; Reclutamiento final: 3066 pacientes
 En un 81% de casos la SO se indujo con triptorelina durante los 5 años de tratamiento

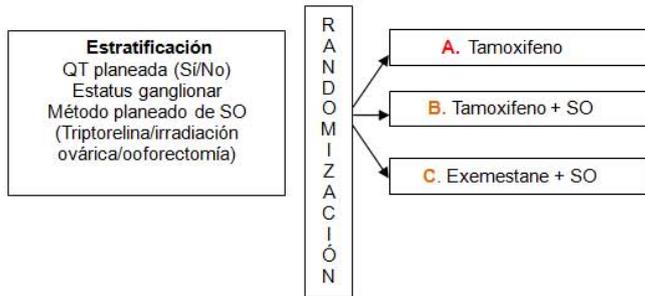


Tabla 30. Estudios SOFT y análisis combinado de los brazos con SFO en estudios SOFT y TEXT

Estudio	N	Características población	SLE	ILCMInv	SLRD
SOFT[327]					
Grupo Global	Brazos A y B: 2033	Brazos A y B: 43 años (M) N+:35% T>2cm: 32% G1:27% G3: 22% HER2+:12% Tiempo desde IQ: 3.2 meses	Brazo B vs A (obj 1 ^{ario}): Análisis Univariado: 86.6 % vs 84.7 % HR 0.93 (IC 95% 0.66-1.04), P=0.10 Análisis Multivariado HR 0.78 (IC 95% 0.62-0.98), p 0.03 Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 89.0% vs 84.7 % HR 0.68 (IC 95% 0.53-0.96)	Brazo B vs A (obj 2 ^{ario}): 88.4 % vs 86.4 % HR 0.81 (IC 95% 0.63-1.03), P= 0.09 Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 90.9% vs 86.4% HR 0.64 (IC 95% 0.49–0.83)	Brazo B vs A (obj 2 ^{ario}): 91.3 % vs 90.7 % 0.88 (0.66–1.18) P= 0.40 Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 93.0% vs 90.7 % HR 0.71 (IC 95% 0.52–0.96)

SOFT (Cont)	N	Características población	SLE	ILCMinv	SLRD
Sin QT (47%)	949	46 años (M) N+:9% T>2cm: 14% G1:41% G3: 7% HER2+:4% Tiempo desde IQ: 1.8 meses		Brazo B vs A (obj 2 ^{ario}): 95.1.% vs 95.8% HR 0.95 (IC 95% 0.54-1.69) Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 97.1.% vs 95.8% HR 0.59 (IC 95% 0.31-1.14)	Brazo B vs A (obj 2 ^{ario}): 98.7.% vs 98.6% HR 0.95 (IC 95% 0.54-1.69) Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 99.3.% vs 98.6% HR 0.59 (IC 95% 0.31-1.14)
QT previa (53%)	1084	40 años (M) N+:57% T>2cm: 47% G1:14% G3: 35% HER2+:18% Tiempo desde IQ: 8.0 meses		Brazo B vs A (obj 2 ^{ario}): 82.5.% vs 78.0% HR 0.78 (IC 95% 0.60-1.02) Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 85.7.% vs 78.0% HR 0.65 (IC 95% 0.49-0.87)	Brazo B vs A (obj 2 ^{ario}): 98.7.% vs 83.6% HR 0.87 (IC 95% 0.64-1.17) Brazo C vs A (obj 2 ^{ario}): 99.3.% vs 83.6% HR 0.72 (IC 95% 0.52-0.98)
<35 años (11.5%)	350	QT previa: 94%		A vs B vs C: 67.7% (IC 95% 57.3-76.0) vs 78.9% (IC 95% 69.8-85.5) vs 83.4% (IC 95% 74.9-89.3)	
SOFT-TEXT (análisis combinado)[329]					
Global	4690	<40 años: 27% N+:42% T>2cm: 36% HER2+:12% Tiempo desde IQ: 1.6 meses	Brazo Exe vs Tam: 91.1% vs 87.3% HR 0.72 (IC 0.60-0.95) P=0.0002	Brazo Exe vs Tam: 92.8%vs 88.3% HR 0.66 (IC 0.55-0.80) P<0.0001	Brazo Exe vs Tam: 93.8% vs 92% HR 0.78 (IC 0.62-0.97) P= 0.02
SOFT Sin QT	943	<40 años: 9% N+:8% T>2cm: 15% HER2+:3% Tiempo desde IQ: 1.8 meses		Brazo Exe vs Tam: 97.5% vs 94.8% HR 0.53 (IC 0.26-1.06)	
SOFT QT Previa	1087	<40 años: 49% N+:57% T>2cm: 47% HER2+:18% Tiempo desde IQ: 8 meses		Brazo Exe vs Tam: 86.1 %vs 82.2% HR 0.82 (IC 0.60-1.12)	Brazo Exe vs Tam: 88 %vs 84.6% HR 0.81 (IC 0.58-1.13)
TEXT Sin QT	1053	<40 años: 16% N+:21% T>2cm: 19% HER2+:5% Tiempo desde IQ: 1.5 meses		Brazo Exe vs Tam: 97.6% vs 94.6% HR 0.41 (IC 0.22-0.79)	

TEXT Con QT	1607	<40 años: 30% N+:66% T>2cm: 53% HER2+:17% Tiempo desde IQ: 1.2 meses	Brazo Exe vs Tam: 91.5 % vs 86.0% HR 0.64 (IC 0.48-0.85)	Brazo Exe vs Tam: 91.8 % vs 89.2% HR 0.77 (IC 0.56-1.06)
------------------------	------	---	---	---

Tabla 31. Efectos adversos en estudios SOFT y TEXT

	SOFT				SOFT-TEXT (análisis combinado)				
	Tam (N=1006)		Tam + OS (N=1005)		Tam+OS (N=2325)		Exe+OS		
	G1-4 (%)	G3-4(%)	G1-4(%)	G3-4(%)	G1-4(%)	G3-4(%)	G1-4(%)	G3-4(%)	
Depresión	47	4	52	4	50	4.4	50	3.8	
Musculoesquelético	69	6	75	5	76	5.2	89	11	
Osteoporosis (T score <2.5)	12 (3)	0.1	20(6)	0.3	25 (6%)	0.3	39 (13%)	0.4	
Fractura					5.2	0.8	6.8	1.3	
Hipertensión	17	5	23	7					
Isquemia cardíaca/Infarto					0.3	0.1	0.7	0.3	
Trombosis/embolismo					2.2	1.9	1.0	0.8	
Isquemia SNC					0.3	0.1	0.7	0.3	
Sangrado SNC					0.9	0.1	0.6	<0.1	
Sofocos	80	8	93	13	93	12	92	10	
Sudoración	48	-	62	-	59	-	55	-	
Sequedad vaginal	42	-	50	-	47	-	52	-	
Descenso líbido	42	-	47	-	41	-	45	-	
Dispareunia	-	-			26	1.4	31	2.3	
Incontinencia urinaria	-	-			18	0.3	13	0.3	
Insomnio	46	3	57	5					
Intolerancia glucosa/Diabetes*	2	0.3	3	1	-	-	-	-	
Hiperglicemia*	2	0.1	5	1	-	-	-	-	
Efecto adverso G3.4 (cualquiera)		24		31					
Discontinuación por efectos adversos	Tam: 21.7%		.Tam: 16.7% No adherencia a SO: 5.0% año 0 9.2%, 1 ^{er} año 14.9%, 2 ^o año 18.3%, 3 ^{er} año 21.9%4 ^o año		-		-		

*Recogida de efecto adversos añadido en curso del estudio, por tanto con posibilidad de infraestimación

1.6.2.3. IA

La eficacia de los IA junto con SFO se ha explorado en estudios randomizados. El ABCSG-12 comparó goserelina + tamoxifeno vs goserelina + anastrozol durante 3 años en 1803 mujeres premenopáusicas no tratadas con QT (95% de la población incluida). En su última actualización [330] ha descrito similar SLE en ambos brazos de tratamiento, pero peor SG para el grupo que recibió anastrozol. El estudio ha sido criticado por la falta de un brazo estándar con tamoxifeno, el tiempo preestablecido de THA (3 años) y la falta de poder estadístico para determinar diferencias. Un segundo estudio, el TEXT, ha comunicado resultados en combinación con el estudio SOFT, ya que ambos ensayos compartían 2 brazos de tratamiento [329] (Ver Figura 31). Al igual que en el estudio SOFT, las pacientes del TEXT podían o no recibir QT, pero en este caso la randomización era previa al inicio de ésta y la triptorelina se iniciaba junto con la QT, añadiéndose después tamoxifeno o exemestano al acabarla. Tras 5.7 años se demostró una mejoría en SLE, intervalo libre de CM invasivo y SLED para todas las pacientes y, en particular, para la cohorte que había recibido QT. En las Tablas 31 y 32 se especifican más detalles sobre la población incluida y sobre los resultados obtenidos en cuanto a eficacia y toxicidad. Aunque el perfil de efectos adversos fue algo diferente entre ambos grupos, la calidad de vida global fue similar en ambos brazos [331].

1.6.2.4. Conclusiones sobre el THA en mujeres premenopáusicas

El tratamiento con tamoxifeno durante 5 años ha constituido el THA estándar para las pacientes postmenopáusicas RH+. Datos recientes han ampliado las opciones de tratamiento, de manera que hoy en días pueden hacerse las siguientes recomendaciones, en línea con la Conferencia de Consenso de tratamiento adyuvante de St Gallen 2015 y las guías clínicas de ASCO de THA de 2016 [29, 314]:

- En las pacientes <35 años, o con factores de alto riesgo (N+, N- con factores de riesgo) o candidatas a QT el tratamiento de elección será exemestano+triptorelina x 5 años (con posibilidad de cambio a tamoxifeno+triptorelina en caso de mala tolerancia: de ser ésta la situación, podría plantearse este cambio preferiblemente tras 2 años, de forma similar al estudio BIG

1-98 en postmenopáusicas; en ocasiones incluso será necesario desescalar a tamoxifeno por mala tolerancia también a tamoxifeno+triptorelina).

- En pacientes de bajo riesgo (<T2, tumores luminal A o con bajo riesgo por plataforma génica, o N0), el tratamiento con tamoxifeno x 5 o 10 años puede ser una alternativa válida, aunque la mayoría de expertos desestiman continuar hasta 10 años si no existen factores de alto riesgo (N+, G3 y/o Ki 67 elevado)
- La introducción de IA en pacientes perimenopáusicas con amenorrea quimioinducida sólo debe considerarse tras asegurar conversión a estatus menopáusico, preferiblemente tras 2, 3 o 5 años de tamoxifeno. En esta situación debería comprobarse bioquímicamente la ausencia de recuperación de niveles de estrógenos a los pocos meses de haber iniciado el IA, y se advertirá a la paciente de reconsultar en caso de metrorragia/menstruación
- En pacientes que han completado 5 años de tamoxifeno se considerará HT de continuación en función de riesgo de recaída (sobre todo N+), tolerancia previa a tratamiento hormonal y/o deseo de gestación. Para estimar el riesgo de estas recurrencias tardías puede ser útil la utilización de plataformas génicas que se han utilizado en el momento del diagnóstico. Para la HT de continuación se valorará tamoxifeno o IA, si se estima que hay conversión a estado postmenopáusico.
- No existen datos de HT de continuación tras 5 años de SO + tamoxifeno/exemestano, situación que se presentará cada vez más frecuentemente en los próximos años. En pacientes de alto riesgo puede considerarse extender la adyuvancia hormonal posiblemente con tamoxifeno o IA (si conversión a menopausia)

1.7 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS CIRCULANTES. NIVELES DE ESTRÓGENOS Y GONADOTROPINAS EN PACIENTES PRE Y POSTMENOPÁUSICAS CON O SIN TRATAMIENTO HORMONAL

1.7.1. Métodos de determinación de estrógenos circulantes.

Como ya se ha apuntado en la Sección 1.5.3, existen diferentes métodos de determinación de los estrógenos circulantes, que se podrían dividir básicamente en tres grandes grupos: métodos inmunológicos o inmunoanálisis, métodos basados en espectrometría de masas en tándem, y métodos biológicos o bioanálisis [332].

1.7.1.1 Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos pueden ser directos o indirectos.

Los *métodos indirectos* son generalmente radioinmunoensayos (RIA, del inglés *radioimmunoassays*) que están precedidos por una fase de purificación del compuesto a analizar. Por lo que respecta a E2, éste es separado de la SHBG y de esteroides conjugados hidrosolubles que pudieran potencialmente presentar reacción cruzada con el suero anti E2. Esto se consigue tratando las muestras con un solvente orgánico como el dietil-éter, con lo que se separan los esteroides presentes. En caso de que las pacientes sean tratadas con un compuesto esteroide como exemestano será necesario añadir un procedimiento previo de cromatografía. Esto último requiere tiempo y trabajo adicional, pero aumenta la precisión.

Los *métodos directos* omiten la fase de pre-purificación, puesto que se han desarrollado para optimizar la velocidad y la simplicidad. Desplazan igualmente E2 de la SHBG, pero presentan un efecto matriz importante y pueden presentar reacciones cruzadas con compuestos esteroideos. Ello los hace inadecuados para medir E2 en situaciones donde se esperan niveles bajos, como son mujeres postmenopáusicas, sobre todo si están en tratamiento con IA. La mayoría de métodos comerciales, incluso los etiquetados como ultrasensibles, adolecen de la sensibilidad y especificidad necesarias para medir con precisión los niveles de E2 de las mujeres postmenopáusicas.

Debido a las cuestiones de sensibilidad y especificidad mencionadas los resultados de los niveles de E2 difieren entre los diferentes métodos. En base al análisis de nueve estudios prospectivos en CM se ha comunicado que la mediana de los niveles de E2 con métodos directos (4 estudios) oscila entre 21.7 y 101 pmol/L, mientras que es claramente inferior cuando se utilizan métodos indirectos (entre 22 y 58.7 pmol/L) [332]

1.7.1.2. Métodos basados en espectrometría de masas en tándem: GC-MS/MS (del inglés, *Gas Chromatography/tandem mass spectrometry*) y LC-MS/MS (del inglés *Liquid Chromatography/ tandem mass spectrometry*)

La GC-MS/MS es el método considerado estándar para la medida de estrógenos séricos [333, 334]. Fue el método utilizado en nuestro trabajo, por lo que se explicará con mayor detenimiento.

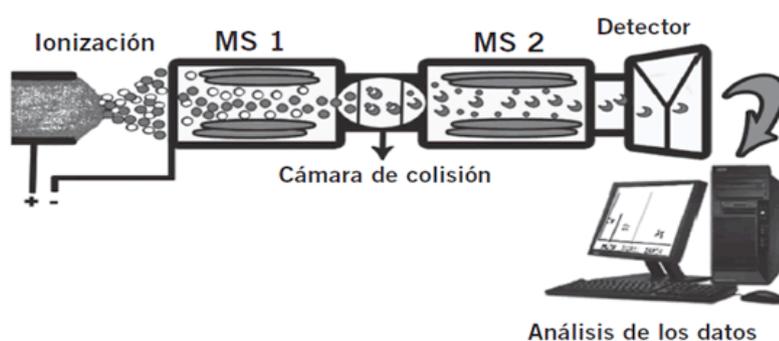
Un espectrómetro de masas (Figura 33) es un instrumento especializado que detecta moléculas midiendo su peso (masa). Los espectrómetros de masas miden el peso electrónicamente y presentan los resultados en la forma de espectro de masas, es decir, en una gráfica que muestra cada molécula específica por peso y cantidad de moléculas presentes. El espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) combina al menos dos fases de análisis de masas, entre las que media, o bien un proceso de disociación, o bien una reacción química que motiva un cambio en masas o en un ion. Comúnmente el primer analizador se usa para aislar un ion precursor; éste sufre a continuación un proceso de fragmentación, ya sea espontánea o inducida, que da lugar a fragmentos neutrales e ionizados. El segundo espectrómetro de masas analiza los productos iónicos. Gracias a este proceso la especificidad del análisis se incrementa no sólo por mediación de la cuantificación de una masa específica, sino porque ésta se asocia a una fragmentación determinada de productos ionizados [335].

Por otra parte, la cromatografía de gases es una técnica cromatográfica (método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas), en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución (proceso de separación de un material de otro por medio de un solvente) se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de

cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar éste a través de la columna.

En el caso de la GC-MS/MS utilizada en nuestro estudio el análisis de E2, E1 y E1S requiere al menos 1 ml de plasma o suero. Las muestras se introducen en cartuchos de fase sólida, de manera que se obtienen 2 fracciones separadas, una conteniendo E1 y E2, y la segunda integrada por los conjugados de E1. A continuación se eluyen las diferentes fracciones con acetato de etilo, en primer lugar la fracción que contiene los conjugados de E1 y después la fracción que contiene E1 y E2. Los conjugados de E1 son sometidos, además, a un proceso de hidrólisis para convertirlos en E1, la cual sufrirá a continuación varios procesos de derivativización. Por derivativización se entiende la conversión de un compuesto químico en un derivado para facilitar así su identificación, lo cual mejora la selectividad y especificidad del método. Una vez obtenida la E1 derivativizada ésta es introducida en el espectrómetro de masas para su análisis. Para su cuantificación se utilizará un método de adquisición para un único analito. Para la fracción de E2 y E1 no será necesario el proceso de hidrólisis. E2 y E1 sufrirán igualmente derivativizaciones, tras lo cual E1 y E2 derivativizadas son introducidas en el espectrómetro de masas, utilizando en este caso un método de adquisición para 2 analitos. Tanto para una y otra fracción las muestras derivativizadas son separadas por cromatografía de gases utilizando una columna capilar de DB-17/sílice y mediante un proceso que utiliza ionización química de iones negativos.

Figura 33. Funcionamiento esquemático del espectrómetro de masas en tándem



Aunque las técnicas basadas en espectrometría de masas permiten detectar esteroides con mucha mejor precisión que los inmunoensayos, tiene como desventajas su coste y que sólo están disponibles en un número limitado de centros especializados. Aunque son mejores que los RIA, su sensibilidad y precisión no es siempre consistente, por lo que los métodos basados en la espectrometría deben someterse a la misma validación rigurosa que los inmunoensayos, incluyendo comparación con respecto a variables fisiológicas con probada relación con los estrógenos, como es el IMC. En el caso de la técnica de GC-MS/MS utilizada en nuestro estudio (inVentiv Health Technology, antes Taylor Technologies, Inc.) esta validación se ha realizado de forma rigurosa [336].

En un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas en las que se compararon tres métodos indirectos y cuatro directos con GC-MS/MS, se vio que los niveles medios de E2 en ausencia de ningún tratamiento fueron 14 y 68% mayores, respectivamente, y menos reproducibles que con GC-MS/MS [334]. Los niveles medios de E2 con GC-MS/MS oscilaron entre 4 y 67.9 pmol/L (1.08 y 18.49 pg/mL). Además, cuando se utilizó el IMC como medida fisiológica relacionada con E2, se vio que el E2 medido por GC-MS/MS presentaba la correlación más potente con dicho parámetro.

La GC-MS/MS también ha demostrado superioridad con respecto a RIA cuando se ha tratado de medir E2 en pacientes postmenopáusicas que reciben IA, situación ésta que exige la utilización de métodos muy sensibles y específicos. En un estudio con postmenopáusicas los niveles de E2 fueron superiores con el RIA indirecto que con GC-MS/MS, tanto en situación basal como en tratamiento con IA (Ver también Tabla 33). El grado de supresión estrogénica con IA detectado con RIA fue del 58% mientras que con GC-MS/MS se demostró un porcentaje de supresión superior al 89%. Ello se interpreta como que la mayoría de RIA detectan metabolitos estrogénicos que presentan reacción cruzada con E2 [336]. La Tabla 32 muestra los niveles de E2 medidos con este método en pacientes postmenopáusicas con CM antes y después del tratamiento con IA.

Tabla 32. Niveles de estrógenos determinados en mujeres con menopausia natural o inducida con aGnRH medidos por GC-MS/MS

Autor	N	Niveles estrógenos (media) en mujeres postmenopáusicas sin tratamiento	Tipo AI	E2 en mujeres en tratamiento con AI
Lee[334]	374	E2: 5.6 pg/mL	-	
Lønning[220]	147	E2: 4 pg/mL E1:21 pg/mL E1S:179 pg/mL	Exemestano	Reducido en 83% Reducidos en 93% Reducidos en 93%
Santen[336]	55	E2 (media) 5.9pg/mL	Atamestano o Letrozol	<0.63 pg/mL.
Januzzo[255]	28	(Con Trip +placebo) Media AUC _{d36-47} para E2: 54 pg d/mL Media AUC _{d36-47} para E1: 198 pg d/mL	Exemestano+ Trip	Media AUC _{d36-47} para E2: 20 pg d/mL Media AUC _{d36-47} para E1: 38.9 pg d/mL

AUC: área bajo la curva (del inglés *area under curve*); Trip: triptorelina

Otro método basado en espectrometría de masas es el que va precedido por una fase de cromatografía líquida (LC-MS/MS). La LC-MS/MS tiene como ventajas con respecto a GC-MS/MS que no precisa de una derivatización, por lo que es más rápido y se asocia a menores errores estadísticos. La primera generación de LC-MS/MS carecía de la sensibilidad suficiente, pero en la última década se ha mejorado mucho esta tecnología y hoy en día se dispone de nuevos sistemas de LC-MS/MS que compiten en sensibilidad con los sistemas GC-MS [337, 338].

1.7.1.3. Métodos biológicos

Se basan en los mismos principios que un inmunoensayo competitivo, esto es, en la interacción ligando-proteína, pero utiliza un receptor fisiológico en lugar de un anticuerpo. Entre ellos destacan los métodos que utilizan la línea celular inmortal He LA o bien levaduras, y que han reportado límites de detección entre 1.0 pmol y 7.3 pmol/L. Sus resultados suelen correlacionar bien con los métodos más convencionales, pero son técnicamente muy demandantes, lo que hace que no sea posible su uso de forma rutinaria [332],

1.7.2. Niveles de estrógenos y gonadotropinas en pacientes pre y postmenopáusicas. Cambios atribuibles a tratamiento hormonal. Impacto del IMC en los niveles de estrógenos

Tanto estrógenos como FSH y LH experimentan cambios, no siempre bien definidos con los diferentes tratamientos hormonales.

1.7.2.1. Cambios hormonales inducidos por tamoxifeno en mujeres premenopáusicas, postmenopáusicas y con amenorrea quimioinducida

Con *tamoxifeno*, los niveles circulantes de E2 aumentan mucho en mujeres premenopáusicas (entre 1 y 8 veces) [339, 340], supuestamente por el efecto estimulador directo del fármaco a nivel del ovario [339], sin que, en general, ello impida la continuación de menstruaciones. En un subgrupo de estas mujeres, sin embargo, el hiperestrogenismo es tan marcado que conlleva, paradójicamente, el desarrollo de amenorrea y ovarios con quistes foliculares [341, 342]. En estos casos se postula que el tamoxifeno inhibiría tanto el *feed-back* negativo del E2 a nivel de la hipófisis, como el *feed-back* positivo que motiva el pico de LH, de manera que éste no se produciría. En situación de elevado hiperestrogenismo los valores mínimos y máximos de la FSH a lo largo del ciclo tienden a ser más elevados que en mujeres que no están en tratamiento con tamoxifeno[343]. Otros estudios han descrito, en

cambio, que los niveles de gonadotropinas no suelen modificarse por lo general, en pacientes premenopáusicas tratadas con este antiestrógeno. [339, 340]. Por lo que respecta a los niveles de E1 y progesterona, éstos también suelen elevarse entre una y tres veces con respecto a los controles, mientras que los niveles de prolactina disminuyen un 30-40% y los niveles de SHBG no suelen afectarse [340].

En *mujeres postmenopáusicas sin tratamiento hormonal*, y utilizando métodos de determinación altamente sensibles, los niveles medios de E2 oscilan entre 2.72 y 5.44 pg/mL mientras que las medias geométricas de E1 y E1S son de 20.27 y 114.89 pg/mL, respectivamente (con sendos IC 95% de 17.3-23.24 y de 89.48 y 147.06 pg/mL) [344]. Los niveles de E1S circulantes son importantes porque suponen una fuente de estrógenos para las células tumorales, ya que se sabe que éstas disponen de la actividad enzimática para convertir E1S en E2 *in situ* [345, 346]. Cuando las pacientes postmenopáusicas reciben *tamoxifeno*, los niveles de E1 no suelen alterarse. Por el contrario, los niveles de E2 se reducen (reducción media 12%, $p < 0.005$), y los niveles de E1S aumentan (incremento medio 18,1%, $p < 0.05$). Consiguientemente la *ratio* E1S/E1 y, sobretodo, la *ratio* E1S/E2, aumenta significativamente. El descenso de E2 se atribuye a un descenso de secreción de testosterona ovárica. Por lo que respecta a los niveles de gonadotropinas y SHBG, se ha observado una disminución estadísticamente significativa de la FSH y LH (caída del 45.5 y 48.1%, respectivamente) [347] y un aumento notable (+65%, $p < 0.0001$) de la SHBG. Este último incremento no parece influir demasiado en la fracción libre de E2 plasmático (2-3%), puesto que parece compensarse por una menor fracción de E2 unido a la albúmina [348].

Por último, en lo que respecta a *pacientes en principio premenopáusicas que desarrollan amenorrea quimioinducida* y presentan niveles de E2 en el rango de la postmenopausa, cabe decir que el tratamiento con tamoxifeno se asocia a niveles de FSH inferiores a las pacientes, que en la misma situación clínica, no han recibido tamoxifeno [283]

1.7.2.2. Cambios hormonales inducidos por IA

En lo que respecta al tratamiento con IA, se ha comentado repetidamente que no son efectivos en *mujeres premenopáusicas*. Si se administra IA a una paciente

premenopáusicas, el descenso de E2 inicial derivado de la inhibición de la aromatasa ovárica resulta en un incremento de los niveles de FSH y LH, que a su vez, estimulan tanto la producción de andrógenos (LH, células de la teca del ovario) como la producción de enzima aromatasa (FSH, células de la granulosa), lo que acaba contrarrestando el descenso de estrógenos producido inicialmente.

En las *pacientes postmenopáusicas*, el efecto del tratamiento con IA sobre los niveles estrogénicos se ha comentado anteriormente. Por lo que hace referencia al efecto de los IA sobre las gonadotropinas, de destacan los datos publicados del estudio adyuvante HOBEO [349] en población postmenopáusicas. En este estudio 157 pacientes postmenopáusicas fueron randomizadas a tamoxifeno o letrozol con o sin ácido zoledrónico. De estas 157 mujeres se pudo obtener muestras para determinaciones hormonales en 139 casos. La Tabla 33 recoge los niveles de FSH y LH basales y tras 6 y 12 meses de tratamiento. Como puede verse, la FSH disminuyó con tamoxifeno, mientras que aumentó levemente en las pacientes con letrozol. La LH descendió con ambos tratamientos, pero más marcadamente con tamoxifeno.

Tabla 33 Cambios en los niveles de gonadotropinas en las *mujeres postmenopáusicas* incluidas en el estudio adyuvante HOBEO [349].

	Basal		Cambio a 6 meses (%)		Cambio a 12 meses	
	T (N=43)	L (N=96)	T(N=41)	L(N=89)	T(N=39)	L(N=84)
E2 (M) pg/mL	9.7	9.3	2.6	-3.2	2.8	-3.7
FSH (M)	57.9	64.9	-18.6	6.5	-25.8	5.0
LH (M)	28.6	30.3	-8.3	-2.5	-12	-3.55

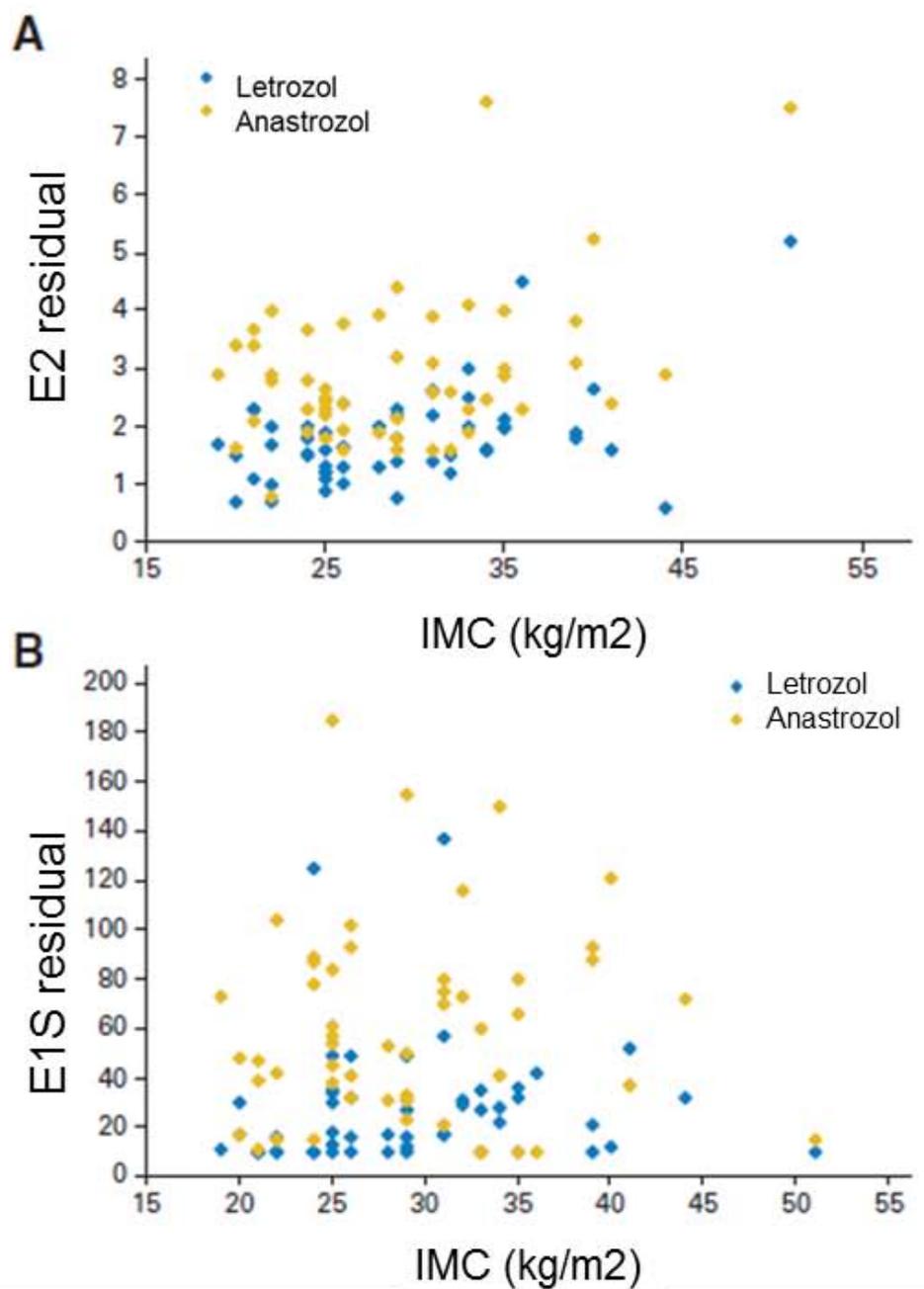
M=mediana

En el estudio HOBEO se incluyeron, asimismo, 81 pacientes premenopáusicas tratadas con triptorelina [265]. En este caso, y tal y como se ha explicado en la Sección 1.4.4 se observó que el tratamiento con triptorelina-letrozol indujo una mayor supresión de LH que tamoxifeno+triptorelina ($P < 0.0005$) a los 6 meses, mientras que la FSH estuvo suprimida tras la iniciación de ambos tratamientos, pero esta supresión fue menor con letrozol que con tamoxifeno ($P < 0.0001$).

1.7.2.3. Impacto del IMC en los niveles de estrógenos

Se ha estudiado la relación entre el Índice de Masa Corporal (IMC) y los niveles de estrógenos en mujeres postmenopáusicas de forma basal y tras tratamiento con IA. Así, un estudio con 54 mujeres postmenopáusicas tratadas 3 meses con letrozol (2.5 mg) seguidos de 3 meses con anastrozol (1 mg) o bien con la secuencia inversa, evaluó E2 y E1S de forma basal, y antes del cruzamiento al segundo IA [350]. Los niveles basales de E2 y E1S se correlacionaron positivamente con el IMC ($r = 0.57$; $p < .001$, and $r = 0.38$; $p > .006$, respectivamente), de manera que dichos valores fueron tres veces superiores en las mujeres con $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ con respecto a las pacientes con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$. Tras tratamiento con IA se observó que los niveles de E2 y E1S se correlacionaban también positivamente con el IMC, aunque ello sólo alcanzó la significación estadística con letrozol, y los niveles de E2 residual fueron relativamente bajos en todas las categorías de IMC (2.8 vs 4.2 pmol/l con anastrozol, y 1.4 vs 2.4 pmol/L con letrozol, en el grupo de $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ comparado con el grupo de $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$). Estos datos vienen ilustrados en la Figura 32. Es precisamente esta menor inhibición estrogénica con IA en pacientes obesas la que podría explicar el peor pronóstico de éstas en algunos estudios [351, 352], aunque no en todos [353], de tratamiento adyuvante con IA en pacientes con CM y menopausia natural o inducida médicamente con aGnRH. Esta cuestión se tratará más en detalle en el apartado de Discusión.

Figura 34. Niveles plasmáticos(pmol/L) de E2 (panel A) y E1S (panel B) tras 3 meses de tratamiento con anastrozol o letrozol en función del IMC[332]





2 **Justificación del sub-estudio Soft-Est**

2. JUSTIFICACIÓN DEL SUB-ESTUDIO SOFT-EST

En síntesis, por todo lo comentado en la introducción, podemos afirmar lo siguiente:

- El tratamiento hormonal adyuvante en CM precoz RRHH+ representa una maniobra terapéutica crucial para disminuir el riesgo de recurrencia y muerte en mujeres pre- y postmenopáusicas [32].
- En mujeres premenopáusicas con CM avanzado o precoz el tratamiento con aGnRH en monoterapia [242, 354, 355] o, más frecuentemente, en combinación con tamoxifeno [251, 265, 266, 356] y o IA [255, 259, 260, 263-266, 329, 357], ha demostrado eficacia clínica y/o supresión estrogénica por debajo del nivel de castración en la mayoría de pacientes. La mayoría de estudios realizados hasta el momento, sin embargo, son estudios fase II o fases III de pequeño tamaño que adolecen de un seguimiento bioquímico limitado (6 meses como media) y de una determinación de niveles no centralizada o bien inadecuada, puesto que han utilizado métodos poco sensibles y específicos.
- Estudios efectuados con aGnRH en mujeres con patología benigna (endometriosis, miomatosis uterina) o maligna (CM) han mostrado que la supresión estrogénica puede ser incompleta, ya sea por persistencia de menstruaciones en un pequeño subgrupo de pacientes, niveles medios de estrógenos levemente superiores que en mujeres postmenopausicas y/o valores individuales indicativos de castración subóptima en una minoría de pacientes[238, 261, 262, 356, 358-360].
- Existen escasos datos con respecto a la supresión estrogénica a largo plazo con aGnRH, y prácticamente ninguno más allá de los 2 años. Dicha información es necesaria, por tanto,

- ✓ en un tratamiento hormonal prolongado como el que proponen los brazos B y C del estudio SOFT, el cual investiga 5 años de triptorelina más tamoxifeno o triptorelina + exemestano, respectivamente
- ✓ y crucial en combinación con IA (Brazo C de estudio SOFT), ya que los IA tienen un efecto subóptimo, e incluso pueden tener una actividad estimuladora, en presencia de función ovárica residual.
- La determinación de estrógenos en un escenario como el que plantea el estudio SOFT (Brazos B y C), con niveles esperados de estrógenos extremadamente bajos y la presencia en sangre de un compuesto esteroideo con potencial reactividad cruzada, como es exemestano, resulta técnicamente muy demandante, y exige métodos validados con muy alta sensibilidad y especificidad.
- Para estudiar la supresión estrogénica cuando se usan IA, es recomendable efectuar un perfil que incluya E2, E1 y E1S: E2, por ser el compuesto con actividad biológica; E1, por ser el mayor sustrato del enzima aromatasa y E1S, por ser el compuesto más abundante en plasma, y por tanto, el componente más adecuado para investigar el grado de supresión obtenido.

Con estos antecedentes, iniciamos en 2006 un subestudio de evaluación de estrógenos en el contexto del ensayo clínico fase III SOFT. Este subestudio, que bautizamos con el nombre de SOFT-EST, se desarrolló y puso en marcha durante el período de reclutamiento del estudio parental, asumiendo que éste sería el estudio definitivo que clarificaría el papel de la supresión ovárica con respecto al tratamiento estándar con tamoxifeno en pacientes premenopáusicas y que sería de máximo interés disponer de datos sobre supresión estrogénica, fuera cual fuere el resultado del estudio principal.

El subestudio se centró, pues, en las pacientes del estudio SOFT randomizadas al brazo B y C. Por su mayor interés, y en el contexto de limitaciones de presupuesto, se dio máxima prioridad al brazo C y se estableció una inclusión en el subestudio en una ratio 3/1 (3 pacientes en brazo C / 1 en brazo B), de manera que el brazo B sirviera como control. Se consideró que las pacientes debían ser testadas hasta 4 años y se estableció un mayor muestreo en los dos primeros años, entendiendo que

una supresión estrógena sería más relevante durante este primer período de tratamiento. Se decidió utilizar GC-MS/MS por ser el método considerado más adecuado para determinar estrógenos en este contexto, y que se efectuaría un perfil completo estrogénico que incluyera E2, E1 y E1S.

3 Objetivos e hipótesis

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 OBJETIVOS DEL ANÁLISIS A 12 MESES DEL SUBESTUDIO SOFT-EST: PRESENTE TESIS

El trabajo que se presenta aquí forma parte de un proyecto más ambicioso que tiene como objetivos principales estudiar los niveles estrogénicos de las pacientes incluidas en el subestudio SOFT-EST durante los primeros 4 años de tratamiento, así como determinar si existe un subgrupo de pacientes con supresión estrogénica subóptima en el grupo tratado con exemestano+triptorelina; entre sus objetivos secundarios destaca el estudio de los factores predictivos de subopresión subóptima, en caso de detectarse ésta, el estudio del valor predictivo de la supresión óptima a corto plazo (12 meses) con respecto a la supresión estrogénica a largo plazo (durante los 48 meses de observación) y la descripción de la SLE en las poblaciones con y sin supresión estrogénica óptima.

En las fases iniciales de la puesta en marcha del subestudio se hizo patente que no sería posible analizar todas las muestras en un solo *batch* por problemas de estabilidad de las muestras. Se determinó entonces que se haría un estudio preliminar a los 12 meses, que, de cumplirse las previsiones de inclusión, permitiría analizar todas las muestras del primer año de todas las pacientes incluídas. Ello nos permitiría disponer de un análisis bioquímico puro, en el que sólo deberíamos tener en cuenta el coeficiente de variación (CV) intraensayo. Este análisis se planificó antes de disponer de ningún dato de eficacia, ni relativo al estudio SOFT, ni relativo al estudio SOFT-EST.

Los objetivos de este análisis a 12 meses fueron los siguientes:

- Describir los niveles de estrógeno (E2, E1 y E1S) y de gonadotropinas (FSH y LH) en los puntos de tiempo especificados (0,3, 6 y 12 meses) durante el primer año de tratamiento.
- Averiguar la proporción de pacientes con supresión subóptima en cada momento (0, 3 , 6 o 12 meses) en las pacientes aleatorizadas a exemestano+SFO (triptorelina)

- Comparar los niveles de estrógeno durante el primer año entre ambos grupos de tratamiento
- Como análisis exploratorio, en el grupo de exemestano+triptorelina, comparar las características basales (edad en el momento de la randomización, niveles hormonales, uso previo de QT, uso previo de tamoxifeno, estado de menstruaciones y IMC) de las pacientes que muestran supresión estrogénica óptima en todas las muestras post-basales con respecto a aquéllas con al menos una muestra post-basal (3, 6, o 12 meses) con niveles de E2 subóptimamente suprimidos.

3.2 HIPÓTESIS Y DEFINICIONES

Se definió como "supresión estrogénica subóptima" la presencia de una determinación de E2 >2.72 pg/mL (equivalente a 10 pmol/L) en el grupo asignado a exemestano+triptorelina.

El dintel preespecificado (E2 >2.72 pg/mL (equivalente a 10 pmol/L) se basó en las recomendaciones de la literatura previa para pacientes con aGnRH e IA [206], aunque no existía en ese momento ningún datos concluyente sobre el valor clínico de esta recomendación.

Se hipotetizó que podía existir aproximadamente un 10% de mujeres que podrían cumplir la definición de supresión estrogénica subóptima, y ello era similar al 10.4% de supresión estrogénica subóptima que había comunicado el estudio TABLE previamente [242]. Debe recordarse (Ver Sección 1.7) que en este estudio las pacientes habían recibido leuprorelin trimestral adyuvante en monoterapia durante 2 años y el dintel establecido para la supresión estrogénica subóptima (escape hormonal para los autores) fue necesariamente superior (30 pg/mL), ya que las mujeres no recibieron IA en combinación con el aGnRH.

El interés principal del estudio radicaba en detectar la posible existencia de un grupo de mujeres con supresión estrogénica subóptima con GnRH + IA, por este motivo no se estableció *a priori* un *cut-off* para el grupo tratado con tamoxifeno+triptorelina, entendiendo, además, que tamoxifeno es eficaz en cualquier contexto (tanto en pacientes con niveles de E2 en el rango de la postmenopausa como en aquéllas que tienen niveles más elevados).

Tampoco se utilizaron los niveles de E1 y E1S en la definición de supresión estrogénica subóptima, ya que la actividad biológica reside en E2. La determinación de E1 y E1S, en cambio, se vio necesaria en tanto en cuanto podía conferir consistencia y robustez a los datos derivados de la medida de E2. Como se ha comentado previamente (Sección 1.4.2.3), E1 es el principal sustrato del enzima aromatasa, y E1S la fracción estrogénica más abundante en plasma, por tanto, la más adecuada para estudiar el grado de supresión estrogénica obtenido.

4
**Pacientes
y Métodos**

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. PACIENTES Y MÉTODOS EN ESTUDIO SOFT

Para comprender la metodología del presente trabajo es necesario referirnos al diseño, pacientes y métodos del estudio principal SOFT (ClinicalTrials.gov NCT00066690)

4.1.1 Selección de pacientes para el estudio SOFT

El estudio SOFT incluyó mujeres premenopáusicas con CM precoz para las que se consideraba que era adecuado el tratamiento adyuvante solamente con tamoxifeno, o que habían recibido QT adyuvante o neoadyuvante y permanecían premenopáusicas tras haberla finalizado. En este último caso, el estado premenopáusico se definía como niveles de E2 en el rango de la premenopausia según el laboratorio local, sin que fuera necesaria la presencia de menstruaciones. Puesto que la QT suele inducir un estado menopáusico transitorio, se permitió la randomización hasta ocho meses después de completar la QT, para permitir en lo posible la RFO. Durante este período de monitorización del E2 se permitía el tratamiento con tamoxifeno. Dado que el tamoxifeno puede potencialmente alterar los niveles de FSH y LH (Ver también Sección 1.6.2), éstos no se exigieron en el momento de la randomización. Para las pacientes sin QT previa la randomización se permitió hasta 12 semanas después de la cirugía, y en este caso el estado premenopáusico se definió como presencia de menstruaciones regulares en los 6 meses previos, o bien niveles de E2, determinados localmente, en el rango de la premenopausia.

Las pacientes debían haber recibido una cirugía adecuada, con márgenes negativos, y en caso de positividad ganglionar, la disección axilar mínima era de 6 ganglios. No

era necesaria la disección axilar en caso de negatividad del ganglio centinela, o si éste contenía únicamente micrometástasis. En caso de ganglio centinela con macrometástasis, era mandatoria la linfadenectomía axilar o bien la irradiación sobre la axila. En caso de tumorectomía, todas las pacientes debían recibir RT sobre mama. Si se había realizado mastectomía, la indicación de la RT postmastectomía quedaba a criterio del investigador.

En caso de haber recibido QT adyuvante o neoadyuvante, se recomendó que ésta tuviera una duración programada de > 2 meses si estaba basada en antraciclinas (por ejemplo, 4 ciclos de EC o AC) o > 4 meses si no se administró antraciclina (por ejemplo, 6 ciclos de CMF).

Tras la publicación en 2005 de los estudios que demostraron el beneficio de trastuzumab adyuvante, se recomendó éste en las pacientes HER2+ en que estuviera clínicamente indicado.

En cuanto a las indicaciones de RT, éstas quedaban a criterio del investigador, aunque se recomendaba en todas las pacientes con cirugía conservadora o con cuatro o más ganglios axilares afectados, así como en algunas pacientes con tumores mayores de 5 cm. En caso de indicarse radioterapia, ésta debía administrarse tras la QT, o, más raramente, se podía administrar concomitantemente a ésta (por ej, en pautas tipo CMF). El tratamiento hormonal del estudio podía iniciarse durante la RT. El estudio exigía disponer de un bloque para determinación central de RH. Para este estudio, la positividad hormonal se definió como tinción IHQ para RE y RP $\geq 10\%$ de núcleos celulares. Se permitió la inclusión de tumores multifocales, multicéntricos, o incluso contralaterales sincrónicos (diagnosticados histológicamente en un periodo máximo de 2 meses). En esta situación todos los tumores debía cumplir la definición previa de positividad hormonal.

No se permitió la inclusión de pacientes portadoras de tumores localmente avanzados no operables, carcinomas inflamatorios, tumores con afectación macroscópica de la CMI o afectación supraclavicular ipsilateral al tumor primario (N3). Se excluyeron, asimismo, pacientes con presencia de enfermedad residual axilar clínicamente detectable tras cirugía y, evidentemente, pacientes con metástasis a distancia. Sí se permitió la inclusión de mujeres con afectación de CMI detectada por BSGC. Las pacientes con antecedentes de CM invasivo previo o de

tumores en otras localizaciones, previos o concomitantes, no se consideraron elegibles, salvo determinadas excepciones que venían convenientemente listadas (tumores frecuentes de excepcional buen pronóstico correctamente tratados y libres de enfermedad a 5 años). También se consideraron inelegibles las pacientes con antecedentes de tratamiento con aGnRH para el CM, o que habían recibido tratamiento con antiestrógenos o THS durante el año previo al diagnóstico de CM. En cambio, sí se permitió el tratamiento previo reciente con anticonceptivos orales. Se desestimó la inclusión de aquellas pacientes en las que se planificara una ooforectomía en los 5 años siguientes (ejemplo, portadoras del gen BRCA1/2) y en quienes, por tanto, fuera inapropiada la aleatorización a un grupo de tratamiento sin SFO. También se excluyeron las pacientes con enfermedades concomitantes que impidieran un seguimiento prolongado o con trastornos psiquiátricos, conductas adictivas, antecedentes de incumplimiento de pautas médicas que pudieran comprometer el cumplimiento de los requisitos del protocolo. Las pacientes con trombosis previa (por ejemplo, trombosis venosa cerebral) y/o embolismo se podían incluir sólo si se consideraba clínicamente adecuado.

4.1.2 Países y centros participantes en el estudio SOFT.

El estudio SOFT fue llevado a cabo por dos consorcios de grupos cooperativos de investigación, el *Breast International Group* (BIG) y el *North American Breast Cancer Group* (NABCG); participaron 27 países y 426 centros. La Tabla 34 recoge en detalle los Grupos Cooperativos participantes, mientras que en la Figura 35 se representan los países colaboradores. La activa participación del grupo Cooperativo SOLTI, que contó desde el principio con varios de los centros considerados máximo reclutadores, facilitó que fuera posible la aceptación de la propuesta que SOLTI hizo sobre la realización del subestudio de evaluación de estrógenos SOFT-EST.

Tabla 34 Grupos Cooperativos participantes en estudio SOFT

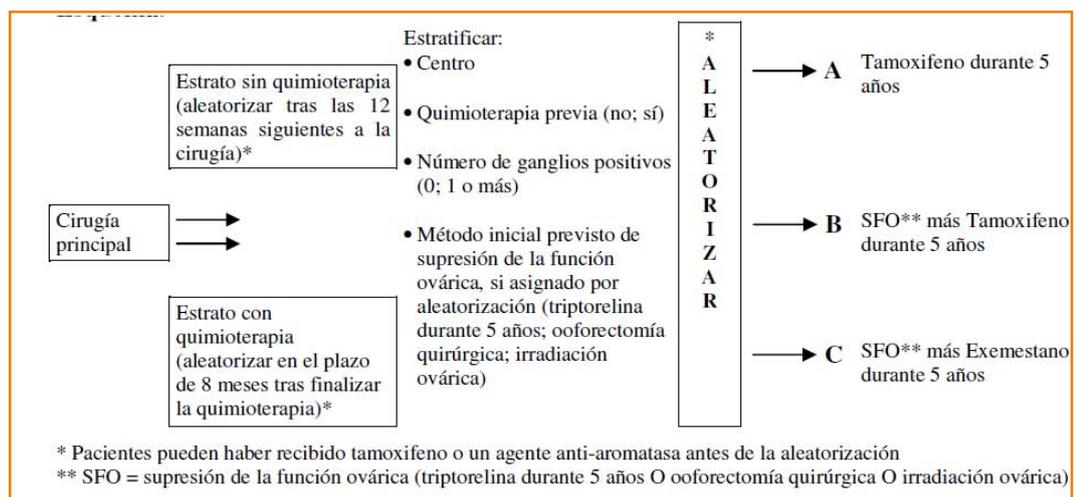
Consortio	Acrónimo	Grupo Cooperativo
BIG		
	IBCSG	<i>International Breast Cancer Study Group</i>
	ANZBCTG	<i>Australia and New Zealand Breast Cancer Trials Group</i>
	SAKK	<i>Swiss Group for Clinical Cancer</i>
	GOCCHI	<i>Grupo Oncológico Cooperativo Chileno de Investigación</i>
	CEEEOG	<i>Central and East European Oncology Group</i>
	EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
	GBG	<i>German Breast Group</i>
	SOLTI	<i>Grupo Académico de Investigación en Cáncer de Mama</i>
NABCG		
	Alliance	<i>Cancer and Leukemia Group B(CALGB) American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) North Central Cancer Treatment Group (NCCTG)</i>
	SWOG	<i>South West Oncology Group</i>
	ECOG-ACRIN	<i>Eastern Cooperative Oncology Group- American College of Radiology Imaging Network</i>
	NRG (NSABP, RTOG)	<i>National Surgical Adjuvant Breast Project- Radiation Therapy Oncology Group- Gynecologic Oncology Group</i>
	NCI-CTG	<i>National Cancer Institute-Clinical Trials Group</i>
	NCI-CTSU	<i>National Cancer Institute-CancerTrials Support Unit</i>

uno de los tres grupos de tratamiento comentados (A, B o C). Si la paciente era randomizada a recibir tamoxifeno+triptorelina, ambos fármacos se iniciaban a la vez; en caso de haber correspondido el brazo C (exemestano+triptorelina) se iniciaba primero la triptorelina y se añadía exemestano entre 6 y 8 semanas después.

El exemestano fue suministrado por Pfizer en todos los países. La triptorelina fue suministrada por Pfizer en Norteamérica y Suramérica, y por Ipsen en las demás zonas. La quimioterapia, goserelina (en caso de intolerancia a triptorelina) y tamoxifeno quedaron a cargo de cada centro. En lo que respecta a los centros pertenecientes SOLTI, fue el propio grupo cooperativo quien suministró tamoxifeno a sus centros, de manera que no supusiera ningún coste para el paciente.

El diseño del estudio SOFT viene ilustrado a continuación (Figura 36)

Figura 36. Diseño del estudio SOFT y factores de estratificación.



4.1.3.2 Objetivos principales y secundarios

El objetivo principal del estudio SOFT fue SLE invasiva, definida como el tiempo desde la randomización hasta la primera aparición de recurrencia invasiva (local, regional o a distancia), segundo cáncer (no CM) invasivo, o muerte sin recurrencia o segundo cáncer.

Los objetivos secundarios fueron Intervalo Libre de Enfermedad (ILE), definido como el tiempo desde la randomización hasta la recurrencia de CM invasivo (local, regional o a distancia) o CM contralateral, la SLED, definida como el tiempo transcurrido entre la randomización y la presentación de metástasis y la SG (definida como el tiempo desde la randomización hasta la muerte por cualquier causa).

4.1.3.3 Procedimientos

A continuación se describen, de forma resumida, los procedimientos básicos del estudio SOFT, de cara a poner en contexto el subestudio objeto de la presente tesis. La Tabla 35 resume el calendario de seguimiento y procedimientos a realizar en cada visita. Durante el primer año las visitas fueron trimestrales, A partir del segundo año y hasta el 6º las visitas se programaron cada 6 meses, y desde entonces debían ser anuales hasta el fallecimiento de la paciente.

En cuanto a los Efectos Adversos que debían recogerse en cada visita, se pre-especificaron los siguientes:

- Sofocos
- Sudoración nocturna
- Descenso de la líbido
- Sequedad vaginal
- Dispareunia
- Incontinencia urinaria
- Síntomas vasomotores: sofocos/rubores
- Fractura ósea
- Síntomas musculoesqueléticos: mialgia, artralgia, rigidez
- Depresión

- Isquemia cerebrovascular
- Hemorragia SNC
- Hipertensión
- Isquemia/infarto cardíaco
- Trombosis y/o embolismo periférico
- Náuseas
- Insomnio
- Reacción alérgica y/o hipersensibilidad
- Reacción en el lugar de la inyección

Adicionalmente, en Julio de 2011 se realizó una enmienda al protocolo basada en datos recientes de Seguridad Farmacológica de los aGnRH. En base a estos datos (<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafety/InformationforPatientsandProviders/ucm209842.htm>) se estableció que, además de los acontecimientos adversos cardiovasculares ya preespecificados, se registrarían prospectivamente los acontecimientos adversos de hiperglicemia e intolerancia a la glucosa, y se capturaría el uso de fármacos antidiabéticos.

En cuanto al manejo de los efectos adversos, se especificó que las mujeres con molestias por síntomas vasomotores (como sofocos y sudoración nocturna) debían recibir tratamientos no hormonales (como inhibidores de la recaptación de serotonina). Para pacientes en tratamiento con tamoxifeno se recomendó venlafaxina, por su falta de inhibición de CYP2D6 (Véase Sección 1.4.1.2). No se permitió la administración de bifosfonatos excepto en caso de DMO documentada de -1.5 desviaciones estándar por debajo de la media normal en adultos jóvenes o si la paciente estaba participando en un ensayo clínico aleatorizado que evaluara los bifosfonatos en el contexto adyuvante del CM. Se permitió la administración de suplementos de vitamina D3 y calcio.

Tabla 35. Calendario de visitas y procedimientos del estudio SOFT

Visita	1 A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Anual hasta la muerte
Año	1	1	1	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	
Mes	0	3	6	9	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	
Consentimiento Informado	x															
Revisión de criterios de inclusión y exclusión	x															
Antecedentes*	x															
Exploración física incluyendo peso*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Estradiol ^{II}	x															
Acontecimientos adversos (AAs) ^C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
AAs tardíos ^D																x
Analíticas de laboratorio																
Hematología ^E	x	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Bioquímica ^F	x	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Investigaciones																
Mamografía ^G	x				y		y		y		y		y		y	
Radiografía torácica ^H (visión PA y lateral) o TAC torácico	x	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Gammagrafía ósea ^I	y	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Ecografía abdominal, TAC o gammagrafía hepática ^J	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Exploración ginecológica ^K	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Densitometría mineral ósea ^L	y				y		y		y		y		y		y	
CRDs^M																
Calidad de vida ^N	x		x		x	x	x		x		x		x		x	
Formularios B,C,H,F,P	x															
Formulario F	x	y en caso de recaída (Formulario RF)														
Formulario AE, MCC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Formulario E		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Formularios SFO, TE (mientras reciban SFO, tamoxifeno o exemestano)		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Formularios R, SAE, EIU (embarazo), GYN	a demanda según el protocolo															
Formularios BC, BF, BP y BR	Presentar en pacientes con cáncer de mama bilateral sincrónico como requiere el protocolo															

x = obligatorios y = recomendados v = si clínicamente indicados

* Examen físico y antecedentes podían ser cumplimentados en los dos meses previos a la aleatorización. Se recomendó realizar una prueba de embarazo basal en mujeres en edad fértil sexualmente activas y que no usaban ningún método anticonceptivo fiable.

Asimismo, el protocolo exigía que las pacientes en tratamiento con aGnRH debían ser advertidas de un pequeño riesgo de embarazo, por lo que debían seguir medidas de contracepción no hormonal.

4.1.3.4. Consideraciones Estadísticas

Los análisis estadísticos se planificaron por intención de tratamiento, y estratificados por QT previa (sí/no) y estado ganglionar (negativo/positivo).

El diseño original (2003) contemplaba tres comparaciones pareadas (Brazo A vs B, brazo A vs C y brazo B vs C) para detectar una razón de riesgo de 0.75 después de analizar 783 eventos ($\alpha=0.0167$). Durante el desarrollo del estudio se observó un número anual de eventos de SLE muy inferior al asumido inicialmente, aproximadamente un 2% por año en comparación con el 8% por año especificado en el protocolo, lo que requeriría un seguimiento adicional de trece años, hasta finales de 2023, para obtener el número deseado de 783 eventos de SLE (para entonces la mediana de seguimiento sería de 15 años). Ello se consideró inaceptable por el Comité Directivo del estudio, por lo que en 2011, antes de disponer de resultados de eficacia, se rediseñó el plan estadístico. El nuevo plan estaba basado en la mediana de seguimiento más que en el número de eventos, de manera que se decidió comunicar los datos cuando a los 5 años de seguimiento mediano. El análisis primario pasó a ser la comparación de tamoxifeno+SFO vs tamoxifeno. Con los nuevos cálculos, y asumiendo ahora 186 eventos a los 5 años, el estudio tendría un poder del 80% para detectar una razón de riesgo de 0.665 (α de 2 colas: 0.05). El análisis según el uso de QT previa fue prospectivamente planeado. En cuanto a la comparación exemestano+SFO vs tamoxifeno, ésta pasó a ser un objetivo secundario.

4.1.4. Subestudios del estudio SOFT

En el seno del estudio SOFT se gestaron y llevaron a cabo tres subestudios:

- El Subestudio de Calidad de Vida (*SOFT Quality of Life Substudy*), en el que

participaron todos los centros participantes en el estudio parental y del que estaban exentas únicamente las pacientes con problemas cognitivos, o con incapacidad de leer en el idioma del cuestionario. Este subestudio se basó en dos cuestionarios: el *International Breast Cancer Study Group QoL Core Form* y un segundo módulo confeccionado específicamente para el estudio. El IBCSG QOL incluía indicadores globales de bienestar físico, estado de ánimo, esfuerzo en el enfrentamiento a la enfermedad, estimación subjetiva del estado de salud, así como cinco indicadores específicos de síntomas y efectos adversos. El segundo módulo interrogaba sobre 12 síntomas endocrinos, e incluía un indicador global de carga tóxica asociada al tratamiento, así como una cuestión relativa a la actividad sexual. Cada ítem a valorar se testaba mediante una escala analógica de 0 a 100 y los tests se realizaron en los meses 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 72 desde la randomización. Este subestudio llegó a analizar 2576 pacientes, teniendo en cuenta los tres brazos de tratamiento; para el análisis primario que comparó tamoxifeno con SFO y tamoxifeno se analizaron 1722 pacientes (población por intención de tratar). Los resultados de este estudio se han comunicado recientemente [328] y se han comentado de forma marginal en la Sección 1.7.2.2, al no ser el objetivo de la presente tesis.

- El Subestudio Cognitivo o CO-SOFT (de *Cognitive Study*), al que contribuyeron únicamente centros individuales que expresaron su interés en participar. Este estudio tenía como objetivo primario comparar la función cognitiva basanl y al primer año en función del brazo de tratamiento. Para ello se utilizó un conocido programa informático (CogState, www.cogstate.com), que ofrece una rápida valoración cognitiva y que se había utilizado también en el estudio BIG1-98 [361]. Lamentablemente, este subestudio no llegó a alcanzar el reclutamiento previsto (86 de los 321 pacientes inicialmente planeados). Este estudio ha descrito que la adición de la SFO no tiene efectos negativos sobre la función cognitiva, pero su pequeño tamaño muestral, limita la validez de estos resultados [362] (ref, Phillips Kelly-Ann, BJC 2016).

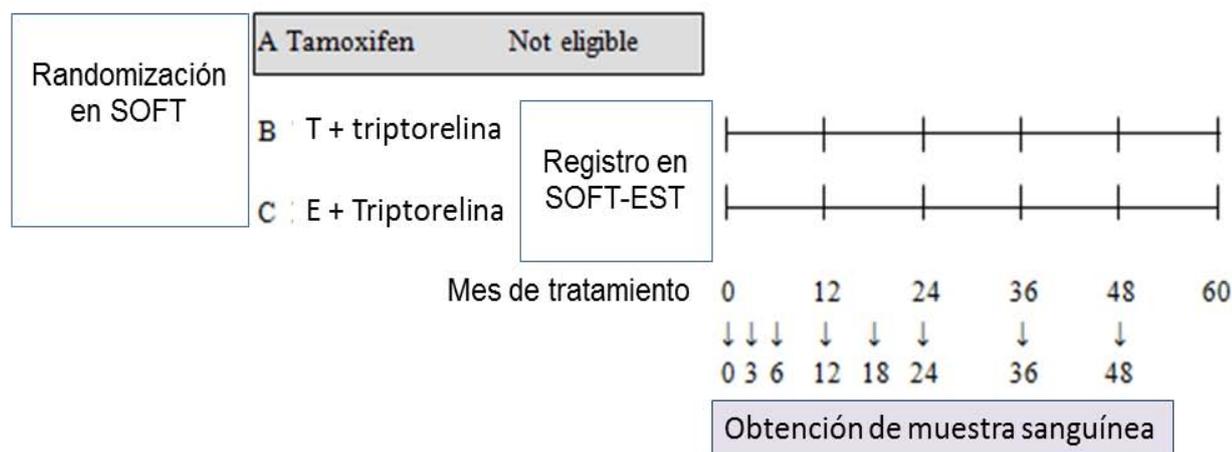
- El Subestudio de Supresión Estrogénica, o SOFT-EST, subestudio en el que se centra la presente tesis.

4.2 PACIENTES Y MÉTODOS EN EL SUBESTUDIO SOFT-EST

4.2.1. Diseño del subestudio

El estudio siguió un diseño longitudinal. El registro en el subestudio y recogida de las muestras basales debía tener lugar después de la aleatorización en el estudio principal SOFT, pero previo al inicio del tratamiento asignado. Se debía recoger una muestra de sangre basal (mes 0) y en los meses 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48, coincidiendo con las visitas de seguimiento y con las valoraciones de calidad de vida del estudio principal. El diseño del estudio viene representado en la Figura 367

Figura 37. Diseño del estudio SOFT-EST



T=tamoxifeno; E=exemestano

4.2.2. Selección de pacientes

4.2.2.1 Centros participantes

El presente estudio se planteó mientras el estudio principal estaba reclutando pacientes. Para asegurar, entonces, que el subestudio pudiera alcanzar su objetivo de pacientes antes de la finalización del estudio principal, se seleccionaron los centros que hasta el momento habían tenido mayor reclutamiento. De entre estos centros considerados “máximos reclutadores” se priorizaron los centros europeos, por cuestiones logísticas y de presupuesto. Así, la mayoría de centros seleccionados para la participación en el subestudio SOFT-EST fueron centros pertenecientes a los grupos cooperativos IBCSG, EORTC y SOLTI.

4.2.2.2 Criterios de inclusión

- Asignación por aleatorización a los brazos B o C.
- Triptorelina (aGnRH) elegida como método de elección para la SFO.
- Consentimiento informado por escrito para el sub-estudio SOFT-EST.

4.2.2.3 Registro de la paciente

En este sub-estudio solo podían ser registradas pacientes en las que estaba prevista la utilización de triptorelina como método de SFO y que habían sido asignadas por aleatorización al brazo B o C del estudio principal SOFT.

De cara a minimizar un sesgo de selección, se recomendó a los centros participantes que propusieran el subestudio a *todas* las pacientes que incluyeran en el estudio SOFT y en las que estuviera prevista la utilización de triptorelina como método de SFO. Se recomendó que el consentimiento informado para SOFT-EST se obtuviera al mismo tiempo que el del SOFT. Una vez obtenidos ambos consentimientos, si la paciente era asignada al brazo B o C, debía ser entonces

registrada en el subestudio SOFT-EST y se debía obtener la muestra basal antes de recibir el tratamiento del protocolo.

El registro en SOFT-EST se debía realizar inmediatamente después de la aleatorización en el estudio principal SOFT, utilizando el sistema IBCSG para el registro/aleatorización. El formulario de Confirmación de Registro (24-SE-A) debería completarse previamente al registro en el SOFT-EST para confirmar la elegibilidad y obtener información sobre la historia de hábitos tabáquicos de las pacientes.

4.2.3 Calendario de recogida de muestras

El calendario de recogida de muestras especificadas se recoge en la Tabla 36

Tabla 36. Calendario de determinaciones en función de número de visita del estudio SOFT y meses desde el inicio del tratamiento

Parámetros del Sub-estudio											
Número de Visita	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Año	1	1	1	1	1	2	2	3	3	4	4
Mes	0	3	6	9	12	18	24	30	36	42	48
Muestra de Suero	x	x	x		x	x	x		x		x
Form 24-SE-SC	x	x	x		x	x	x		x		x
x = pre-especificado											

Las muestras debían recogerse por la mañana y en ayunas. Si se preveía administrar la triptorelina el mismo día, la muestra debía obtenerse antes de la inyección de ésta.

Aparte de las muestras pre-especificadas, se planificó asimismo la recogida de muestras adicionales en las siguientes situaciones:

- Sangrado vaginal; Se debía obtener una muestra extra lo antes posible tras conocer la existencia de sangrado vaginal, siempre que este se produjera después de 3 meses del inicio de la triptorelina. Si la paciente iba a proceder a ooforectomía la muestra de sangre debía obtenerse antes de este procedimiento quirúrgico.
- Ooforectomía: Se debía obtener una muestra a los 3 meses de su realización.
- Discontinuación del estudio por cualquier causa diferente a ooforectomía se debía obtener una muestra a menos se hubiera recogido una muestra recientemente (en el último mes durante los primeros 6 meses del estudio o durante los 3 meses anteriores durante el período restante)

La muestra debía adjuntarse con un formulario de recogida de muestra (24-SE-SC) debidamente completado; éste se enviaba mediante el DataFax en el momento de recogida de la muestra según el calendario de recogida arriba indicado, y suponía una confirmación de que la muestra había sido obtenida.

En caso de que el investigador decidiera cambiar de tratamiento oral asignado por toxicidad (de exemestano a tamoxifeno, o viceversa), la paciente podía continuar en el subestudio, siempre que se mantuviera el tratamiento con el aGnRH.

4.2.4. Logística de la recogida, conservación y envío de las muestras

Se suministraron kits para la recogida de sangre, conteniendo tubos y etiquetas, a los centros participantes. Estos kits debían ser usados para la recogida, almacenamiento y envío de las muestras de suero. Debía recogerse un volumen de 20 mL de sangre y procesarse para la obtención de alícuotas de suero, de acuerdo con el Manual para el Tratamiento de las Muestras (SMM o Sampling Management Manual) que se confeccionó *ad hoc* para el subestudio. Cada alícuota debía ser etiquetada tal como se indicaba en el SMM y almacenada a -20°C hasta su envío al laboratorio central (*Inventiv Health, Inc.*, New Jersey) y posteriormente al Laboratorio de Hormonas del Hospital Vall d'Hebron para su análisis. Todas las muestras debían ser identificadas con las etiquetas suministradas para el estudio, donde se identificaban iniciales del paciente, día de recogida de la muestra y punto de tiempo correspondiente (basal, 3, 6 12, 18, 24, 36 o 48 meses). Las muestras se

anonimizaron desde su recogida y se mantuvo la confidencialidad durante todo el proceso.

En Octubre de 2011 todas las alícuotas del estudio guardadas en los centros participantes fueron recogidas por Interlab, centralizadas en Alemania, y desde allí enviadas al laboratorio de Inventiv Health, in New Jersey, USA (434 muestras, 2238 alícuotas). A finales de Febrero 2012 se realizó un segundo envío a dicho laboratorio, esta vez tras centralización de las muestras en Hospital de Vall d'Hebron y reservando 1 alícuota de las obtenidas para determinación de FSH y LH (39 muestras, 195 alícuotas). Con este segundo envío se pretendía reunir las muestras de los primeros 12 meses de todas las pacientes incluídas, de manera que fuera posible la determinación de E1, E2 y E1S, si no en un único *batch* (ya que no era posible por el número de alícuotas a analizar), sí de forma consecutiva, con el objetivo de minimizar el coeficiente de variación inter-ensayo. Adicionalmente se enviaron las muestras obtenidas hasta entonces de los puntos de tiempo 18 y 24 meses, disponibles en ese momento en la mitad y un tercio de las pacientes, respectivamente. Tras la determinación de los niveles de estrógenos, las alícuotas restantes en el laboratorio Inventive Health procedentes del envío de Octubre 2011 se reenviaron al Laboratorio de Vall d'Hebrón, para proceder al análisis de FSH y LH.

4.2.5. Determinación de estrógenos: GC-MS/MS

A continuación se describe con detalle la metodología de la técnica de GC-MS/MS utilizada en nuestro estudio:

Por lo que respecta a la determinación de E2, se añadió E2 deuterado (isótopo estable de un átomo de hidrógeno conteniendo un protón y un neutrón) como estándar interno a 1 ml de suero de la muestra. De esta manera se permitía la cuantificación de su recuperación y el cálculo de la masa en el pico detectado. Se extrajo un mililitro de suero mediante cartuchos de fase sólida *BondElut Certify* y se eluyó con acetato de etilo. Ello se siguió de tres procesos de derivatización para mejorar la selectividad y especificidad, que incluyeron pentafluorobenzoilchlorid (PFB); *o*-(2,3,4,5,6- 99pentafluorobenzil)-hydroxiamina hydrochlorido y MSTFA (N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida). Las muestras derivatizadas fueron después

separadas por cromatografía de gases en una columna capilar de cristal de silicio DB-17 y analizadas mediante el espectrómetro de masas.

El método utilizado ha sido convenientemente validado [336]. En dicha validación el porcentaje de recuperación medio del E2 añadido en suero con carbón activado fue del 87.6% con un CV del 7.01%. El nivel de sensibilidad para E2 en 1 ml de plasma o suero fue de 0.63 pg/mL. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo fueron determinados en 3 días separados para muestras (N= 16 a 18) con niveles bajos (1.9 pg/mL), medios (25 pg/mL) y altos (61 pg/mL) de E2. Los CVs interensayo se calcularon a partir de estos resultados y fueron de 7.88%, 3.72% y 2.7% para valores bajos, medios y altos, respectivamente. Las recuperaciones de la adición de E2 en muestras con niveles variables de E2 fueron siempre superiores al 98.9% y la linealidad de la recuperación del E2 añadido fue $R = 0.997$. Por lo que refiere a muestras séricas humanas, éstas se evaluaron en un único día. Los CV para muestras con bajos (2.1 pg/mL), medios (26 pg/mL) y altos (62 pg/mL) niveles de E2 fueron del 17.8%, 3.13% y 3.27% y las recuperaciones del 94%, 100.4% y 103%, respectivamente. The linealidad de respuesta fue $R = 0.998$.

En lo que se refiere a E1, y E1S se utilizó una metodología similar. En este caso los límites de sensibilidad fueron de 1.56 pg/mL para E1 y de 3.13 pg/mL para E1S.

Pese a que existían estudios previos que habían utilizado la misma tecnología (y en el mismo laboratorio) sin observar reactividad cruzada con exemestano [220, 255], se pre-especificó la realización de un experimento *ad hoc* para descartar dicha interacción. Este experimento debía realizarse en InventiveHealth antes de correr las muestras por el espectrómetro de masas y, efectivamente así se hizo, descartando por completo la existencia de detección cruzada. Todas las muestras procedentes de los 12 primeros meses del tratamiento se corrieron consecutivamente, sin que el laboratorio tuviera conocimiento del tratamiento al que habían sido asignadas las pacientes. Este proceso duró aproximadamente 7 días, y los resultados estuvieron disponibles en verano de 2012.

4.2.6 Determinaciones de FSH y LH

Las determinaciones de FSH y LH se llevaron a cabo en el Laboratorio de Hormonas del Hospital Universitario Vall d'Hebron en Barcelona.

Se utilizó una técnica de quimioluminiscencia con un analizador automatizado de Roche Diagnostics Cobas 6000. Los rangos de medida fue de 0.100-200 mIU/mL (definido por el límite bajo de detección de la curva maestra) para ambos tests. Tampoco en este caso el laboratorio tuvo conocimiento del tratamiento recibido por las pacientes.

4.2.7 Consideraciones estadísticas del subestudio SOFT-EST para el período completo de 4 años

4.2.7.1 Análisis de los datos

El protocolo del presente Subestudio, en su versión final de Junio de 2008 y por lo que refiere al análisis de los datos durante el período completo de 4 años, estableció lo siguiente:

- Los niveles de estrógenos (E2, E1 y E1S) se describirían a lo largo del tiempo en todos los pacientes y de acuerdo con la rama de tratamiento, mediante estadísticos descriptivos (media, desviación estándar, mediana y cuartiles). En base a la literatura previa se anticipó que se requeriría una transformación logarítmica de los niveles de estrógenos, en cuyo caso se reportaría la media geométrica
- Mediante modelización linear mixta (o Modelo de Efecto Mixto) de los datos disponibles correspondientes a los 8 puntos de tiempo preespecificados, cada nivel de estrógeno (transformado logarítmicamente) sería modelado en función del tiempo y tratamiento recibido, con el fin de investigar la evolución en el tiempo de los niveles de estrógeno y la diferencia en éstos entre ambos brazos de tratamiento.
- En el grupo de pacientes asignadas a triptorelina+exemestano, se comunicaría la proporción (e intervalo de confianza exacto binomial del 95%) de pacientes que experimentarían supresión subóptima. Se describiría asimismo cuándo se producía dicha supresión. Se hipotetizó que

determinadas características de las pacientes, tales como edad a la randomización, QT previa adyuvante (No/Sí), tipo de QT previa y dosis acumulada de ciclofosfamida, uso de tamoxifeno, presencia de menstruaciones, hábito tabáquico e IMC, podrían relacionarse con supresión estrogénica subóptima, de manera que se planificó comparar dichas características entre las pacientes con y sin supresión subóptima. Se utilizaría la prueba T de Student para variables continuas, o la prueba de suma de rangos de Wilcoxon en caso de no poderse asumir normalidad. Para variables categóricas se usaría test exacto de Fisher. Puesto que se anticipaba una baja tasa de supresión estrogénica subóptima (entorno al 10%) no se consideró la posibilidad de realizar un análisis multivariable de regresión logística.

- Se definió como supresión estrogénica subóptima para el grupo asignado a triptorelina+exemestano la presencia de:
 - Fallo de supresión clínicamente evidente, determinado por presencia de menstruaciones más allá de los tres meses de haber iniciado triptorelina, embarazo y/o
 - Niveles de estradiol >2.72 pg/mL (>10 pmol/L) en 2 o más puntos de tiempo en un período de al menos 6 meses.
- Teniendo en cuenta dicha definición las pacientes serían clasificadas como óptimamente suprimidas o no óptimamente suprimidas durante los primeros 6 meses y durante los 12 primeros meses. Se investigaría si la óptima supresión precoz puede predecir la supresión estrogénica a largo plazo mediante un modelo lineal mixto aplicado a los niveles de estrógenos observados una vez transcurrido el primer año.
- De forma exploratoria se describiría la SLE para los grupos con y sin supresión subóptima mediante el método de Kaplan-Meier. Dada la prevista baja tasa de supresión subóptima, se consideraría este análisis como meramente descriptivo.

4.2.7.2. Consideraciones acerca del tamaño muestral

Se estableció una muestra de 120 pacientes, 30 in el brazo B (triptorelin+tamoxifeno) and 90 in el brazoC (triptorelin+exemestano). Teniendo en cuenta 1) el reclutamiento real en el studio SOFT de los centros europeos y 2) la proporción de pacientes asignadas a los brazos B y C del estudio SOFT que escogían triptorelina como método de supresión ovárica (aproximadamente el 90%) se calculó un tiempo de reclutamiento en el estudio SOFT de unos 18 meses.

La selección del tamaño muestral tuvo en cuenta los dos objetivos primario del estudio.

Los niveles de estrógenos se analizarían mediante modelos longitudinales. Según los datos proporcionados por InVentiv Health los límites de detección con GCMS/MS para E2, E1 y E1S son de 0.625-80 pg/mL para E2, 1.56-200 pg/mL para E1 y 3.13-800 pg/mL para E1S. En base a literatura previa [334], se asumió una desviación estándar (SD) de 4.0 pg/mL en cada punto de tiempo y se asumió conservadoramente que la correlación entre 2 puntos de tiempo era $r=0.5$, de manera que a diferencia entre 2 puntos de tiempo debía ser asimismo 4.0 pg/mL. Por lo que respecta al análisis primario de descripción de los niveles estrógenos en función del tiempo, se calculó que, con 120 pacientes y utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon ($\alpha=0.05$, dos colas), se dispondría de un poder del 90% de detectar una diferencia media entre puntos de tiempo de 1.2 pg/mL; considerando los dos grupos de tratamiento por separado, las diferencias detectables serían de 2.5 pg/mL y 1.4 pg/mL en los brazo B ($n=30$) y C ($n=90$), respectivamente.

Con respecto al análisis secundario de niveles de estrógeno entre brazos de tratamiento, y utilizando la prueba de la suma de rangos de 2 muestras de Wilcoxon ($\alpha=0.05$, dos colas), se calculó que se dispondría de un poder del 80% para detectar una diferencia media de 2.5 pg/mL entre grupos para cada punto de tiempo.

Se hipotetizó que existiría un 10% de pacientes con supresión subóptima. Con 90 pacientes en el brazo C, y mediante una prueba binominal de una cola ($\alpha=0.025$, una cola), se estimó un poder del 95% de detectar una tasa del 10% de supresión estrogénica subóptima, comparado con el 1% de la hipótesis nula. Así, por ejemplo, si se observara que 9 de 90 pacientes en el brazo C presentaban supresión subóptima entonces el IC del 95% sería de 4.7 al 18.1%.

Con respecto al objetivo secundario de examinar factores potencialmente predictivos de supresión subóptima, con una tasa anticipada del 10%, y por tanto con 9 pacientes esperadas, no se consideró factible la realización de un análisis multivariado. Se consideró, además, que el poder estadística del análisis univariado también se vería limitado por la posible existencia de grandes diferencias entre grupos con o sin supresión estrogénica subóptima. Así, se calculó que en la comparación univariada de variables continuas mediante la prueba T de 2 colas habría un poder estadístico del 80% y un error $\alpha=0.05$ de 2 colas de detectar una diferencia media de 0.86 SD entre grupos; en lo que se refiere a variables binarias, y tras la aplicación de la prueba exacta de Fisher, se dispondría de un poder del 80% con un error $\alpha=0.05$ de dos colas, para detectar diferencias absolutas de aproximadamente el 40% entre grupos (e.g., 8% vs. 52% de pacientes con subóptima vs óptima supresión en el grupo con o sin QT previa).

4.2.8 Consideraciones estadísticas del subestudio SOFT-EST para el análisis de los primeros 12 meses

Para este primer análisis se tuvieron en cuenta los valores de E2, E1, E1S, FSH y LH obtenidos en todas las pacientes a los 0, 3, 6 y 12 meses de tratamiento. En el grupo asignado a exemestano+triptorelina se calculó la proporción de pacientes que estaban subóptimamente suprimidas en cada punto de tiempo. La definición de supresión estrogénica subóptima exigía un valor de $E2 > 2.72$ pg/mL para cada punto de tiempo post-basal analizado (3, 6 o 12 meses). Dado lo demandante de este *cut-off*, y la falta de evidencia sobre su relevancia clínica, se estudiaron de forma exploratoria 2 puntos de corte adicionales: 10 pg/mL, como dintel por encima del cual los niveles de E2 eran claramente inconsistente situación de menopausia en tratamiento con IA; y 20 mg/mL, como punto de corte inconsistente con estado menopáusico secundario a tratamiento con aGnRH.

Se estudió asimismo la proporción del cambio en los niveles de estrógeno y de FSH y LH en cada punto de tiempo comparado con el nivel basal: $t = \frac{\text{E2} - \text{E2}(0)}{\text{E2}(0)} * 100$, donde t= 3, 6 or 12.

Tras disponer de los resultados del laboratorio de InVentive Health se observó que en un número sustancial de muestras en curso de tratamiento con exemestano+triptorelina, los niveles de estrógenos, particularmente de E2 y E1, se hallaban por debajo del límite de cuantificación del método. Puesto que en ese caso los valores obtenidos se imputaban al mencionado límite de cuantificación, se obtenía una muestra con muchos valores agrupados en ese punto. De esta forma, el modelo propuesto inicialmente, el Modelo de Efecto Mixto, no seguía una distribución normal, a diferencia de lo que se había asumido en un principio. Por este motivo, se prefirió utilizar el modelo de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE, del inglés *Generalized estimating equation*). Este modelo usa la llamada “casi-probabilidad” en la estimación de los parámetros y utiliza la varianza robusta o en sándwich para calcular el error estándar. Este método es válido sin que sea preciso que la variable de respuesta presente una distribución normal. Cada valor hormonal (E2, E1, E1S, FSH, LH) transformado a su logaritmo natural, se modelaba en función del tiempo, tratamiento asignado, interacción tratamiento-tiempo, así como en función de características de las pacientes potencialmente predictoras de supresión subóptima previamente mencionadas (véase Sección anterior). Pese a que se creyó que el modelo mencionado era el más adecuado, los datos se analizaron asimismo mediante un modelo semiparamétrico longitudinal ajustado a las características de las pacientes, y el resultado de este análisis dio resultados consistentes, como se verá en la Sección de Resultados

4.2.9 Calendario de comunicación de resultados

La política de comunicación y publicación de resultados del IBCSG establece que no pueden comunicarse los resultados de los subestudios antes de comunicarse los resultados del estudio principal. Puesto que la comunicación de los resultados del análisis primario de eficacia de los estudios SOFT y TEXT se estableció para Junio 2014 (Congreso Anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica), la comunicación de los resultados de los primeros 12 meses del subestudio SOFT EST se planificó igualmente para esa fecha.

Así, la depuración de los datos y análisis estadístico de los datos del subestudio se realizaron durante los meses de Febrero a Abril de 2014 y se comunicaron de forma preliminar en forma de póster en Junio 2014 en el mencionado Congreso [363]

Por otro lado, se ha planificado la comunicación de los resultados finales del subestudio SOFT-EST, que incluirá datos endocrinos a 4 años y datos de SLE para el Congreso de Cáncer de Mama de San Antonio (SABCS) 2017, coincidiendo con la comunicación de los datos actualizados de eficacia del estudio SOFT

5 Resultados

5. RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN

5.1.1. Período de reclutamiento y reclutamiento por centros

Entre Marzo de 2009 a enero de 2011 se incluyeron 123 pacientes en el estudio, 32 en el grupo asignado a tamoxifeno+triptorelina y 91 en el grupo de exemestano triptorelina. El reclutamiento de pacientes por centros se presenta en la Tabla 37. Todas las pacientes registradas cumplieron los criterios de elegibilidad del estudio.

Tabla 37. Reclutamiento de pacientes en el estudio SOFT según el centro participante

Total reclutado	123
Total en centros SOLTI	85
Madrid – Hospital Universitario 12 de Octubre	12
Palma de Mallorca – Hospital son Llätzer	6
Barcelona – Hospital Clínic I Provincial de Barcelona	1
Barcelona – Hospital Universitario Vall D’Hebron	15
Valencia – Instituto Valenciano de Oncología	9
Palma de Mallorca – Hospital son Dureta	8
Lleida – H. Universitario Arnau de Vilanova	5
Valencia – Hospital Clínico Universitario de Valencia	10
Madrid – Hospital Ramón y Cajal	1
Reus – Hospital Sant Joan De Reus	3
Hospital Dr Negrín	7
Madrid – Centro Oncológico MD Anderson	7
Tarragona-Hospital Sant Pau I Santa Tecla	1
Total en centros IBCSG	35
Budapest – National Institute of Oncology	19
Udine – Clinica Oncologica, Policlinic o Univeritario	3
Pavia – Salvatore Maugeri Foundation	2
Lima – INEN (Instituto de Enfermedades Neoplasicas)	1
Thun – Spital Thun	1
Zurich – Brust-Zentrum	1
Lausanne – Multidisciplinary Oncology Centre	3
Chur – Graubunden Chur	1
Gothenburg – Sahlgrenska University Hospital	4
Total en Centros EORTC	3
Saint-Cloud – Centre Rene Huguenin	3
Centro participante	N

5.1.2 Análisis de cohortes

Cinco pacientes en los que no se había obtenido ninguna muestra durante el primer año de tratamiento fueron excluidas de todo tipo de análisis para este estudio a 12 meses; 4 de ellas no tuvieron ninguna muestra analizada, no recibieron en ningún momento triptorelina y/o retiraron el consentimiento; la paciente restante no tuvo ninguna muestra recogida de forma basal y hasta los 12 meses, pero sí recibió tratamiento con triptorelina y se recogieron muestras más allá de los 12 meses, por lo que se incluirá en el análisis a 4 años.

Se estableció como “**Cohorte Basal**” aquella que permitiría relacionar los niveles de estrógenos y de FSH y LH basales con las características clínicas de las pacientes y, por tanto, consistió en todas las pacientes elegibles que tuvieran una muestra basal analizada, con independencia de que hubieran iniciado o no triptorelina. Tres pacientes adicionales (a las 5 excluidas anteriormente) no disponían de muestra basal analizada, por lo que también fueron excluidas de esta cohorte.

La “**Cohorte Analítica**” consistió, en cambio, en todas las pacientes elegibles que tuvieran al menos una muestra analizada y que recibieran al menos una inyección de triptorelina. En esta cohorte se excluyeron dos pacientes adicionales que nunca iniciaron triptorelina y que se añadirían a las 5 pacientes inicialmente excluidas

La cohorte analítica reunió un total de 116 pacientes (30 pacientes en el brazo de tamoxifeno+triptorelina y 86 en el de exemestano+triptorelina) y en ella se centró este primer análisis a 12 meses.

La Tabla 38 resume estos datos y los motivos de exclusión de las pacientes. La figura 38, asimismo, representa de forma global el flujo de pacientes desde el estudio principal hasta la cohorte analítica del estudio SOFT-EST.

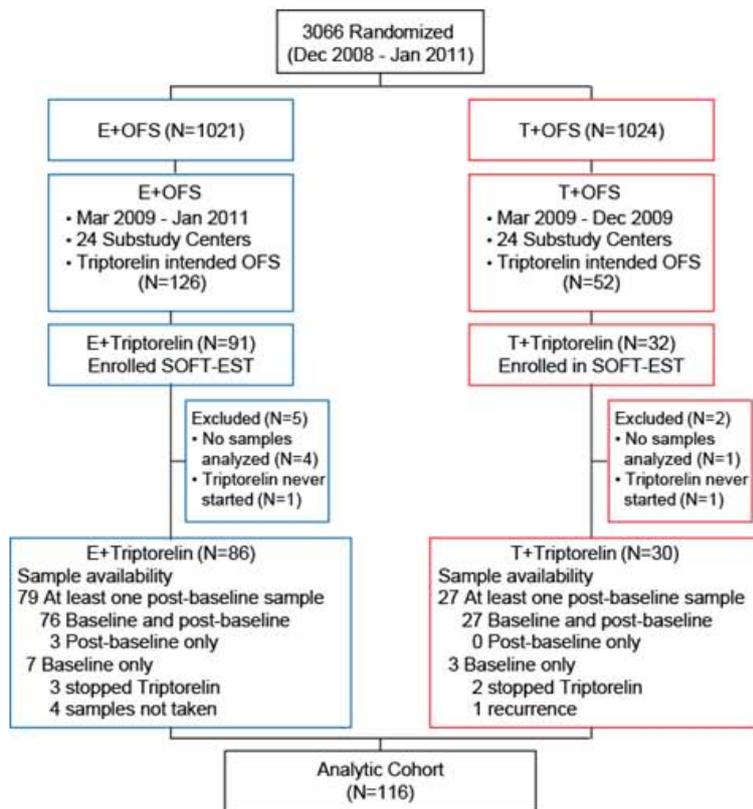
Tabla 38. Resumen de las cohortes de análisis

	Pacientes (%)
<i>Número de pacientes reclutadas</i>	123
Elegibles	123 (100)
Excluidas de todo análisis	5 (4)
Sin muestras analizadas, no tratamiento con triptorelina y/o Retirada de consentimiento	4
Sin muestras analizadas entre los 0-12 meses	1
Analizadas	118 (96)
Excluidas de la Cohorte Analítica	2 (2)
Tratamiento con triptorelina nunca iniciado	2
Incluidas en la Cohorte Analítica	116 (94)
Analizadas	118 (96)
Excluidas de la Cohorte Basal	3 (2)
Muestra basal perdida	1
Muestra basal no obtenida	2
Incluidas en la Cohorte Basal	115 (93)

5.1.3 Estado de las pacientes en el estudio. Discontinuaciones precoces

El estado de las 116 pacientes integrantes de la cohorte analítica, en cuanto a continuación en el estudio durante los primeros 12 meses, se resume en la Tabla 39. Ciento dos pacientes (88%) fueron seguidas y continuaron el tratamiento según el protocolo, mientras que 14 mujeres (12%) salieron del subestudio durante el primer año de tratamiento.

Figura 38: Diagrama CONSORT del flujo de pacientes desde la randomización en el estudio principal SOFT hasta la inclusión en la corte analítica del subestudio SOFT



E=exemestano, T= triptorelina; OFS: Supresión de la Función Ovárica, del inglés, *Ovarian Function Suppression*

Tabla 39. Cohorte Analítica: Estado de las pacientes a los 12 meses de iniciado el estudio. Seguimiento por protocolo vs discontinuación precoz

Estado	Tratamiento asignado		Total (%)
	E+OFS	T+OFS	
<i>Número de pacientes en la cohorte analítica</i>	86	30	116
Seguimiento según protocolo	77	25	102 (88)
Discontinuación precoz	9	5	14 (12)
Motivo de la discontinuación precoz			
Recurrencia del CM	0	1	1
Cirugía (Ooforectomía)	2	0	2
Rechazo del paciente/retirada del consentimiento	6	4	10
Error	1	0	1
Momento de la discontinuación precoz			
Durante los primeros 3 meses	4	3	7
> 3–12 meses	5	2	7

5.1.4 Características de las pacientes en la cohorte analítica

Las características basales de las pacientes incluidas en la cohorte analítica se tabulan en las Tabla 40 a y b y 41. En ellas se detallan datos demográficos de las pacientes, tratamientos sistémicos recibidos previamente y los niveles de estrógenos y gonadotropinas en el momento de la inclusión.

La mayoría de las pacientes fueron de raza blanca (97.4%) y la mediana de edad a la randomización fue de 44 años [IQR (41, 48)]. Sólo 8 pacientes (7%) eran menores de 35 años, mientras que 43 de ellas (37%) presentaron edades comprendidas entre los 45 y 50 años. Aproximadamente la mitad de las pacientes (49.1%) mostraron menstruaciones regulares en el momento de su registro en el estudio, aunque un porcentaje no desdeñable de ellas persistía con amenorrea (36,2%, 42 mujeres).

Sesenta y cuatro pacientes (56%) tuvieron un IMC considerado normal (≤ 25 kg/m²), mientras que 17 (15%) se consideraron obesas (IMC ≥ 30 kg/m²). La mayoría de mujeres no habían sido nunca fumadoras (N=66, 57%).

Las características anatomopatológicas del tumor primario se describen en la Tabla 41. El 52% de las pacientes presentaron tumores pT1 (entre 1 y 2 cm), y en un 67%

Tabla 40a. Cohorte analítica del sub-estudio SOFT-EST: Características de las pacientes y tratamientos sistémicos recibidos

Característica		Tratamiento Asignado		Todas las pacientes (n=116)
		Exemestano+ Triptorelina (n=86)	Tamoxifeno+ Triptorelina (n=30)	
Edad a la randomización (años)	Mediana (IQR)	44 (40,48)	44 (41,48)	44 (41,48)
	<35	8(9.3)	0(0.0)	8(6.9)
	35-<40	10(11.6)	6(20.0)	16(13.8)
	40-<45	27(31.4)	9(30.0)	36(31.0)
	45-<50	31(36.0)	12(40.0)	43(37.1)
Menstruaciones	Regulares	39(45.3)	18(60.0)	57(49.1)
	Irregulares	14(16.3)	3(10.0)	17(14.7)
	Amenorrea	33(38.4)	9(30.0)	42(36.2)
Histerectomía	Yes	2(2.3)	0(0.0)	2(1.7)
IMC (kg/m ²)	Median (IQR)	24 (22,28)	23 (22,26)	24 (22,28)
	Normal (<25)	45(52.3)	19(63.3)	64(55.2)
	Sobrepeso (25-<30)	26(30.2)	5(16.7)	31(26.7)
	Obesa (≥30)	13(15.1)	4(13.3)	17(14.7)
	Desconocido	2(2.3)	2(6.7)	4(3.4)
Hábito tabáquico	Fumadora actual	25(29.1)	3(10.0)	28(24.1)
	Ex fumadora	11(12.8)	9(30.0)	20(17.2)
	Nunca fumadora	48(55.8)	18(60.0)	66(56.9)
	Desconocido	2(2.3)	0(0.0)	2(1.7)
QT previa	No	39(45.3)	13(43.3)	52(44.8)
	Sí	47(54.7)	17(56.7)	64(55.2)
Tipo de QT	Neoadyuvante	15(31.9)	6(35.3)	21(32.8)
	Adyuvante	30(63.8)	11(64.7)	41(64.1)
	Ambas	2(4.3)	0(0.0)	2(3.1)
Esquema de QT	Antraciclina+taxano	34(72.3)	10(58.8)	44(68.8)
	Basado en antraciclina	11(23.4)	4(23.5)	15(23.4)
	Basado en taxano	2(4.3)	3(17.6)	5(7.8)
Duración de la QT (semanas)	Mediana (IQR)	20.0(18.0, 24.0)	20.0(18.0, 24.0)	20.0(18.0, 24.0)
	[Mín, Máx]	[12.0, 60.0]	[9.0, 36.0]	[9.0, 60.0]
	<12 semanas	0 (0.0)	1(5.9)	1 (1.6)

	≥ 12 semanas	47 (100.0)	16 (94.1)	63 (98.4)
Meses desde última dosis QT a randomización	Mediana (IQR)	4 (2,6)	4 (2,6)	4 (2,6)
Tamoxifeno previo	No	58(67.4)	22(73.3)	80(69.0)
	Sí	28(32.6)	8(26.7)	36(31.0)
Duración de tamoxifeno previo (semanas)	Mediana (IQR)	16 (9,20)	21 (10,23)	18 (9,21)

Tabla 40b. Cohorte analítica del sub-estudio SOFT-EST: Niveles hormonales basales

		Tratamiento asignado		
		Exemestano+ Triptorelina (n=86)	Tamoxifeno+ Triptorelina (n=30)	Todas las pacientes (n=116)
Estradiol (E2; pg/mL)	Mediana (IQR)	49.9 (6.8,110.0)	72.5 (6.2,199.0)	50.6 (6.5,124.0)
	Sin muestra	3	0	3
Estrona (E1; pg/mL)	Mediana (IQR)	43.6 (24.0,70.0)	39.2 (24.8,102.2)	41.8 (24.1,71.3)
	Sin muestra	3	0	3
Sulfato de estrona (E1S; pg/mL)	Mediana (IQR)	784.0 (315.0,1320.0)	1000.0 (272.2,1620.0)	894.0 (307.0,1380.0)
	Sin muestra	3	0	3
FSH (IU/L)	Mediana(IQR)	19.6 (7.6,47.9)	13.7 (6.4,41.8)	15.5 (6.9,46.8)
	Sin muestra	6	1	7
LH (IU/L)	Mediana (IQR)	15.9 (5.9,26.8)	10.3 (6.9,30.4)	13.7 (6.0,27.7)
	Sin muestra	5	1	6

de casos no hubo afectación ganglionar axilar. En cuanto a grado histológico, la mayoría de tumores (83%) fueron clasificados como grado histológico 1 o 2. El 100% de los tumores fueron RE+ o RP+ (definidos como ≥10% de positividad nuclear en ambos casos).

En lo que concierne a los tratamientos recibidos para el tumor primario hasta el momento del registro en el estudio, debe destacarse lo siguiente:

- El 62% de las mujeres recibieron cirugía conservadora y RT como tratamiento locorregional.
- Sesenta y cuatro pacientes (55%) recibieron QT previa, y el régimen más común administrado incluyó antraciclinas y taxanos (44 pacientes, 69%).
- Treinta y seis pacientes (31%) recibieron tamoxifeno, con una mediana de duración de 17.5 semanas (rango intercuartil: 8.8 a 20.5).

Con respecto a los datos hormonales basales, la mediana (y rango intercuartil) de los niveles de E2 fue de 49.9 (6.8, 110.0), mientras que las medianas de los valores de E1 y E1S fueron de 43.6 (24.0, 70.0) y 784.0 (315.0, 1320.0), respectivamente. En cuanto a los niveles de FSH y LH, la mediana fue de 19.6 y 15.9, respectivamente, con una amplia variabilidad en ambos casos (rango intercuartil para FSH 7.6 a 47.9 y para LH 5.9 a 26.8).

A pesar de cumplir la definición de premenopausia exigida por el protocolo SOFT, 35% de las pacientes en la cohorte analítica presentaron, de hecho, niveles basales de E2 medidos por GC-MS/MS compatibles con postmenopausia (≤ 20 pg/mL), lo cual se vió confirmado, además, por los niveles medios de FSH y LH observados centralmente en este subgrupo. La Tabla 42 recibe las características de las pacientes en función de los niveles basales centrales de E2 (≤ 20 o $E2 > 20$ pg/mL), donde se observan claramente las diferencias en la prescripción de QT previa (65% vs 10.3%, respectivamente), estado menstrual (amenorrea 66.7% vs 18.9%, respectivamente) y niveles de estrógenos y gonadotropinas entre las dos poblaciones, sin que se observen diferencias en la mediana de edad.

Tabla 41. Características anatomopatológicas del tumor primario en la cohorte analítica.

Característica		Tratamiento asignado		Total (n=116)
		E+Triptorelina (n=86)	T+Triptorelina (n=30)	
Lateralidad del tumor	Bilateral	1(1.2)	1(3.3)	2(1.7)
	Izquierdo	36(41.9)	9(30.0)	45(38.8)
	Derecho	49(57.0)	20(66.7)	69(59.5)
Tamaño tumoral	<1cm	14(16.3)	6(20.0)	20(17.2)
	1-2cm	48(55.8)	13(43.3)	61(52.6)
	>2-5cm	20(23.3)	9(30.0)	29(25.0)
	>5cm	0(0.0)	2(6.7)	2(1.7)
	Desconocido	4(4.7)	0(0.0)	4(3.4)
Grado tumoral	1	27(31.4)	7(23.3)	34(29.3)
	2	46(53.5)	16(53.3)	62(53.4)
	3	10(11.6)	5(16.7)	15(12.9)
	Desconocido	3(3.5)	2(6.7)	5(4.3)
RE	Negativo	2(2.3)	0(0.0)	2(1.7)
	Positivo (≥10%)	84(97.7)	30(100.0)	114(98.3)
RP	Negativo	8(9.3)	1(3.3)	9(7.8)
	Positivo (≥10%)	78(90.7)	29(96.7)	107(92.2)
Estado de HER2	Negativo	83(96.5)	28(93.3)	111(95.7)
	Positivo	3(3.5)	2(6.7)	5(4.3)
Estado ganglionar	pN0	59(68.6)	19(63.3)	78(67.2)
	pN1+	27(31.4)	11(36.7)	38(32.8)

E=Exemestano; T= Tamoxifeno; Trip: triptorelina

Tabla 42. Características de las pacientes en función de niveles basales centrales de E2 (≤ 20 o $E2 > 20$ pg/mL)

		Basal E2 \leq 20 pg/mL (n=39)	Basal E2 $>$ 20 pg/mL (n=74)	Total (n=113*)
Tratamiento asignado	E+OFS	28(71.8)	55(74.3)	83(73.5)
	T+OFS	11(28.2)	19(25.7)	30(26.5)
Edad a la randomización (años)	Median (Q1,Q3)	45 (42,48)	44 (39,48)	44 (40,48)
	< 35 yrs	2(5.1)	6(8.1)	8(7.1)
	\geq 35 yrs	37(94.9)	68(91.9)	105(92.9)
Menstruaciones previas a la randomización	Regulares	8(20.5)	49(66.2)	57(50.4)
	Irregulares	5(12.8)	11(14.9)	16(14.2)
	Amenorrea persistente	26(66.7)	14(18.9)	40(35.4)
IMC (kg/m²)	Mediana (Q1,Q3)	26 (24,28)	23 (22,27)	24 (22,28)
Hábito tabáquico	Fumadora actual	8(20.5)	19(25.7)	27(23.9)
	Ex-fumadora	10(25.6)	10(13.5)	20(17.7)
	Nunca fumadora	21(53.8)	43(58.1)	64(56.6)
	Desconocido	0(0.0)	2(2.7)	2(1.8)
QT previa	No	4(10.3)	47(63.5)	51(45.1)
	Sí	35(89.7)	27(36.5)	62(54.9)
Esquema de QT	Basado en antraciclinas	11(31.4)	3(11.1)	14(22.6)
	Antraciclinas+taxanos	21(60.0)	22(81.5)	43(69.4)
	Basado en taxanos	3(8.6)	2(7.4)	5(8.1)
Duración QT previa (semanas)	Mediana (Q1,Q3)	18 (18,24)	24 (18,24)	20 (18,24)
Tamoxifeno previo	No	26(66.7)	52(70.3)	78(69.0)
	Sí	13(33.3)	22(29.7)	35(31.0)
Duración de tamoxifeno previo (semanas)	Mediana (Q1,Q3)	18 (14,20)	16 (8,22)	18 (8,21)
Niveles hormonales basales				
Estradiol (E2; pg/mL)	Mediana (Q1,Q3)	4 (3,7)	110 (54,170)	51 (6,124)
Estrona (E1; pg/mL)	Mediana (Q1,Q3)	19 (15,28)	60 (41,106)	42 (24,71)

Sulfato de estrona (E1S; pg/mL)	Mediana(Q1,Q3)	265 (146,396)	1205 (890,2342)	894 (307,1380)
LH (IU/L)	Mediana (Q1,Q3)	60 (30,73)	8 (6,20)	15 (7,47)
FSH (IU/L)	Mediana (Q1,Q3)	25 (17,44)	8 (5,21)	14 (6,28)

Q1 y Q3; primer y tercer cuartil IQR: rango intercuartil (Q3-Q1)

5.1. NIVELES DE ESTRÓGENO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y DEL TRATAMIENTO ASIGNADO

5.2.1 Disponibilidad de muestras

Aunque los puntos de tiempos pre-especificados fueron 0, 3, 6 y 12 meses, se dispuso de muestras adicionales, o bien post-ooforectomía, como exigía el protocolo, o bien no planificadas. Así:

- 7 pacientes tuvieron muestra a los 9 meses de su registro en el subestudio
 - En 1 caso se trató de la muestra previa a la discontinuación y se utilizó en el análisis como muestra a los 12 meses
 - En las otras 6 pacientes no se aportaron los motivos de obtención de muestra adicional (probablemente se obtuvo por error). Dichas pacientes disponían además de la muestra correspondiente a los 6 y 12 meses. En este caso las 6 muestras adicionales obtenidas a los 9 meses no se utilizaron en el análisis estadístico
- 3 pacientes disponían de muestra obtenida a los 10 meses:
 - En 1 caso correspondió a la muestra planificada a los 3 meses post-ooforectomía (se indicó ésta ante la existencia de sangrado vaginal); dicha muestra no se utilizó en el análisis estadístico.

- En 1 paciente se dispuso de una muestra adicional a los 10 meses por razones desconocidas; puesto que se disponía asimismo de la muestra planificada a los 12 meses, se desestimó para el análisis dicha muestra adicional.
- En 2 pacientes, la muestra de 12 meses coincidió con la muestra de 3 meses post-ooforectomía (1 caso) o se obtuvo tras varios meses de discontinuar el tratamiento con triptorelina. En ambos casos las muestras no se utilizaron para el análisis estadístico.

5.2.2 Grupo de tratamiento con Exemestano+Triptorelina

Una vez descartadas las discontinuaciones precoces acontecidas durante el primer año de tratamiento y las muestras no disponibles, se analizaron las 79 pacientes tratadas con exemestano+triptorelina en las que se había obtenido al menos una muestra. En este grupo, y por lo que respecta a las 3 fracciones de estrógenos, E2, E1 y E1S, se observó una mediana de reducción con respecto a valor basal $\geq 95\%$ en todos los puntos de tiempo (3, 6 y 12 meses), como puede observarse en la Tabla 43. La mediana de los niveles de E2 y E1 para todas las muestras post-basales fue de 0.625 y 1.56 pg/mL, respectivamente, correspondiente al límite bajo de cuantificación (LLQ, del inglés *Lower Limit of Quantification*) del método para ambas fracciones estrogénicas. Por lo que hace referencia a la mediana niveles de E1S, éstos pasaron de 784 pg/mL de forma basal a 11.7, 14.9 y 10.6 pg/mL a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente (Tabla 44)

Tabla 43. Porcentaje de cambio en los niveles de estrógenos en cada punto de tiempo con respecto al valor basal en las pacientes randomizadas a exemestano+triptorelina

	Porcentaje de cambio con respecto a muestra basal		
	3 meses	6 meses	12 meses
N¹	64	66	63
Estradiol (E2; pg/mL)			
Media (SD)	-76 (76)	-82 (62)	-85 (46)
Media geométrica	-88	-90	-83
Mediana (IQR)	-96 (-99,-83)	-96 (-99,-85)	-97 (-99,-87)
Estrona (E1; pg/mL)			
Media(SD)	-90 (18)	-87 (27)	-82 (61)
Media geométrica	-78	-79	-91
Mediana (IQR)	-95 (-98,-91)	-95 (-98,-91)	-95 (-98,-90)
Sulfato de estrona (E1S; pg/mL)			
Media(SD)	-89 (27)	-86 (36)	-92 , -93(13)
Media geométrica	-90	-89	-92
Mediana(IQR)	-98 (-99,-93)	-97 (-99,-92)	-98 (-99,-94)

SD: desviación estándar; IQR: rango intercuartil

5.2.2 Grupo de tratamiento con Tamoxifeno+Triptorelina

En las 30 pacientes que constituyeron la cohorte analítica del grupo asignado a tamoxifeno+triptorelina, la mediana de los niveles de E2 en las muestras post-basales fue de 3.4, 3.2 y 3.2 pg/mL a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente. De forma similar, los niveles de E1 y E1S presentaron una reducción significativa. Así, los valores de E1, expresados en mediana, pasaron de 39.2 de forma basal a 17.9 (3meses), 18.2 (6 meses) y 17 pg/mL (12 meses). En cuanto a E1S, y considerando los mismos puntos de tiempo, los valores obtenidos fueron, respectivametne, de 1000, 229, 204 y 206 pg/mL.

5.2.3 Descripción de los niveles de E2 en ambos grupos de tratamiento y comparación entre grupos

La descripción detallada de los niveles de E2 en ambos grupos de tratamiento viene expresada en la tabla 44 y representada en forma de “diagrama de caja y bigotes” en la figura 39.

La obtención de muestras de forma intermitente o a falta de muestras por discontinuación precoz fue una constante durante el estudio, principalmente durante el primer período de 12 meses. Por este motivo en la Tabla 44 se señala como referencia las muestras esperadas para cada punto de tiempo, de manera que quede claramente reflejado el cumplimiento global real de obtención de muestras. Se consideró que una muestra era “no esperada” si la paciente había interrumpido el tratamiento con triptorelina más de 1 mes antes del punto de tiempo planificado.

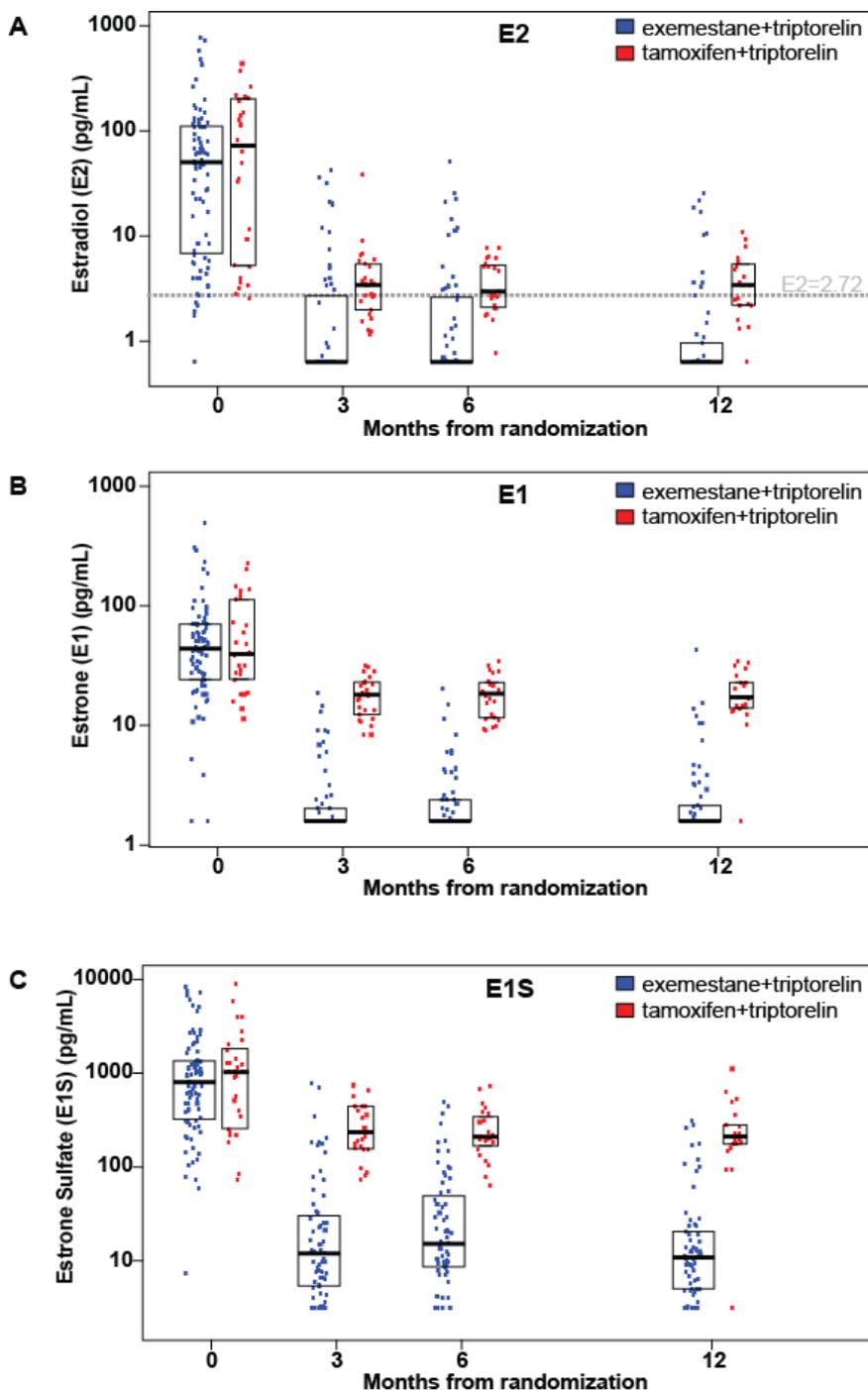
Tabla 44. Niveles de estrógenos (E2, E1 y E1S) en cada punto de tiempo en función del tratamiento asignado

	Exemestano+triptorelina (N=86)				Tamoxifeno+triptorelina N=30			
	Basal	3meses	6meses	12meses	Basal	3meses	6meses	12mese
Muestras esperadas	86	83	80	78	30	28	27	26
E2 (pg/mL)								
Muestras analizadas (N)	83	67	67	65	30	26	24	20
Media geométrica	32.7	1.3	1.3	1	40.4	3.4	3.2	3.2
Mediana (IQR)*	49.9 (6.8,110)	0.6 (0.6,2.7)	0.6 (0.6,2.6)	0.6 (0.6,0.9)	72.5 (6.2,199)	3.4 (2.1,5.3)	2.9 (2.1,5.1)	3.4 (2.2,5.2)
Media (SD)	95.4 (149.91)	4 (8.44)	3.6 (7.95)	2.5 (5.07)	114.5 (124.99)	4.9 (6.98)	3.8 (2.02)	4 (2.77)
Rango	(0.6,766)	(0.6,41.9)	(0.6,51.4)	(0.6,25.1)	(2.5,436)	(1.1,37.7)	(0.8,7.8)	(0.6,10.8)
N(%) <LLQ	4(5)	61(91)	54(81)	57(88)	0(0)	4(15)	5(21)	6(30)
E1 (pg/mL)								
Muestras analizadas (N)	83	67	67	65	30	26	24	21
Media geométrica	41	2.2	2.2	2.2	45.1	16.9	17.2	16.6
Mediana (IQR)	43.6 (24,70)	1.6 (1.6,2)	1.6 (1.6,2.3)	1.6 (1.6,2.1)	39.2 (24.8,102)	17.9 (12.4,22.7)	18.2 (11.6,22.5)	17 (13.8,22.6)
Media (SD)	65.3 (77.24)	2.9 (3.33)	2.8 (3.17)	3.4 (5.75)	64.4 (57.84)	18.2 (6.88)	18.7 (7.54)	19 (8.4)
Rango	(1.6,486)	(1.6,18.6)	(1.6,20.4)	(1.6,42.5)	(11.3,226)	(8.3,31.2)	(9.1,34.2)	(1.6,34.5)
N(%) <LLQ	5(6)	64(96)	57(85)	54(83)	0(0)	3(12)	4(17)	5(24)
E1S(pg/mL)								
Muestras analizadas (N)	83	67	67	65	30	26	24	21
Media geométrica	710.3	15.4	20.6	13.1	787.5	239.9	216.8	193.6
Mediana (IQR)*	784 (315,1320)	11.7 (5.3,29.6)	14.9 (8.4,48.1)	10.6 (4.9,20)	1000 (272,1620)	229 (154.8,420.8)	204 (173.8,321.2)	206 (172,273)
Media (SD)	1377.9 (1752.51)	56 (133.71)	54.5 (96.93)	34.2 (5.11)	1501.5 (1897.57)	295 (192.65)	259 (167.23)	278.5 (236.38)
Rango	(7.2,8000)	(3.1,766)	(3.1,480)	(3.1,303)	(72.2,8770)	(72.8,725)	(62.5,718)	(3.1,1090)
N(%) <LLQ	5(6)	25(37)	22(33)	19(29)	0(0)	3(12)	4(17)	5(24)

IQR: rango intercuartil; SD: desviación estándar; LLQ, límite inferior de cuantificación, del inglés *Lower Limit of Quantification*)

*Los valores están redondeados a un decimal, incluyendo valores al LLQ para cada fracción estrogénica (ej E2=0.6 se redondeó a 1 decimal a partir de 0.625)

Figura 39 Distribución de los niveles de estrógeno (E2, E1 y E1S) en función del tiempo y tratamiento asignado



Las cajas indican los percentiles 25, 50 y 75. En el Panel A, la línea horizontal discontinua indica el punto de corte de 2.72 pg/mL, las reducciones de los niveles de E2, E1 y E1S fueron mayores en el grupo de exemestano+triptorelina que en el grupo de tamoxifeno+triptorelina para cada punto de tiempo post-basal ($p < 0.0001$)

5.2.4 Pacientes con niveles post-basales de E2>2.72 pg/mL y/o sangrado vaginal en el grupo de exemestano+triptorelina

5.2.4.1 Proporción de pacientes con niveles post-basales de E2>2.72 pg/mL.

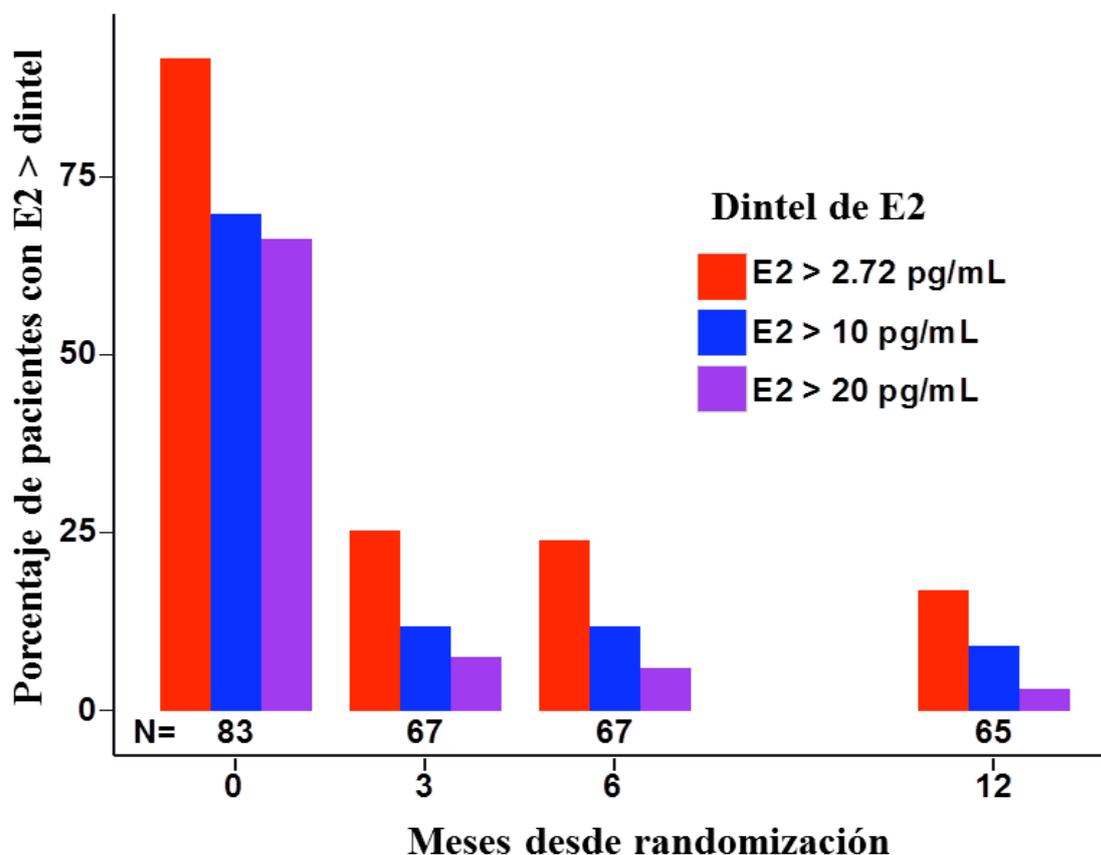
Se dispuso de al menos una muestra durante el tratamiento (*post-basal*) analizada en 79 de las 86 pacientes asignadas a exemestano+triptorelina. En los restantes 7 casos no se dispuso de ninguna muestra en curso de tratamiento. En concreto, 48 mujeres tuvieron 3 muestras post-basales, 24 tuvieron 2, mientras que 7 pacientes tuvieron 1 única muestra analizada en curso de tratamiento.

En total, 27 de las 79 pacientes mencionadas (34.2%, 95% CI 23.9%-45.7%) en el grupo de exemestano+triptorelina presentaron al menos una muestra post-basal con un valor de E2 superior a 2.72 pg/mL, indicativo de supresión estrogénica subóptima. Considerando los tres puntos de tiempo post-basales en este primer año de tratamiento analizado, se observó que 25%, 24% y 17% de las pacientes de las patients presentaron E2>2.72 pg/mL a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente.

Tal y como se ha comentado anteriormente, dada la escasa evidencia sobre la repercusión que podría tener este punto de corte tan demandante a nivel clínico, se estudiaron también otros dinteles menos exigentes, esto es, 10 y 20 pg/mL. Se observó que 14 (17.7%) de las pacientes tuvieron al menos una muestra post-basal con un valor de E2>10 pg/mL, mientras que 10 (12.7%) presentaron al menos una muestra post-basal con niveles de E2>20 pg/mL,

Los resultados de los tres puntos de corte explorados se resumen en la Figura 40 y en las Tablas 45a y 45b.

Figura 40. Porcentajes de pacientes en el grupo de exemestano+triptorelina con valores de estradiol (E2) por encima de los puntos de corte explorados.



El punto de corte pre-especificado ($>2.72 \text{ pg/mL}$) define un dintel estricto indicativo de *E2 inconsistente con situación de menopausia y tratamiento con un IA*. Asimismo se representan los resultados de dos puntos de cortes adicionales exploratorios: así, $>10 \text{ pg/mL}$ supone un punto de corte menos estricto por encima del cual el *E2* es *claramente inconsistente con situación de menopausia y tratamiento con un IA*. Finalmente, $>20 \text{ pg/mL}$ define un *estado inconsistente con estado menopáusico relacionado con el tratamiento con aGnRH*. El número de pacientes testados en cada punto de tiempo se muestra debajo de las barras.

Tablas 45a y 45b. Proporciones de pacientes tratadas en el grupo de exemestano+triptorelin con niveles de E2 por encima de los tres dinteles explorados: el pre-definido de >2.72 pg/mL, y los 2 dinteles adicionales (>10 y > 20 pg/mL) en función del uso previo de QT

Punto de tiempo	N	N (%) con E2>2.72 (pg/mL)			N (%) con E2 >10 (pg/mL)		
		Total	No QT Previa	QT previa	Total	No QT previa	QT previa
0 (Basal)	83	76(92)	37(97)	39(87)	58(70)	36(95)	22(49)
3 meses	67	17(25)	10(37)	7(18)	8(12)	7(26)	1(2)
6 meses	67	16(24)	9(29)	7(19)	8(12)	4(13)	4(11)
12 meses	65	11(17)	8(27)	3(9)	6(9)	5(17)	1(3)
3, 6 o 12 meses (≥1 con E2>dintel)	79	27(34.2)	16(45.7)	11(25)	14(17.7)	10(28.6)	4(9.1)
3, 6 o 12 meses ≥2 con E2>dintel		13(16.5)			6(7.6)		

Punto de tiempo	N	N (%) con E2>20 (pg/mL)		
		Total	No QT previa	QT previa
0 (Basal)	83	55(66)	35(92)	20(44)
3 meses	67	5(7)	4(15)	1(2)
6 meses	67	4(6)	1(3)	3(8)
12 meses	65	2(3)	2(7)	0(0)
3, 6, o 12 meses (≥1 con E2>cut-off)	79	10 (12.7)	6(17.1)	4(9.1)
3, 6, o 12 meses ≥2 con E2> cut-off		1(1.3)		

N = número de pacientes

5.2.4.2 Pacientes con sangrado vaginal

Dos pacientes en el grupo de exemestano+triptorelina presentaron sangrado vaginal más allá de los 3 meses del inicio de triptorelina, pero solo en 1 caso se demostró centralmente niveles elevados de E2 (E2: 41 pg/mL). En el otro caso se rescató un suero adicional obtenido en los días del sangrado que demostró niveles locales en el rango premenopáusico, pero dicha muestra no llegó a analizarse de forma central. Las características clínicas, niveles hormonales y manejo de estas dos pacientes se resumen en la Tabla 46. No se observó sangrado vaginal en ninguna de las pacientes del grupo de tamoxifeno+triptorelina

Tabla 46. Características de las 2 pacientes en el grupo de exemestano+triptorelina que experimentaron sangrado vaginal.

P T	Fecha *	E2	E1	E1S	FSH	LH	a	IM C	M	Q T	T	Fechas inyección Triptorelina			
												1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
0	3/8/11	117	49	192	5.5	2.9	47	O	N	No	No				
3	2/11/11	41.9	9.1	27.8	11.2	0.2						3/8/11	31/8/11	29/9/11	27/10/11
6	--											23/11/11	21/12/11	18/1/12	
9												16/2/12	16/3/12	13/4/12	
12	2/8/12	3.5	10.4	22.8	6	0.9						11/5/12	8/6/12	05/7/12	02/8/12
B															
0	9/3/11	120.4	5.2	71.2	NA	NA	40	N	I	Sí	Sí				
3	11/6/11	0.6	1.6	3.9	5.0	0.6						9/03/11	6/4/11	04/5/11	
6	31/8/11	1.3	8.4	43.5	4.1	1.9						1/6/11	29/6/11	27/7/11	
9															
P O	22/12/11	0.6	1.6	3.13	146.5	54.1									

* Fecha de obtención de la muestra; pt: identificación de la paciente; PT: punto de tiempo; a: años; M: menstruaciones (N: normal; I: irregular); IMC: Índice de Masa Corporal; Ob: obesidad; QT: quimioterapia previa; T: tamoxifeno previo; PO: post-ooforectomía

La primera paciente (casilla rosa) además de iniciar triptorelina en 3/8/2011, recibió tratamiento con exemestano entre Agosto 2011 y Diciembre 2011. Por persistencia en ese momento de menstruaciones irregulares, se le prescribió tamoxifeno (continuo con triptorelina) y no se obtuvo la muestra prevista en la visita de los 6 meses.

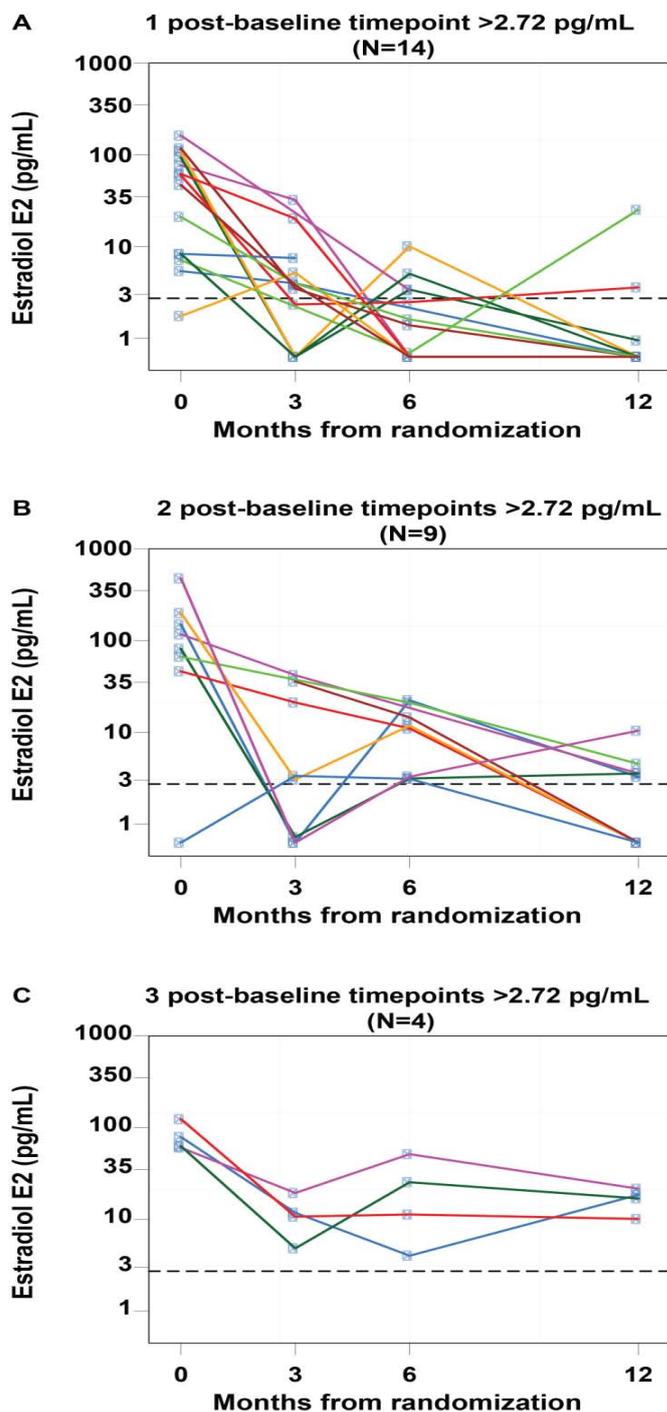
La paciente B experimentó sangrado vaginal a los 6 meses del inicio de triptorelina (9/3/2011) y se procedió a realizar ooforectomía en base a niveles locales de E2 obtenidos el 18/8/2011 compatibles con premenopausia. Tras ello continuó con exemestano; y se obtuvo una muestra a los 3 meses post-ooforectomía, de acuerdo con lo indicado por el protocolo

5.2.4.3 Evolución de los niveles de E2 en las pacientes con supresión estrogénica subóptima en al menos una muestra post-basal

Se consideró de interés estudiar en qué momento solían detectarse valores de E2 por encima del dintel pre-especificado, puesto que podía ocurrir que se observaran más al principio del estudio, o bien al contrario, se identificara un “escape de supresión” con el tiempo. Este concepto se estudiará con más detalle en la segunda parte del estudio, cuando se analicen los resultados finales, con las muestras del período completo de 4 años.

La evolución de los niveles de estrógeno en función del tiempo para las 27 pacientes con al menos una muestra basal con supresión estrogénica subóptima ($E2 > 2.72$ pg/mL) se muestra en la Figura 36. De entre estas 27 pacientes, 14 y 9 tuvieron valores de E2 en 1 y 2 puntos de tiempo post-basales, respectivamente. Cuatro pacientes (3 de ellas < 35 años y 3 sin QT previa) presentaron niveles de $E2 > 2.72$ pg/mL los 3 puntos de tiempo post-basales. Ello representa el 8% (4/48) de las mujeres que disponían de las 3 muestras post-basales analizadas. Las características clínicas, niveles hormonales detectados en cada punto de tiempo y fechas de inyección triptorelina de estas 4 pacientes se resumen en la Tabla 47.

Figura 41. Evolución de los niveles de E2 en función del tiempo y del número (1, 2 o 3) de muestras post-basales con un valor de E2 >2.72 pg/mL en las 27 pacientes con al menos 1 muestra post-basal con E2 superior al dintel mencionado



Los paneles A, B y C muestran la dinámica de los niveles de E2 en 14, 9 y 4 pacientes, respectivamente. La línea horizontal discontinua indica el dintel de 2.72 pg/mL.

Tabla 47. Resumen de las 4 pacientes asignadas a exemestano+triptorelina que presentaron supresión estrogénica subóptima (E2>2.72 pg/mL) persistente durante el seguimiento

								Fechas de inyección de triptorelina			
ID	PT	Fecha muestra	E2	E1	E1 S	FS H	LH	#1	#2	#3	#4
C 1	0	5/8/01	79.1	58.8	625	2.4	1.6				
	3	22/10/01	11.8	8.9	181	3.7	0.1	5/8/01	1/9/01	29/9/01	20/10/01
	6	19/1/02	4	2	39.3	6.4	0.1	24/11/01	22/12/01	19/1/02	
	9	13/4/02	1.8	33.9	29.8	5.4	0.1	16/2/02	16/3/02	13/4/02	
	12	7/7/02	18.5	13.5	176	5.6	0.1	11/5/02	8/6/02	7/7/02	5/8/02
C 2	0	10/11/01	60.6	47.5	582	5.7	2.6				
	3	27/1/02	19.4	6.8	167	6.8	0.1	10/11/01	8/12/01	5/1/02	2/2/02
	6	27/4/02	51.4	20.4	439	4.8	0.1	2/03/02	30/3/02	27/4/02	
	9							25/5/02	22/6/02	20/7/02	
	12	10/11/02	21.6	10.2	257	7.5	0.1	17/8/02	14/9/02	12/10/02	9/11/02
C 3	0	4/12/01	62.8	30.6	923	8.4	4.8				
	3	4/3/02	4.8	4.2	55.1	5.5	0.2	4/12/01	4/1/02	4/2/02	4/03/02
	6	3/6/02	25.4	14.7	363	4.2	0.3	8/4/02	6/5/02	3/6/02	
	9							1/7/02	26/8/02		
	12	18/11/02	16.9	4.5	105	8	0.1	23/9/02	21/10/02	18/11/02	
C 4	0	18/11/01	124	61.3	934	4	4.9				

	3	21/2/02	10. 7	5.5	76. 8	7.2	0.1	18/11/0 1	17/12/0 1	14/17/0 2	11/2/02
	6	23/5/02	11. 3	4.4	84. 2	6.5	0.1	11/3/02	8/4/02	6/5/02	
	9							4/6/02	1/7/02	29/7/02	27/8/02
	12	22/11/0 2	10. 1	3.2	96. 6	5.4	0.1	23/9/02	21/10/0 2	20/11/0 2	

Nota: las fechas de extracción se *normalizaron* al año 2000 para ayudar a mantener la confidencialidad. En realidad las fechas reales corresponden a los años 2011 y 2012

5.2.4.4 Características de las pacientes con supresión estrogénica subóptima en al menos una muestra post-basal

De acuerdo con los objetivos especificados para este primer análisis a 12 meses, y por lo que respecta a las pacientes tratadas con exemestano+triptorelina, se investigaron las características clínicas y los niveles hormonales basales de la población con supresión estrogénica óptima en todas las muestras post-basales (N=52), en comparación con las 27 pacientes que presentaron al menos 1 muestra post-basal con un valor >2.72 pg/mL. La Tabla 48 resume la comparación entre estas dos poblaciones.

Tabla 48. Características clínicas y niveles hormonales basales de la población con supresión estrogénica óptima en todas las muestras basales en comparación con la población con al menos una muestra post-basal con valor de E2>2.72 pg/mL (Sólo pacientes pertenecientes al grupo exemestano+triptorelina)

Características		Valores E2 post-basal			Valor P*
		Todos E2 ≤2.72 (n=52)	Al menos 1 valor de E2>2.72 (n=27)	Pacientes con muestra post-basal (n=79)	
Edad (años)	Mediana(IQR)	44 (40,48)	45 (40,48)	44 (40,48)	0.792
	< 35 años	4 (7.7)	4 (14.8)	8 (10.1)	
Mentruación	Normal	12 (23.1)	2 (7.4)	14 (17.7)	0.162
	Irregular	20 (38.5)	10 (37.0)	30 (38.0)	
	Amenorrea	20 (38.5)	15 (55.6)	35 (44.3)	
IMC (kg/m ²)	Mediana(IQR)	24 (22,27)	27 (23,29)	24 (22,28)	0.054
Hábito tabáquico	Fumadora actual	15 (28.8)	9 (33.3)	24 (30.4)	0.926
	Ex fumadora	7 (13.5)	3 (11.1)	10 (12.7)	
	Nunca fumadora	29 (55.8)	14 (51.9)	43 (54.4)	
	Desconocido	1 (1.9)	1 (3.7)	2 (2.5)	
QT previa	No	19 (36.5)	16 (59.3)	35 (44.3)	0.061
	Sí	33 (63.5)	11 (40.7)	44 (55.7)	
Régimen de QT (esquema básico, con o sin C)	Antrac+Taxano	25 (75.8)	8 (72.7)	33 (75.0)	0.788
	Antrac.	7 (21.2)	3 (27.3)	10 (22.7)	
	Taxano	1 (3.0)	0 (0.0)	1 (2.3)	
Duración QT (Sem)	Mediana (IQR)	21 (18,24)	20 (18,24)	20 (18,24)	ND
Tamoxifeno previo	No	32 (61.5)	21 (77.8)	53 (67.1)	0.207
	Sí	20 (38.5)	6 (22.2)	26 (32.9)	
Duración tamoxifeno (semanas)	Mediana (IQR)	18 (12,20)	12 (10,12)	16 (10,20)	ND
Niveles hormonales basales					
E2 (pg/mL)	Mediana (IQR)	41 (5,110)	65 (27,115)	50 (6,110)	0.183
E1 (pg/mL)	Mediana (IQR)	41 (24,72)	47 (22,61)	42 (24,70)	0.78
E1S (pg/mL)	Median (IQR)	637 (303,1278)	854 (490,1282)	712 (306,1288)	0.669
Valores perdidos		2	1	3	
FSH (IU/L)	Mediana (IQR)	34 (12,58)	8 (5,34)	21 (8,51)	0.002
LH (IU/L)	Mediana (IQR)	21 (7,32)	7 (4,20)	16 (6,28)	0.004

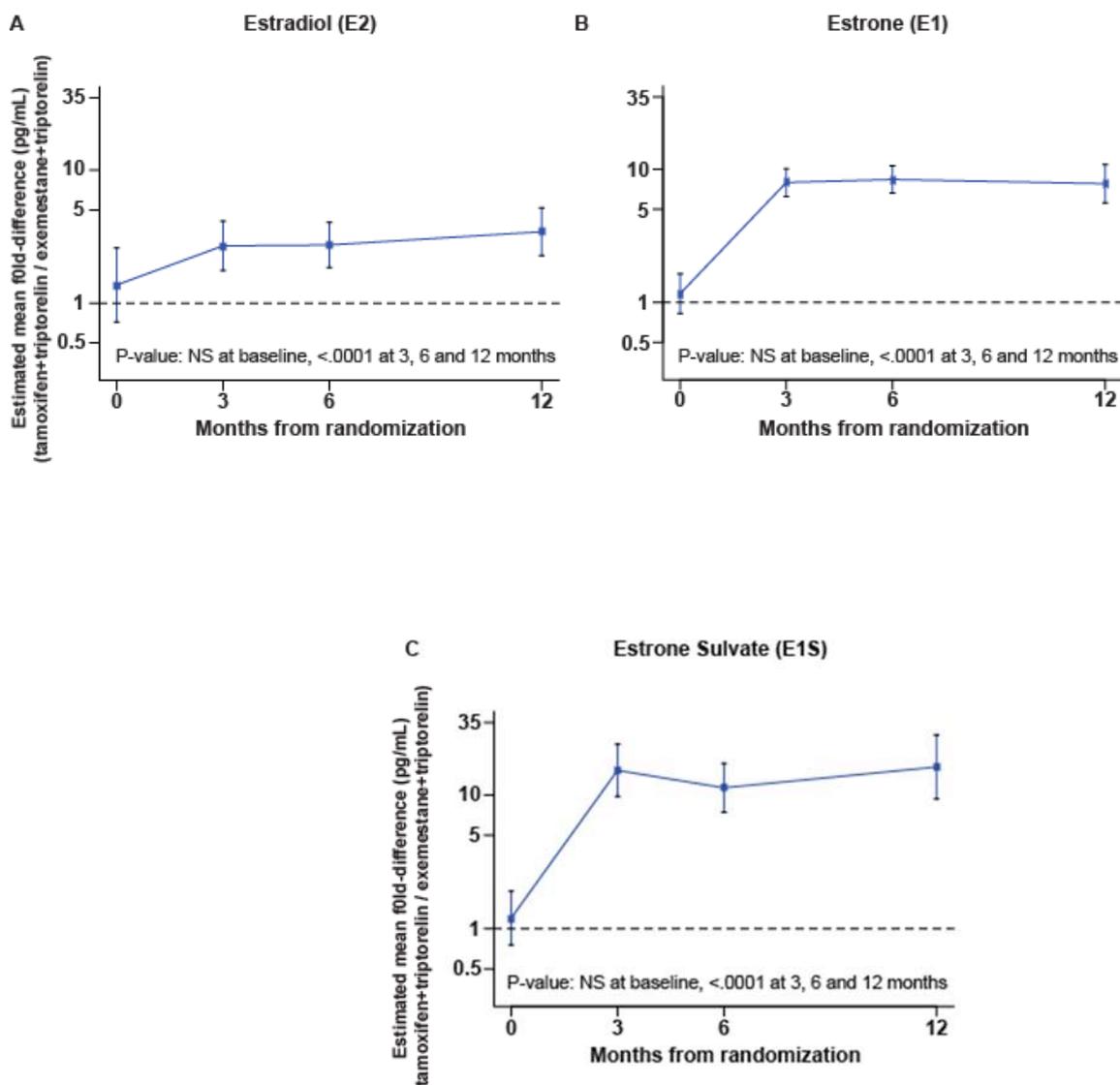
; Antrac.: Antraciclina; C: ciclofosfamida

Como puede observarse en la tabla, se halló que las pacientes con supresión estrogénica subóptima en al menos una muestra durante el tratamiento tenían valores inferiores de FSH y LH a nivel basal ($p=0.002$ y $p=0.004$, respectivamente), tenían mayor IMC ($p=0.054$) y menos probabilidad de haber recibido QT ($p=0.06$). La edad y el estado menstrual a la randomización, así como los niveles basales de estrógenos no se asociaron con una mayor posibilidad de supresión estrogénica subóptima bajo tratamiento con exemestano+triptorelina.

5.2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÓGENOS ENTRE GRUPOS DE TRATAMIENTO

La comparación de los niveles de estrógenos entre grupos de tratamiento, tanto por GEE como por Test de Wilcoxon arrojó idénticos resultados. Así, los niveles de E1, E2 y E1S fueron mayores en el grupo de tamoxifeno+triptorelina con respecto a las pacientes que recibieron exemestano+triptorelina, con una diferencia estadísticamente significativa para todos los puntos de tiempo post-basales ($p<0.0001$ a los 3, 6 y 12 meses con ambos métodos estadísticos). Los resultados obtenidos mediante GEE vienen representados gráficamente en la Figura 42. Los gráficos obtenidos mediante Test de Wilcoxon fueron superponibles.

Figura 42. Media estimada de la diferencia en número de veces entre grupos de tratamiento (tamoxifeno+triptorelina vs exemestano+triptorelina) para cada estrógeno en función del tiempo.

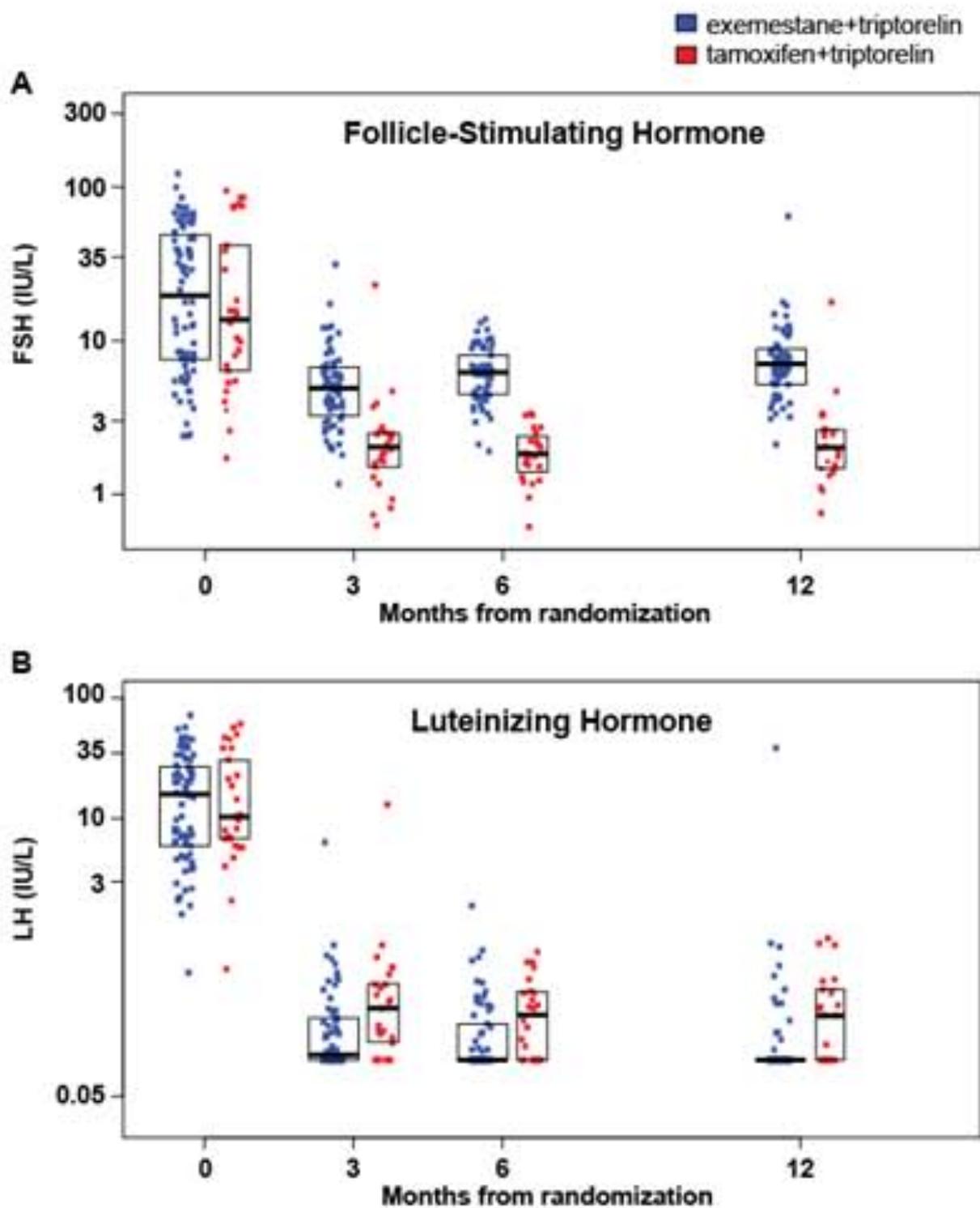


Los niveles hormonales transformados logarítmicamente (logaritmo de base 10) se analizaron utilizando el modelo de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE) en función del punto de tiempo, tratamiento asignado, interacción tratamiento-tiempo y características de las pacientes. Se representa la media de veces de diferencia con 95% de intervalo de confianza; la línea discontinua horizontal con valor 1 en ordenadas indica no diferencia.

5.3. NIVELES DE FSH AND LH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y DEL TRATAMIENTO ASIGNADO

En ambos grupos de tratamiento los niveles de FSH y LH experimentaron una marcada reducción tras el inicio de la medicación asignada por randomización (exemestano+triptorelina vs tamoxifeno+triptorelina). La evolución de los valores de ambas gonadotropinas se representa en la figura 38. Como puede observarse en dicha figura, la mediana de los valores de FSH fue mayor en el grupo que recibió exemestano+triptorelina en comparación con el grupo que recibió tamoxifeno+triptorelina, con unas diferencias estadísticamente significativas a lo largo del primer año de tratamiento ($p < 0.0001$ para cada punto de tiempo post-basal). Contrariamente, los valores de LH fueron persistentemente más bajos ($p \leq 0.01$ en cada punto de tiempo post-basal) en el grupo que recibió exemestano+triptorelina respecto al grupo tratado con tamoxifeno+triptorelina.

Figura 43. Distribución de la FSH y LH en función del tiempo y tratamiento asignado



5.4. ADHERENCIA AL TRATAMIENTO Y TIEMPO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS CON RESPECTO A LAS INYECCIONES DE TRIPTORELINA

La adherencia al tratamiento asignado se comprobó en cada visita. En los centros participantes en el estudio SOFT se suministró a la paciente un diario de medicación en el que poder anotar las fechas de inyección de triptorelina. Asimismo, en cada visita las pacientes eran preguntadas por el cumplimiento de la medicación oral y, en lo posible, por el número de dosis omitidas.

Considerando las 106 pacientes con al menos una muestra post-basal en el primer año de análisis, la mediana de duración del tratamiento con triptorelina fue de 12 meses. Las inyecciones de triptorelina se discontinuaron antes del año en 8 pacientes; estas 8 mujeres recibieron las inyecciones de triptorelina según el calendario previsto hasta el momento de su discontinuación, interrumpieron al mismo tiempo la medicación oral y fueron incluidas en el análisis de niveles hormonales. Por lo que respecta a las 98 pacientes restantes, no se comunicaron omisiones de ninguna inyección. Siete pacientes adicionales interrumpieron exemestano pero continuaron con triptorelina. Para las restantes 91 pacientes no hubo indicios de no-adherencia con el tratamiento oral asignado. Los niveles hormonales post-basales de las 15 pacientes que discontinuaron algún tratamiento de forma precoz se describen en las Tablas 49a y 49b.

Se analizó asimismo el intervalo de tiempo entre la extracción de la muestra de sangre y la última inyección de triptorelina, ya que dicho intervalo podría teóricamente influir en los niveles hormonales. Respecto a este punto, se dispuso de datos precisos en aproximadamente el 75% de pacientes. Se calculó la duración del intervalo para cada muestra obtenida. En la Tabla 50 se resume esta información agrupada por intervalos en los pacientes con datos completos. En ella puede observarse que, en la mayoría de pacientes-puntos de tiempo, la muestra se extrajo en un intervalo menor o igual a 27 días. Por otro lado, también puede apreciarse que, en aproximadamente un 15% de pacientes dicho intervalo fue ≥ 30

días, lo cual indica que en algunos casos las inyecciones no se administraron según el período ventana protocolizado de 28 ± 3 días.

Tabla 49a. Exemestano+Triptorelina: Pacientes que discontinuaron precozmente el tratamiento asignado (N=10). Mediana de tiempo de adherencia a los tratamientos. Niveles de E2 e intervalo de tiempo entre la obtención de muestra de sangre y la última inyección de triptorelina

ID	PT	Intervalo# (días)	E2 (pg/mL)	Duración Exemestano (meses)	Duración Triptorelina (meses)
A1	3	6	41.9	4.4	12
	6			4.4	12
	9			4.4	12
	12	28	3.55*	4.4	12
A2	3	28	0.625	4.2	12
	6			4.2	12
	9			4.2	12
	12			4.2	12
A3	3	28	32.1	8.5	9.2
	6	28	0.625	8.5	9.2
	9	7	0.625	8.5	9.2
A4	3			11.8	12
	6	4	1.03	11.8	12
	9			11.8	12
	12	16	0.715	11.8	12
A5	3	38	0.625	9	12
	6	25	0.625	9	12
	9			9	12
A6	3	23	2.33*	1.2	12
	6	19	2.47*	1.2	12
	9			1.2	12
	12	28	3.57*	1.2	12
A7	3		7.48	0.3	4.3
	6			0.3	4.3
	12		7.38	0.3	4.3
A8	3	31	0.625	7.8	12
	6	29	0.625	7.8	12
	9			7.8	12
	12			7.8	12
A9	3	6	0.625	3.5	3.7
	6			3.5	3.7
A10	3	21	3.95	12	12
	6	14	1.6	12	12
	9			12	12
	12	28	0.625	12	12

PT: punto de tiempo; Intervalo#: Tiempo transcurrido entre última inyección de triptorelina y la obtención de la muestra; *Pacientes en tratamiento con tamoxifeno+ triptorelina en el momento de obtención de la muestra

Tabla 49b: Tamoxifeno+Triptorelina: Pacientes que discontinuaron precozmente el tratamiento asignado (N=5). Mediana de tiempo de adherencia a los tratamientos. Niveles de E2 e intervalo de tiempo entre la obtención de muestra de sangre y la última inyección de triptorelina

ID	PT	Intervalo# (días)	E2	Tamoxifeno (meses)	Triptorelina (meses)
B1	3	26	37.7	11.4	2.8
B2	3	29	1.21	10.6	11.5
	6	35	2.03	10.6	11.5
	9			10.6	11.5
	12	47	1.57	10.6	11.5
B3	3	10	6.78	10.1	11.2
	6	19	6.33	10.1	11.2
	9			10.1	11.2
	12			10.1	11.2
B4	3	6	2.68	4	12
	6	13	2.92	4	12
	9			4	12
	12	108	0.625*	4	12
B5	3		5.35	3	1

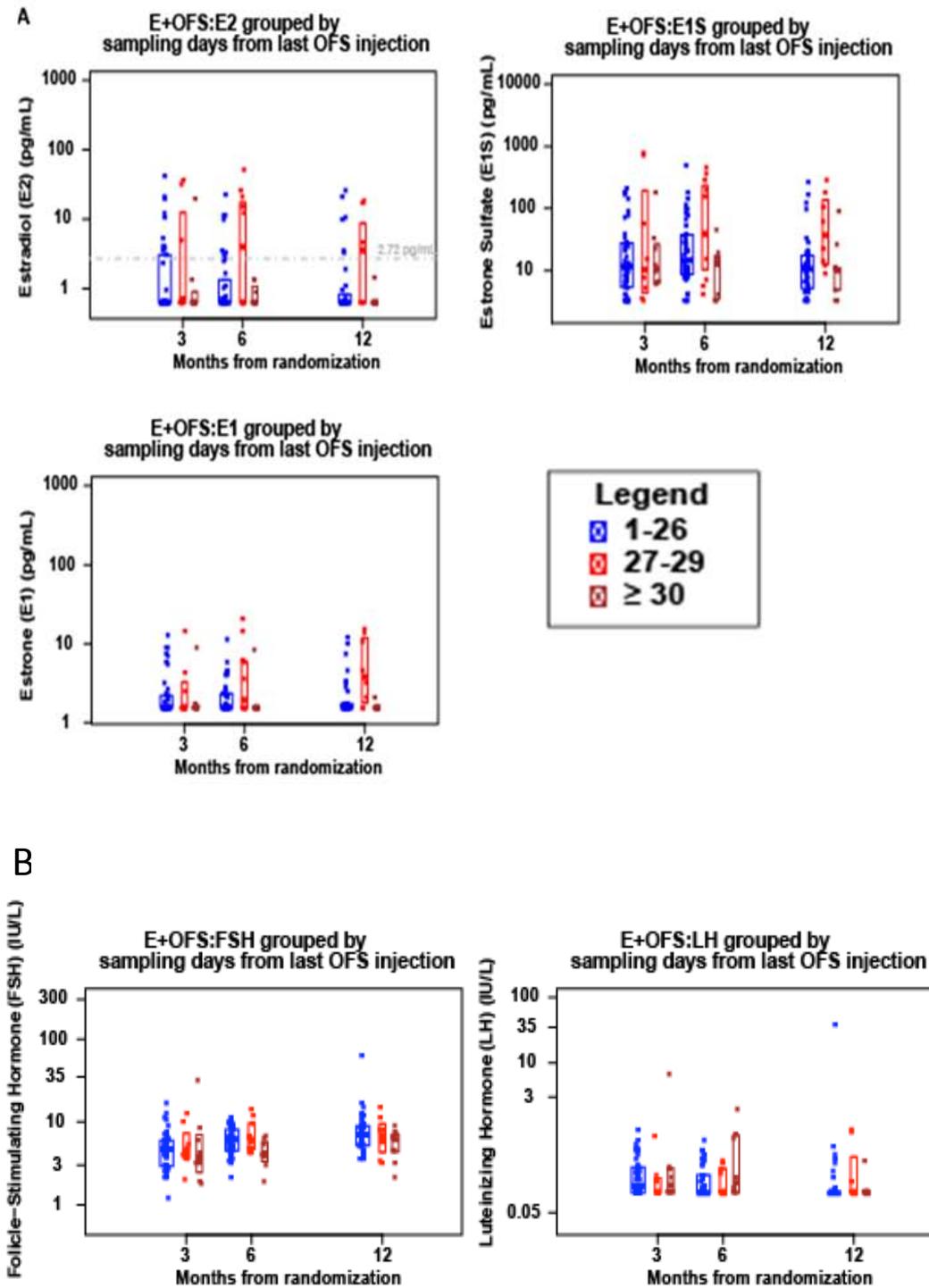
PT: punto de tiempo; Intervalo#: Tiempo transcurrido entre última inyección de triptorelina y la obtención de la muestra; *paciente en tratamiento con triptorelina+IA en el momento de obtención de la muestra

Tabla 50. Número de pacientes agrupados por intervalos de días transcurridos entre la obtención de la muestra y la última inyección de triptorelina (restringido a aquellos pacientes con información completa)

Punto de tiempo	Exemestano+triptorelina Nº pacientes con muestra dentro de los [x] días desde la última inyección de triptorelina			Tamoxifeno+triptorelina Nº pacientes con muestra dentro de los [x] días desde la última inyección de triptorelina		
	[1,27] días	[27,29] días	30+ días	[1,27] días	[27,29] días	30+días
3 m	42	8	9	17	5	2
6 m	43	11	8	19	2	2
12 m	37	8	11	13	1	5

En esta misma línea se estudiaron los niveles de estrógenos y gonadotropinas en función del intervalo entre muestreo y última inyección de triptorelina en el grupo de pacientes tratado con exemestano+triptorelina (ver figura 44 A y B). No se observó un patrón indicativo de mayor variabilidad de niveles hormonales en los puntos de tiempo con intervalos ≥ 30 días desde el último tratamiento con triptorelina

Figuras 44 A y B. Representación de los niveles hormonales en función del intervalo entre extracción de la muestra y última inyección de triptorelina. Panel A: niveles de E2, E1 y E1S. Panel B: niveles de FSH y LH



6 **Discusión**

6. DISCUSION

6.1 NIVELES DE ESTRÓGENOS POST-BASALES EN LOS DOS GRUPOS DE TRATAMIENTO Y PROPORCIÓN DE PACIENTES CON SUPRESIÓN ESTROGÉNICA ÓPTIMA Y SUBÓPTIMA EN LAS PACIENTES TRATADAS CON EXEMESTANO+TRIPTORELINA. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS REALIZADOS EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS

En nuestro estudio el 66% de las mujeres tratadas con exemestano+triptorelina mostraron una supresión profunda y persistente de los niveles de E2 durante los primeros 12 meses de tratamiento. Esta supresión fue mayor que la obtenida con tamoxifeno+triptorelina (el grupo que consideramos como control), alcanzando la significación estadística en todos los puntos de tiempo post-basales (3, 6 y 12 meses).

Debe enfatizarse que la reducción de los niveles de las diferentes fracciones de estrógeno en el grupo que recibió exemestano+triptorelina, en comparación con los valores basales, fue a los 6 meses:

-del 82%, 87% y 86%, respectivamente, para E2, E1 y E1S, si utilizamos como parámetro de referencia el porcentaje de reducción *media*;

- del 90%, 79% y 89%, respectivamente, si hablamos de *media geométrica*

- y $\geq 95\%$ para las 3 fracciones de estrógeno si nos referimos a la *mediana* del porcentaje de reducción con respecto al valor pre-tratamiento (ver Tabla 46).

Es importante tener en cuenta cuál de estos tres parámetros descriptivos se ha utilizado a la hora de comparar estos datos con los publicados previamente en población con menopausia natural y bajo tratamiento con IA. Asimismo, resulta crucial considerar los límites bajos de sensibilidad de los métodos utilizados para interpretar correctamente la literatura previa. Así, Lønning *et al*, en un grupo de 146 mujeres postmenopáusicas tratadas con exemestano, y mediante GC-MS/MS

(mismo método y mismo laboratorio que en nuestro estudio), describió una caída *media* en los niveles de E2, E1 y E1S a los 6 meses del 83%, 93% y 93%, respectivamente, con respecto a sus valores basales [220], porcentajes que resultan numéricamente algo mejores, sobre todo en lo que se refiere a E1 y E1S, a los hallados en nuestra población. Otros investigadores; Geisler *et al*, utilizando un método indirecto (HPLC seguido de RIA) con límites de sensibilidad en línea con los de nuestra técnica, describió una caída, expresada en *media geométrica*, del 92%, 94% y 93% en los niveles de E2, E1 y E1S a las 6-8 semanas, en una serie de 10 pacientes menopáusicas tratadas con exemestano [209], lo que resulta también algo mejor, en cuanto a E1 y E1S se refiere, a lo obtenido en el presente estudio. El mismo autor, en otro estudio posterior, en el que utilizó una técnica mejorada, con límites de detección incluso superiores a la GC-MS/MS de *InVentiv Health*, comunicó reducciones (*media geométrica*) para E2, E1 y E1S del 95%, 98% y 98% en 12 pacientes postmenopáusicas tras 6-12 semanas de tratamiento con letrozol y del 92%, 96% y 95% en 12 mujeres tratadas durante un período similar con anastrozol [212]. El porcentaje de supresión estrogénica con ambos IA parece, por tanto, superior también al hallado por nosotros, y en este caso para las tres fracciones estrogénicas, sobretodo para el grupo tratado con letrozol; sin embargo esta superioridad en supresión con respecto a nuestra serie no fue tan aparente cuando las mismas muestras se analizaron con un método con límites de detección más similares a los de nuestro método. Así, en su artículo de 2002 [210], Geisler comunicó reducciones, siempre en *media geométrica*, del orden del 87%, 84% and 98% con letrozol y del 84%, 81%, and 93% con anastrozol para E2, E1 y E1S. Finalmente, en un estudio que randomizó mujeres sanas a exemestano, letrozol, anastrozol o placebo (20 pacientes por brazo), con el objetivo de estudiar marcadores de resorción ósea, y que utilizó el método indirecto (HPLC seguido de RIA) que usó Geisler *et al* inicialmente, comunicó porcentajes de reducción de E2 y E1 (*mediana*) similares para los tres IA, mientras que los datos de supresión para E1S fueron superiores con letrozol con respecto a anastrozol y exemestano, y comparables entre estos dos últimos [364]. Estos datos se resumen en la Tabla 51. Este estudio tiene como interés adicional ser el único, a nuestro conocimiento, que investiga simultáneamente la supresión estrogénica obtenida con los tres IA de tercera generación disponibles.

Tabla 51. Niveles de estrógenos (E2, E1 y E1 S) y porcentaje de cambio obtenidos con exemestano, letrozol y anastrozol en mujeres voluntarias sanas a las 12 y 24 semanas

Estrogeno	Exemestano (n= 20)	Letrozol (n= 20)	Anastrozol (n= 18)
E1 (pg/mL)			
Basal M (rango)	31 (11, 72)	28 (13, 51)	29 (14, 61)
Semana 12, M (rango)	2.0 (1.8, 10)	1.8 (1.8, 20)	1.8 (1.8, 84)
% reducción respecto basal en semana 12; M (IC 95%)	92.2 (90.7, 93.1)	93.4 (91.9, 94.5)	92.4 (89-93.6)
Semana 24, M (rango)	1.8 (1.8, 63)	1.8 (1.8, 33)	1.8 (1.8, 44)
% reducción respecto basal en semana 24; M (IC 95%)	93.3 (91.9, 94.5)	93.4 (91.9, 94.9)	92.1 (89-92.9)
E2 (pg/mL)			
Basal M (rango)	4.4 (1.1, 13)	4.2 (1.8, 8.6)	3.8 (1.9, 32)
Semana 12, M (rango)	0.70 (0.70, 2.5)	0.70 (0.70, 2.7)	0.70 (0.70, 104)
% reducción respecto basal En semana 12; M (IC 95%)	82 (78, 86)	81 (76, 86)	80 (69-82)
Semana 24, M (rango)	0.70 (0.70, 29)	0.70 (0.70, 7.3)	0.72 (0.70, 84)
% reducción respecto basal en semana 24; M (IC 95%)	81 (78,87)	82 (13, 24)	78 (69,81)
E1S (pg/mL)			
Basal M (rango)	192 (58, 757)	193 (79, 1075)	202 (64, 896)
Semana 12, M (rango)	13 (8.7, 246)	8.7 (6.0, 62)	15 (6.6, 3260)
% reducción respecto basal en semana 12; M (IC 95%)	90.9 (89, 93.9)	95.5 (94, 96.7)	89 (87,93.3)
Semana 24, M (rango)	16 (6.1, 839)	10 (6.0, 254)	18 (8.8, 1440)
% reducción respecto basal en semana 24; M (IC 95%)	89 (87, 92.8)	95.3 (92.8, 97)	90 (80, 91.4)

M = mediana; LLQ para E2= 0.70, para E1=1.8; para E1S. 6.04

Teniendo en cuenta la Tabla 51 y los datos de Geisler *et al*, que utilizaron exemestano y métodos de comparable LLQ se puede afirmar que nuestro porcentaje de reducción estrogénica demostrada expresado en *mediana* es superior a la conseguida a la de la población menopáusica (Tabla 52). Pero siempre debe tenerse

en cuenta que los niveles estrogénicos de los que partíamos en nuestra población eran claramente superiores, mientras que los niveles medianos residuales a los 3 y 6 meses son muy similares y corresponden al LLQ de los métodos utilizados. Sin embargo, si observamos el *rango de E2 residual a los 3 y 6 meses* se hace evidente los valores máximos obtenidos son claramente distintos, aunque debe mencionarse también que en el trabajo de Goss *et al* se excluyeron de los análisis 2 pacientes postmenopáusicas en las que no se demostró adecuada supresión.

Tabla 52. Comparación de la supresión estrogénica obtenida (E1 y E2) en nuestro estudio con la de estudios comparables (mismo IA y LLQ similares) llevados a cabo en pacientes postmenopáusicas

Estrógeno	Goss et al EXE	SOFT EST EXE+Trip	Geisler EXE
E1(pg/mL)			
Basal			
Mediana (M)	31	43.6	NC
Media geométrica (MG)	NC	41	2.41
Rango	(11, 72)	(1.6, 486)	(1.81-3.19)
Primera determinación durante el tratamiento (T1)			
M	2.0	1.6	2.41
Rango	(1.8, 10)	(1.6, 18.6)	(1.81, 3.30)
% reducción M respecto basal en T1	92.2	95	94.9
MG	NC	2.2	2.41
% reducción MG respecto basal en T1	NC	78 (63-97)	94.5 (92.8-95.8)
E2 (pg/mL)			
Basal			
M	4.4	49.9	7.49
MG	NC	12	9.70
Rango	(1.1, 13)	(0.6, 766)	(4.79, 18.68)
Primera determinación durante el tratamiento (T1)			
M	0.70	0.6	0.70
Rango	(0.70, 2.5)	(0.6, 41.9)	(0.70, 1.19)
% reducción M respecto basal en T1	82	96	90.1
MG	NC	0.2	0.76
% reducción MG respecto basal en T1(IC 95%)	NC	88 (81-97)	92 (88.7-94.7)

Tabla 52 (Continuación). Comparación de la supresión estrogénica obtenida (E1S) en nuestro estudio con la de estudios comparables (mismo IA y LLQ similares) llevados a cabo en pacientes postmenopáusicas

Estrógeno	Goss et al EXE	SOFT EST EXE+ Trip	Geisler EXE
E1S (pg/mL)			
Basal			
M	192	784	373.9
MG	NC	710.3	357.7
Rango	(58, 757)	(7.2, 8000)	(179.4, 1490.7)
Primera determinación durante el tratamiento (T1)			
M	13	11.7	18.9
Rango	(8.7, 246)	(3.1, 766)	(11.92, 63.14)
% reducción M respecto basal en T1	90.9	98	80.2
MG	NC	15.4	24.1
% reducción MG respecto basal en T1	NC	90 (85-95)	89 (57-141)

Mismo LLQ para E1, E2 y E1 S en los estudios de *Goss* y *Geisler*

Datos sobre mediana y reducción de mediana calculados a partir de los datos crudos de *Geisler et al*

T1 = 12 semanas en estudio de *Goss et al*, 3 meses en SOFT EST y 6-8 semanas en el estudio de *Geisler et al*

Globalmente, pues, podemos afirmar que la reducción estrogénica observada en nuestro trabajo parece algo inferior si hablamos de *media geométrica* por lo que respecta a E1 y E2, y similar respecto E1S, aunque la reducción en *mediana* de las tres fracciones estrogénicas es similar o incluso mejor a lo comunicado en mujeres post-menopáusicas sometidas a tratamiento con IA. Esta inferior supresión es evidente, ya no en la media, media geométrica o mediana obtenidas, sino en el rango de estos parámetros, observando en nuestra población premenopáusica valores máximos, sobre todo en lo que se refiere a E2 y E1S claramente superiores a lo observado en pacientes con menopausia natural. Ello está en línea con lo reportado por Dowsett *et al*, quien comunicó niveles de E2, E1 y E1S superiores con goserelina y vorozol en mujeres premenopáusicas con respecto a una población paralela, postmenopáusica, en tratamiento con vorozol [358]

En nuestro estudio, además, entre el 81% y 91% de los valores post-basales de E2 estuvieron por debajo del LLQ del método, confirmando, por tanto, que una supresión estrogénica profunda con exemestano es posible en una población premenopáusica en tratamiento con aGnRH. Sin embargo, dichos porcentajes son también inferiores a lo publicado por Santen *et al* [336], utilizando la misma tecnología (GC-MS/MS, *InVentiv Health*) en población post-menopáusica. Así, en esta serie, se comunicaron un 100% de valores post-basales de $E2 < 0.65$ pg/mL en las 55 mujeres postmenopáusicas que recibieron IA (letrozol o atamestano).

En línea con el hecho de que la supresión de E2 con exemestano+triptorelina no siempre alcanzó niveles indetectables, está nuestro hallazgo de que al menos el 17% de las mujeres en tratamiento con exemestano+triptorelina presentaron un nivel de $E2 > 2.72$ pg/mL en cada punto de tiempo. Analizándolo de forma global, 34% de las pacientes asignadas a exemestano+triptorelina presentaron en algún momento un valor de E2 por encima del nivel pre-especificado. La posible relevancia de este hallazgo se comentará en la siguiente Sección.

Finalmente, y considerando ahora, los dos grupos de tratamiento, llama la atención en nuestro estudio los niveles post-basales de E2, E1 y E1S relativamente homogéneos en el brazo que recibió tamoxifeno, en comparación con la gran cantidad de valores *outliers* observada en el grupo que recibió exemestano. Ello viene ilustrado gráficamente en la Figura 38 de la Sección 5.2.3. No queda claro el

motivo de esta observación, aunque puede hipotetizarse que el tamoxifeno ejerce un efecto agonístico sobre la hipófisis en el contexto de niveles bajos circulantes de estrógenos, por lo que minimiza el *feedback* ejercido por los niveles bajos de éstos y de inhibina sobre la FSH, de manera que ésta no tiende a aumentar, a diferencia de lo que ocurre con el IA. Eso es consistente 1) con nuestros hallazgos relativos a la diferente dinámica de la FSH según el grupo de tratamiento (ver también Sección 5.4); 2) con los datos reportados por Dowsett *et al*, quien describió una mayor variabilidad de los niveles de estrógenos en pacientes premenopáusicas en tratamiento con goserelina+vorozol con respecto lo observado en una cohorte paralela de mujeres postmenopáusicas tratadas con vorozol [358] y 3) con la homogeneidad de los niveles de E2 descrita con tamoxifeno+aGnRH en estudios previos [251, 258, 356]

6.2 METODOLOGÍA UTILIZADA Y RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS DINTELES DE SUPRESIÓN SUBÓPTIMA SELECCIONADOS

6.2.1 Metodología utilizada

La determinación de niveles de estrógenos en condiciones como las de nuestro estudio, en la que se esperan valores muy bajos, es técnicamente muy exigente [332]. El uso de GC-MS/MS, un método de referencia [332, 334, 336] con alta especificidad y sensibilidad en este contexto, asegura la precisión de nuestros resultados. La GC-MS/MS se caracteriza por tener uno de los límites de cuantificación más bajos para cada componente estrogénico y ha demostrado no tener reacción cruzada con exemestano [220, 255], una molécula esteroidea muy parecida a E2 que puede interferir con la determinación de éste en muchos de los métodos comercialmente disponibles. A pesar de que la literatura previa avalaba la especificidad de GC-MS/MS con respecto a exemestano, se realizó un experimento *ad hoc* con esta molécula antes de iniciar el trabajo de laboratorio con las muestras del estudio. Dicho experimento corroboró, efectivamente, la ausencia de reacción cruzada.

En relación con la alta especificidad mencionada, se sabe que los valores medios de E2 en mujeres postmenopáusicas medidos mediante GC-MS/MS son más bajos (4.0 a 7.3 pg/mL) [220, 334, 336] que cuando se usan otros métodos directos e indirectos, y lo que es más importante, también son más bajos los valores medios de E2 cuando estas pacientes son tratadas con IA ($E2 < 0.65 \text{ pg/mL}$ en todas las muestras de pacientes tratadas con letrozol o atamestane [336]).

El hecho de haber realizado un perfil hormonal completo, con E2, E1 y E1S da robustez a nuestro estudio, puesto que arroja luz sobre la farmacodinámica de un IA como exemestano: E2, por ser el compuesto con actividad biológica, E1 por ser el principal sustrato de la aromatasa y E1S, por ser la fracción estrogénica más abundante en plasma, y por tanto, la más adecuada para estudiar el grado de supresión estrogénica alcanzado con el IA. Debe destacarse que la realización de un perfil hormonal completo ha sido ocasional en estudios bioquímicos de IA con un número limitado de pacientes (ver Tablas 27 y 28), pero representa un hecho

singular en un estudio en pacientes con CM de carácter longitudinal, internacional y multicéntrico como el que se presenta.

Por último, el hecho de hallar un número elevado de valores de E2 y E1 por debajo del LLQ supuso un reto a la hora de realizar el análisis estadístico, por lo que, en primer lugar se decidió cambiar de modelo y utilizar GEE, y posteriormente abrió un debate con los revisores del manuscrito en el momento de presentar nuestro trabajo para publicación, entendiéndose que no existía un modelo perfecto que solventara esta cuestión, y sobre todo teniendo en cuenta que la distribución sesgada de valores se concentraba en un grupo de tratamiento (exemestano+triptorelina) y no en otro, y tampoco aplicaba a todas las variables analizadas (LH, FSH y E1S no presentaban este problema). Afortunadamente los resultados obtenidos fueron superponibles con GEE y con la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon que se proponía como alternativa, lo cual confirió robustez a nuestros resultados.

6.2.2 Relevancia clínica de los dinteles de supresión subóptima seleccionados.

Dada la alta sensibilidad de GC-MS/MS y los niveles menores de estrógenos obtenidos por este método, seleccionamos prospectivamente un dintel de 2.72 pg/mL para definir la supresión subóptima en pacientes tratadas con exemestano+triptorelina. Ello estaba en línea con estudios previos que, utilizando métodos ultrasensibles, habían escogido punto de corte similares (2.18 or 2.72pg/mL) [206, 283, 284] para definir niveles de E2 no consistentes con estado menopáusico y tratamiento con IA

Dada la escasez de datos clínicos que avalaran este punto de corte, y al igual que se había hecho en otros trabajos [283, 284], se decidió explorar 2 *cut-offs* adicionales menos exigentes, 10 pg/mL como *dintel claramente inconsistente con niveles de post-menopausia en tratamiento con IA*; y 20 pg/mL, como punto de corte *inconsistente con estado menopáusico secundario a tratamiento con aGnRH*. Se halló, entonces que 18 % y 13% de las pacientes tenían niveles de E2 >10 and >20 pg/mL, respectivamente, al menos una vez durante el período de 12 meses estudiado. En estas pacientes con niveles sustancialmente elevados de E2, el tratamiento con exemestano+triptorelina podría tener mayor relevancia clínica e

hipotéticamente relacionarse con una mayor tasa de recidivas. Afortunadamente, en la mayoría de casos, se trató de elevaciones de E2 no persistentes, ya que sólo 6 (8%) y 1 (1%) de estas mujeres tuvieron elevaciones de E2 por encima de estos 2 *cut-offs*, respectivamente, en más de un punto de tiempo post-basal (Tablas 53a y 53b).

Para interpretar la idoneidad de los puntos de corte seleccionados nos referiremos tanto a los resultados clínicos de los estudios que han enfrentado diferentes IA, de los que sabemos existen diferencias farmacodinámicas en el grado de supresión estrogénica obtenido como a los trabajos que han investigado prospectivamente la recuperación de la función ovárica en pacientes con amenorrea quimioinducida.

6.2.2.1. Datos derivados de estudios randomizados que enfrentan IA de 3ª generación en el contexto menopáusico

Tal y como se ha comentado previamente se han descrito pequeñas diferencias en el grado de inhibición de la aromatasa y en la supresión estrogénica asociada a distintos IA (Secciones 1.4.2.3 y 6.1). Sin embargo, dichas diferencias podrían no traducirse en una superioridad clara a nivel clínico. A continuación se revisan los datos derivados de estudios randomizados que han comparado directamente diferentes IA, de cara a poder analizar este punto.

Así, por ejemplo, sabemos que letrozol se relaciona con una mayor supresión estrogénica que anastrozol [212, 213, 364], mientras que la potencia supresiva de éste es similar a la observada con exemestano [364]. *En el contexto metastásico* letrozol y anastrozol se compararon un estudio fase III abierto en segunda línea hormonal que incluyó 713 pacientes postmenopáusicas RH+ o desconocidos, con el objetivo primario de TTP [365]. Se observó una mayor TR con letrozol (19.1% vs 12.3%, $p= 0.013$) en el grupo global de pacientes, en el subgrupo de mujeres con tumores RH desconocidos y en el subgrupo con enfermedad de partes blandas. Sin embargo la TR fue similar en el subgrupo (48%) de pacientes con RH+ y, sobre todo, el TTP y SG. El estudio debe considerarse negativo puesto que no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en el objetivo primario, aunque puso de manifiesto datos de mayor actividad en determinados subgrupos de pacientes. Un segundo estudio fase II randomizado llevado a cabo en 128 pacientes con

enfermedad avanzada y RH+ enfrentó exemestano y anastrozol a la progresión a antiestrógenos, con el objetivo primario de TR en enfermedad visceral y tampoco evidenció diferencias en eficacia [366]. *En el contexto adyuvante* debe señalarse que el estudio BIG 1.98 ha demostrado una mejoría en SG con letrozol frente a tamoxifeno (Ver también Sección 1.6), mientras que anastrozol no ha podido demostrar dicho beneficio relativo en el estudio ATAC. Sin embargo, ambos IA se han enfrentado directamente en el estudio adyuvante *Femara versus Anastrozole Clinical Evaluation* (FACE), que ha comparado 5 años de letrozol con 5 años de anastrozol y con 86 meses de mediana de seguimiento no se han observado diferencias [305]. Un segundo estudio adyuvante, el MA.27, randomizó 7576 pacientes a recibir exemestano o anastrozol durante 5 años, y ha demostrado igualmente una SLE similar a 4 años, sin diferencias en toxicidad, a excepción de menor riesgo de osteoporosis en el grupo que recibió anastrozol. Finalmente, *en el contexto neoadyuvante* el estudio fase II randomizado ACOSOG Z1031 [367] ha enfrentado los tres IA de tercera generación en un tratamiento que duró de 16 a 18 semanas, con el objetivo primario de TR clínicas, por palpación. El estudio no halló diferencias para los tres compuestos en cuanto a tasa de cirugía conservadora, y distribución de PEPI score, aunque la tasa de respuestas clínicas por palpación con exemestano fue numéricamente inferior (62.9% vs 74.8% con letrozol y 69.1% con anastrozol (ver Tabla 53 y Figura 47). Se describió un porcentaje de cambio de Ki67 numéricamente mayor con letrozol, que no llegó a alcanzar la significación estadística.

Globalmente, pues, puede decirse que no existen diferencias en eficacia clínicamente relevantes entre los tres IA de tercera generación en la mayoría de situaciones clínicas, indicando que, a partir de un determinado nivel de supresión estrogénica, una mayor profundización de ésta no tiene porqué ser mejor desde un punto de vista clínico. Ello podría llevarnos a pensar, en relación a nuestro estudio, que una supresión muy profunda como la exigida por el dintel pre-especificado tampoco tendría porqué traducirse en una menor eficacia o una mayor probabilidad de recidiva en este caso. Sin embargo, debe comentarse que en población postmenopáusica la mediana del nivel residual con los IA de 3º generación menos potentes, anastrozol o exemestano, está en 0.70 pg/mL con exemestano [210, 364]

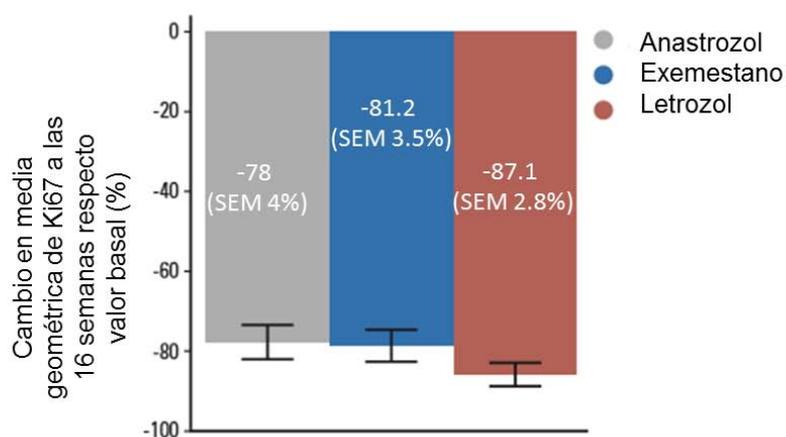
y 0.73 con anastrozol [213], por tanto nuestro dintel de 2.72 pg/mL representa más de 3.5 veces el nivel mediano residual esperado con estos compuestos.

Tabla 53. Porcentaje de respuestas con exemestano, letrozol o anastrozol en el estudio neoadyuvante ACOSG Z1031[367]

	Exemestano (n=124)	Letrozol (N=127)	Anastrozol (N=123)
Respuesta clínica a la semana 16 (%)			
Respuesta completa	21.8	21.3	17.9
Respuesta Parcial	41.1	53.5	51.2
Sin cambios	22.6	15.7	16.3
Progresión	6.5	4.7	7.3
Discontinuación tto por toxicidad/rechazo	4.0	2.4	1.6
No medido	4.0	2.4	5.7
TR (ITT), % y rango	62.9 (53.8-71.4)	74.8 (66.3-82.1)	69.1 (60.1-77.1)

TR. Tasa de respuestas; ITT: análisis por intención de tratamiento

Figura 45. Porcentaje de cambio en Ki67 a las 16 semanas con exemestano, anastrozol o letrozol en el estudio ACOSOG 1031



SEM: *standard error of mean*

6.2.2.2 Datos derivados de estudios que investigan la recuperación de la función ovárica en pacientes con CM y amenorrea inducida por QT adyuvante

Los estudios que han investigado uno o varios puntos de corte [283, 284] se han llevado a cabo en un escenario diferente al nuestro, el de pacientes inicialmente premenopáusicas que, con la QT (neo) adyuvante, desarrollaron amenorrea quimioinducida y perfil hormonal compatible con postmenopausa (Ver también Sección 1.5.3). Estas mujeres iban a recibir IA adyuvante, ya fuera de entrada o tras 2 años de tratamiento con tamoxifeno. El objetivo de estos trabajos era averiguar la proporción de pacientes en la que existía RFO durante el tratamiento con el IA. En la Tabla 54 se describe ahora el dintel especificado para definir dicha recuperación en curso de IA.

El estudio de Smith *et al* [206] es el que definió 10 pmol/L (2.72 pg/mL) como punto de corte de E2 por encima del cual se establecía el no funcionamiento óptimo del IA, y fue en base a este dato que se especificó el dintel para el objetivo primario del estudio SOFT-EST. Los autores utilizaron un método indirecto ultrasensible, con un LLQ de 3 pmol/L (0.81 pg/mL) y comentaron que, con él, se esperaban niveles menores de 5 pmol/L en pacientes con menopausia natural sometidas a tratamiento con IA, por lo que hallar niveles de E2 por encima de 10 pmol/L no era consistente con una supresión estrogénica óptima. Se demostraron niveles de E2 en el rango de la premenopausia en 8 de las 12 pacientes con signos clínicos de RFO, pero en este caso la mediana y rango de los niveles de E2 (68.6 pg/mL y 112.8-125.57 pg/mL) fueron sustancialmente más elevados que los 2.72 pg/mL propuestos por los autores. En este caso no se describieron pacientes que continuaran clínicamente menopáusicas, pero que presentaran recuperación ovárica bioquímica.

En el segundo estudio [284] presentado en la Tabla 56, los autores utilizaron simultáneamente 2 métodos de medida, uno indirecto y otro directo, con límites de sensibilidad para E2 muy distintos, de 0.82 pg/mL y 19.9 pg/mL, respectivamente. Los autores definieron los *niveles de E2 inconsistentes con estado de menopausia y tratamiento con IA* fueron de 44.9 pg/mL con el método indirecto y de 2.17 pg/mL con el segundo (similar a nuestro dintel pre-especificado), además de niveles de FSH en el rango de la premenopausia (>26 IU/l). Se estableció, además más un *cut-off* de 15

pg/mL y de 60 pg/mL (método indirecto y directo, respectivamente) para definir niveles de E2 claramente inconsistentes con estado de menopausia e IA. La definición de la RFO, pues, fue estrictamente bioquímica, a diferencia de la del estudio de Smith *et al.* Tal y como puede observarse en la Figura 46, los niveles de E2 obtenidos por cada método a los 1, 3 y 6 meses, fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$ en los 3 puntos de tiempo) e incluso los niveles basales tendieron a ser diferentes ($p = 0.08$). De forma interesante, ya con el dintel más exigente, que fue similar al definido por nosotros para nuestro objetivo primario, se describió una peor SLE a 2 años [HR 9.3 (95% IC 3.3–48.0); $p = 0.04$] en las pacientes con RFO. Este dato, que se ilustra en la Figura 45. es el único comunicado que relaciona supresión subóptima con pronóstico y el único, a nuestro entender, que confiere relevancia clínica a un dintel de esta magnitud. La mediana de niveles hallados de E2 (método indirecto) en las pacientes con RFO fue de 11.87 pg/mL (IC95% 2.48-21.30) y, fue, significativamente mayor que en el grupo sin RFO (1.57 pg/mL; IC 95% 1.23-1.90) $p = 0.001$).

Figura 46. SLE en función de la RFO en pacientes con amenorrea quimioinducida que reciben tratamiento con exemestano (Seguimiento medio 30 meses, análisis univariado)[284]

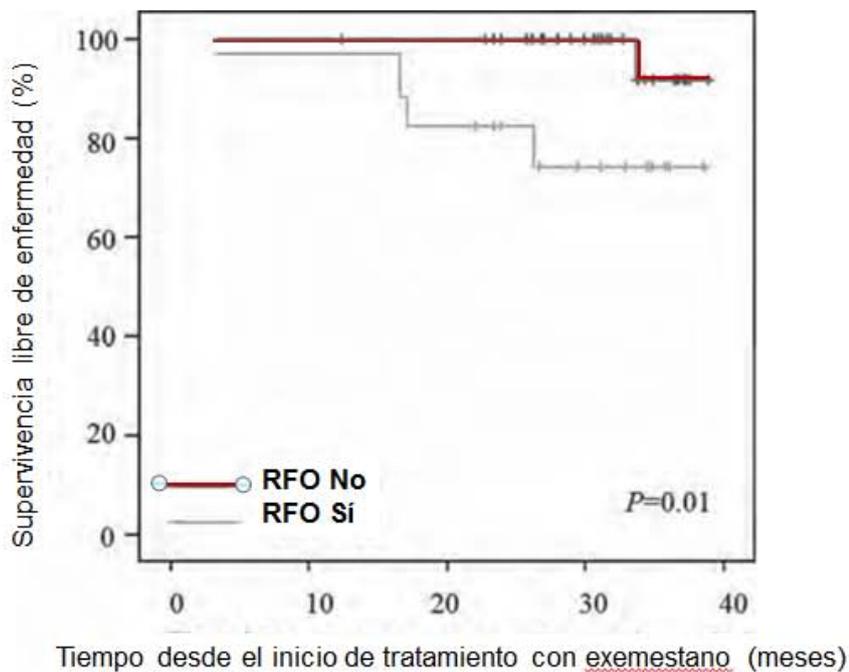
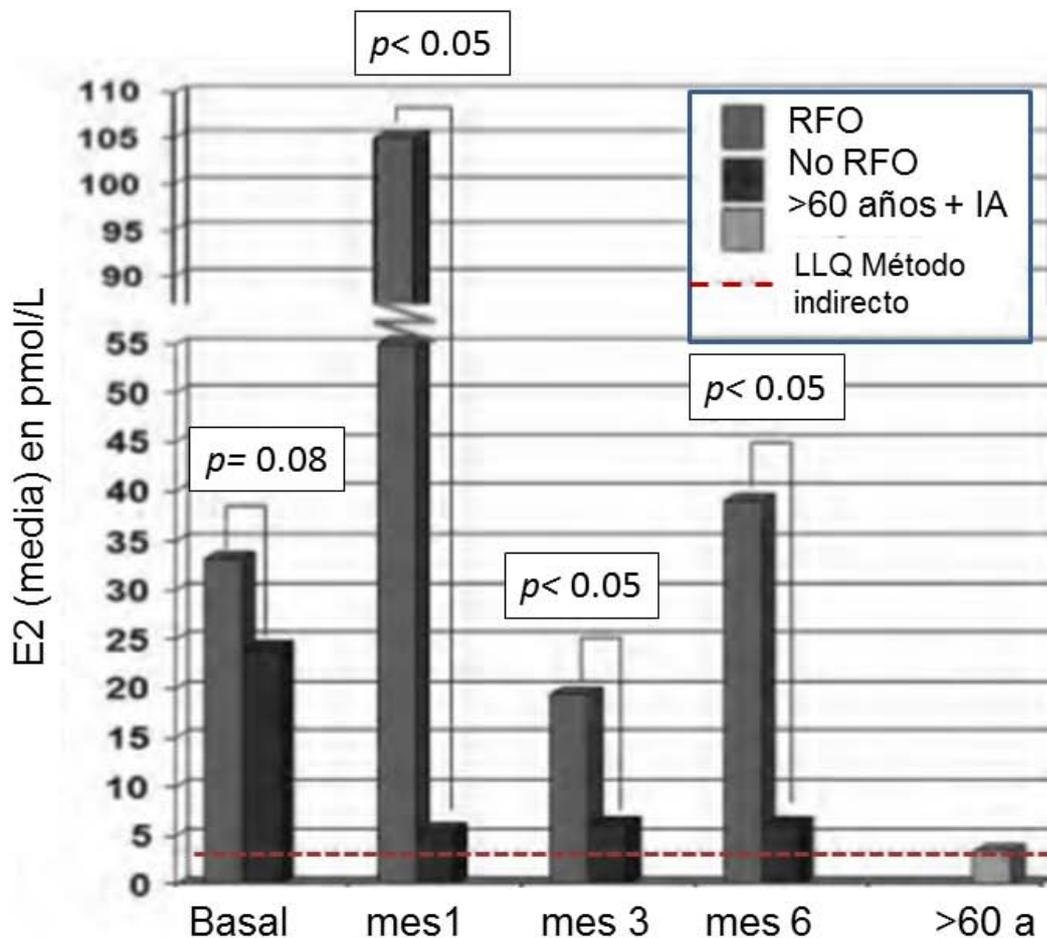


Figura 47. Niveles de E2 (pmol/L) basales y durante el tratamiento en las pacientes con amenorrea quimioinducida que hicieron el cambio a tratamiento con exemestano.



Nótese las diferencias significativas obtenidas con 2 diferentes métodos (directo e indirecto) con LLQ muy diferentes. Para su mejor comparación se ha añadido un brazo control de mujeres postmenopáusicas tratadas con exemestano y analizadas mediante el método indirecto [284]

Tabla 54. Estudios que investigaron la recuperación de la función ovárica (RFO) en mujeres con amenorrea quimioinducida. Características del método utilizado y *cut-offs* utilizados en la defición de RFO

Autor, Población y N	Método y Resultados
<p>Smith [206]</p> <p>Pts ≥40 RE+ y con AQI y tratamiento con IA (A, L o E) Identificadas a través base de datos, algunas de ellas ya dx De RFO</p> <p>Edad (M) 47 años (rango 39 a 52)</p> <p>N=45</p>	<p>Método ultrasensible, con LLQ 3 pmol/L =0.82 pg/mL * Dintel de postmenopausa < 60 pmol/L= 16.34 pg/mL Niveles esperados en postmenopausia + IA : <5 pmol/L=1.36 pg/mL</p> <p>10 pts recuperaron menstruaciones +1 embarazo sin menstruación previa+1 pt niveles de E2 >1500 pmol/L sin menstruaciones y descenso sofocos ⇒RFO clínica 12/45: 27%</p> <p>8 pts de las 12 con RFO clínica también recuperación de E2: mediana 252 pmol/L (=68.6 pg/mL) rango 47-461 pmol/L (112.8-125.57 pg/mL) 9 de 12 pts con RFO clínica tratadas con T previo (vs 25 de 49 pts de la cohorte inicial)</p> <p>Define > 10 pmol/L (2.72 pg/mL) como <i>cut-off</i> de no supresión óptima usando métodos ultrasensibles</p>
<p>Guerrero [284]</p> <p>Pts consecutivos RE+ y con AQI n 2a previos de T adyuvante y niveles de E2 en el rango postmenopáusico en el momento de cambiar a E adyuvante</p> <p>N=53</p>	<p>Dos métodos simultáneos Directo: MEIA, LLQ 19.9 pg/mmL Indirecto: RIA precedido de purificación: LLQ 0.82 pg/mL</p> <p>Definición RFO bioquímica: -E2 inconsistente con post-menopausia + IA:: Con MEIA: 45 pg/mL, Con RIA: 2.17 pg/mL -E2 claramente inconsistente con post-menopausia + IA: Con MEIA: 60 pg/mL Con RIA: 15 pg/mL Ambos métodos (D e I) mostraron similar RFO :32 vs 30% y tiempo (M) a RFO 5.4 vs 6 m Peor SLE en pts con RFO (RIA)</p>
<p>Henry [283]</p> <p>Pacientes con >8 s de AQI ≤ 57 a en e momento de iniciar anastrozol con niveles de E2 <20 pg /mL antes de iniciar anastrozol</p> <p>N=45</p>	<p>Método: LC-MSMS (LLQ 2 pg/mL) Definición RFO inicial: >10 pg/mL Definición RFO tras modificación: recuperación reglas y/o E2 >30 pg/mL a 48s Con definición inicial 8 de 14 pts (57%) con RFO. Se consideró atribuible a variabilidad del método más que averdadera RFO Tras modificación, 13 de 45 (29%) con RFO 10 pacientes presentaron sangrado vaginal, demostrándose niveles de E2 elevados sólo en 3 de ellas</p>

Krekow [285]

Pacientes 40 a 49a
Tto previa con QT que
incluyera CFM
N =173

“ 2 laboratorios diferentes
Método NC
LLQ 3 pg/mL, inferido de valores presentados
RFO 39%
6% recuperaron menstruaciones
Tiempo (M) a RFO: 8.8m

MEIA: *microparticle enzym immunoassay*; RIA: *Radioimmunoassay*

*Probablemente se utilizó el mismo RIA indirecto que en el estudio de Guerrero *et al*, al tratarse de los mismos investigadores, mismo hospital (Royal Marsden, Londres, Reino Unido) mismo LLQ, pero no se especifica en el artículo

1 pg/mL = 3.671 pmol/L

AQI: amenorrea quiminducida; T: tamoxifeno

El tercero de estos trabajos, el de Henry *et al*, no utilizó *a priori* dos puntos de corte, sino que modificó el inicialmente pre-especificado de 10 pg/mL, al considerar que el nivel de RFO obtenido con esta defición (57%) en las primeras 14 pacientes incluidas era desproporcionalmente elevada, lo que atribuyó a variabilidad de método utilizado (LC-MSMS). Se sugirió entonces que el *cut-off* >30 pg/mL sería más clínicamente relevante, aunque, en realidad, no hubo una demostración clara de este hecho [283].

Evidentemente la existencia de sangrado vaginal podría parecer un *end-point* más potente que un mero dintel de E2; ello es así en lo que se refiere a recuperación de menstruaciones regulares, pero no aplica necesariamente a todos los sangrados vaginales puntuales, que pueden acontecer en presencia de miomatosis o incluso en presencia de procesos malignos endometriales. En nuestro caso (ver Sección 5.2.4.2) únicamente 2 pacientes presentaron sangrado vaginal, pero sólo pudo demostrarse centralmente niveles de E2 en el rango premenopáusico en una de ellas; en el otro caso se dispuso de una muestra local más cercana al momento del sangrado, que describía niveles de E2 también en el rango de la premenopausia. Este hallazgo no puede catalogarse de concluyente, ya que desconocemos la especificidad de la técnica utilizada por el laboratorio local.

Nuestros hallazgos son consistentes a lo reportado en los estudios previos mencionados: así, en el estudio de Henry *et al* se observó sangrado vaginal en 10 pacientes, pero sólo en 3 de ellas pudo demostrarse niveles de E2 en el rango de la premenopausa; las 7 pacientes restantes, que mostraron niveles de FSH y E2 en el rango postmenopáusico en el momento del sangrado, continuaron en el estudio, sin demostrarse tampoco RFO en los controles posteriores. En el trabajo de Krekow *et*

al, en cambio, 6% de las pacientes recuperaron menstruaciones (19% en el grupo de 40 a 44 años, y 4% en el grupo de 45 a 49 años), ya no pérdidas puntuales, por lo que se infieren en ellas niveles estrógenicos consistentes con premenopausia, aún sin verlo especificado en el trabajo. Resulta razonable pensar que en estas pacientes podría existir un pronóstico peor incluso que en pacientes sólo con definición bioquímica, aunque por otro lado la evidencia clínica de la RFO puede determinar en ellas un menor tiempo de tratamiento inefectivo con IA, con lo que podría minimizarse el impacto pronóstico de esta supresión subóptima con respecto a las pacientes sin RFO clínica. En cualquier caso ningún trabajo analiza específicamente la población con RFO clínica de forma aislada. Sin embargo, en la serie de Guerrero *et al*, que es la única que relaciona la RFO con el pronóstico, se basa en datos bioquímicos, destaca que en el 70% de las pacientes con

RFO el primer evento observado fue la recuperación de menstruaciones, por lo que la mayoría del impacto pronóstico parece vehiculado por un subgrupo de pacientes con una recuperación estrogénica franca.

6.3 COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS EN PACIENTES PREMENOPÁUSICAS

6.3.1 En el contexto adyuvante/neoadyuvante

En el contexto adyuvante la primera descripción de supresión subóptima con aGnRH, en este caso en monoterapia, data de 2007, con la publicación del estudio TABLE (ver también Sección 1.4.4, Tabla 23). En este estudio aproximadamente 600 pacientes fueron randomizadas a tratamiento adyuvante con CMF vs leuprorelina trimestral durante 2 años, y se determinaron niveles de E2 de forma local y, por tanto con diferentes métodos, probablemente poco sensibles, en el brazo de tratamiento que recibió el aGnRH (N=294). En este último grupo, de forma interesante, se comunicó la existencia de un 10.4% de mujeres con supresión estrogénica subóptima, definida ésta como niveles de E2 >30 pg/mL en 2 determinaciones consecutivas. Aun con sus limitaciones metodológicas, esta observación constituyó uno de los puntos de partida de nuestro estudio, y de hecho, ya en el diseño de éste, hipotetizamos sobre la existencia de una proporción similar de pacientes (10%) con supresión subóptima con exemestano+triptorelina. En la base de esta hipótesis radica un efecto insuficiente del aGnRH, como se describe en el estudio TABLE, y por tanto, la existencia de una función ovárica residual, que implicará que el IA tampoco pueda funcionar de forma completa.

Más similar a nuestro trabajo, sin embargo, es el estudio HOBEO, publicado posteriormente, en 2008 [265]. En este estudio fase III, también llevado a cabo en el contexto adyuvante, las pacientes premenopáusicas fueron randomizadas a recibir letrozol+triptorelina o tamoxifeno+triptorelina, y se determinaron los niveles hormonales de forma basal y a los 6 meses de tratamiento (Véase Tabla 55).

Al igual que en nuestro trabajo, la mediana de los valores de E2 fue menor en el grupo que recibió el IA en comparación con el grupo asignado a tamoxifeno. La evolución de los valores de gonadotropinas fue también consistente con nuestras observaciones. Así, en ambos grupos de tratamiento se objetivó una disminución en la mediana de los niveles de FSH y LH con respecto al valor basal, pero con

dinámicas diferentes entre ambos brazos, de manera que a los 6 meses los niveles de LH fueron significativamente inferiores, y los niveles de FSH significativamente superiores, en las mujeres que recibieron letrozol en comparación con el grupo que recibió tamoxifeno. Esta evolución de los niveles de FSH y LH es consecuencia de varios factores: por una parte, del efecto directo supresivo derivado de la estimulación prolongada del aGnRH; por otro lado, de la caída de E2 (más profunda con IA que con tamoxifeno) y el consiguiente cese de la retroalimentación negativa asociada a E2, así como de la diferente sensibilidad a este feedback de FSH y LH (FSH más sensible); y por último, del efecto directo del tamoxifeno sobre la hipófisis, que es predominantemente agonístico en un microambiente pobre en estrógenos [347].

Tabla 55. Niveles hormonales basales y tras 6 meses de tratamiento en las pacientes premenopáusicas incluidas en el estudio HOBOE [265]

	T +Trip		L +Trip		P
	M	Rango	M	Rango	
E2					
Basal	12.4	<5-157.8	14.0	<5-775.5m	NC
6 meses	7.95	5-43.9	5	5-24.5	.0008
LH					
Basal	39.5	4.3-62.2	33.4	11-112.4	NC
6 meses	0.3	0.1-1.2	0.2	0.1-46.2	.0005
FSH					
Basal	63.9	3.7-117.7	59.9	3.3-125.9	NC
6meses	2.65	0.9-26.5	10.8	2.2-99.7	.0001

T: tamoxifeno; Trip: triptorelina; L: letrozol; NC: no comunicado

Aparte del IA utilizado, el estudio HOBOE difiere del subestudio SOFT-EST en diferentes puntos. El estudio HOBOE se desarrolló en un único centro, el estado menopáusico se determinó previamente a la QT adyuvante -si las pacientes eran candidatas a recibirla-, y no tras ella, como en nuestro caso, y sólo se determinó un punto de tiempo post-basal en las 81 pacientes randomizadas (51 a letrozol+triptorelina; 30 a tamoxifeno+triptorelina). El objetivo principal fue comparar los efectos endocrinos entre ambos tratamientos, incluyendo la función suprarrenal, pero no explorar la posible existencia de una supresión estrogénica subóptima en el grupo de letrozol-triptorelina. Además, se utilizó un método de determinación de E2

(electroquimioluminiscencia) mucho menos sensible (LLQ = 5pg/mL) y no se estudió E1 ni E1S.

En este mismo contexto adyuvante debemos mencionar también los datos endocrinos del estudio ABCSG-12, un estudio fase III que randomizó 1803 mujeres a recibir goserelina con anastrozol o tamoxifeno x 3 años, y ello con o sin ácido zoledrónico, en un diseño 2x2 factorial (Ver también Sección 1.7.2.3). Más allá de sus resultados clínicos (similar SLE para ambos grupos de tratamiento pero peor SG para el grupo tratado con goserelina+anastrozol; mejor SLE, sin impacto en SG con ácido zoledrónico [368]), es interesante comentar sus resultados en cuanto a la determinación de FSH [369], determinación que se llevó a cabo en aproximadamente 500 pacientes. Así, los autores comunicaron unos niveles medios de FSH algo inferiores (14.4 mIU/mL) a los hallados en nuestro subestudio (29.8 mIU/mL), pero la evolución de estos niveles fue consistente con lo descrito en los estudios HOBOE y SOFT-EST: disminución de FSH en ambos brazos, pero supresión menos evidente en el grupo tratado con anastrozol. Los autores describieron que valores de FSH durante el tratamiento (no pre-tratamiento) por encima de la media (4.87mUI/ml) tendían a relacionarse con un peor pronóstico (HR SLE 1.347, $p=0.18$; HR SLED 1.939; $p=0.035$; HR SG 2.208, $p=0.096$, ver también Figura 40). El estudio tiene limitaciones metodológicas importantes, a saber: la FSH fue determinada localmente, en unos tiempos no claramente establecidos (de forma basal, durante el tratamiento y al finalizarlo) y, lo que es más importante, los 2 brazos de tratamiento se analizaron conjuntamente, pese a relacionarse con dinámicas de la FSH claramente diferentes. Además, el análisis se basó en un número limitado de eventos (42 eventos de SLED y 19 de SG considerando ambos brazos de tratamiento). Pese a estas limitaciones, y dada la dificultad ya comentada de disponer de métodos precisos para la determinación de estrógenos, la observación de que la FSH podría relacionarse con el pronóstico merece tenerse en cuenta, ya que podría constituir un marcador subrogado de eficacia del tratamiento -y por ende, de supresión estrogénica óptima- que sería accesible al clínico en el contexto asistencial. Además, se vio que los niveles de FSH, tanto los basales como los medidos durante el tratamiento, no se relacionaban con el IMC, a diferencia de lo que sucede con los niveles de estrógenos cuando se utilizan métodos ultrasensibles. Es por todo ello que abordaremos esta cuestión en nuestro próximo análisis a 4 años, diferenciando,

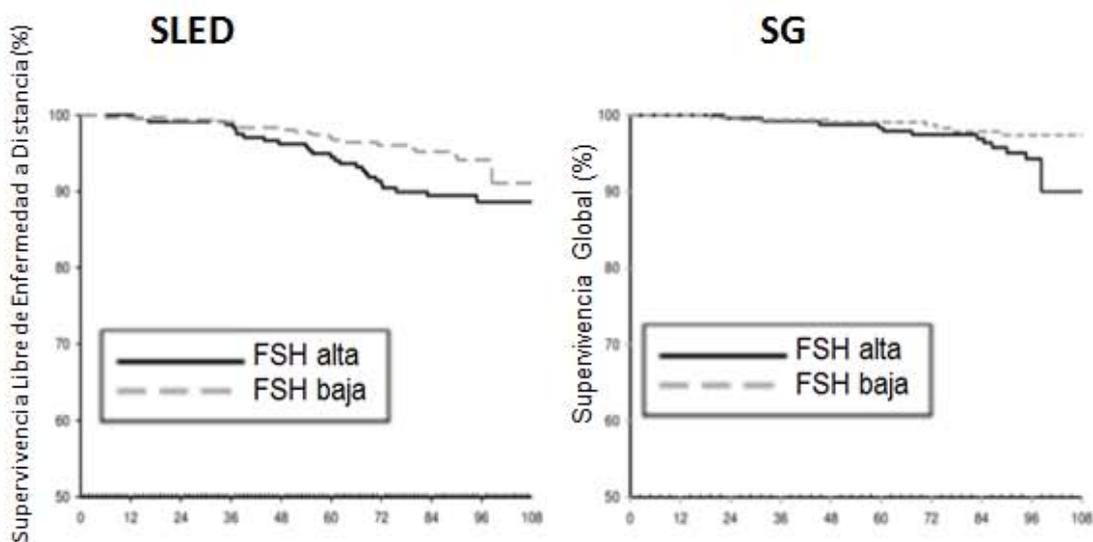
eso sí, ambos grupos de tratamiento, en línea con la diferente evolución de la FSH demostrada.

En relación con los datos mencionados sobre la dinámica de la FSH, y para ilustrar el comportamiento de ésta en pacientes con amenorrea quimioinducida en tratamiento con IA, cabe comentar nuevamente los datos del estudio de Guerrero *et al*. En esta serie se observó también un aumento progresivo de la FSH durante los 6 primeros meses de tratamiento, y ello se dio tanto en la población que experimentó RFO como en la que no la presentó, aunque los niveles de FSH fueron mayores, al menos numéricamente, en este segundo grupo. Esto último sugiere que el potencial valor predictivo de beneficio del tratamiento hormonal de la FSH descrito en el estudio ABCSG-12, o bien no es consistente, o bien sólo es aplicable a la población premenopáusica en tratamiento con aGnRH. En este punto debe recordarse que en el trabajo de Guerrero *et al* las pacientes no recibieron aGnRH, y el hecho de que también aquí aumenten los niveles de FSH a medida que transcurre el tratamiento con IA (al igual que en los estudios HOBOE y SOFT-EST) apunta a que dicho incremento se relaciona más con el efecto farmacodinámico propio del IA, que a un efecto directo del aGnRH sobre la hipófisis. En contra de esta hipótesis, sin embargo, están los datos del estudio de Robertson *et al* [258], que muestran un incremento progresivo de la FSH con goserelina en monoterapia en los primeros 12 meses de tratamiento, sugiriendo la existencia también de un cierto agotamiento del efecto del aGnRH, quizá por desensibilización de la hipófisis a medida que se prolonga el tratamiento.

Por último, en el contexto neoadyuvante, un estudio japonés randomizado, doble ciego, el *Study of Arimidex o Tamoxifeno combined with Goserelin acetate to compare Efficacy and safety* o STAGE trial, ha demostrado la mayor actividad clínica en términos de tasa de respuesta por palpación (caliper) de goserelina+anastrozol (24 semanas) con respecto a goserelina+tamoxifeno (70.4 vs 50.5%, $p < 0.004$) [266]. En este estudio se incluyeron 197 pacientes premenopáusicas portadoras de tumores operables RE+ (T 2-5 cm, N0 M0) y se determinaron los niveles de E2 y E1 cada 4 semanas. Lamentablemente no se especificó el método utilizado, ni el límite de sensibilidad de éste, ni se describieron los valores individuales obtenidos aunque, al igual que en los estudios HOBOE y SOFT-EST, los autores describieron una mayor supresión estrogénica a las 24 semanas en el grupo tratado con anastrozol (p

<0.0001 para E2 y E1). Al tratarse de un estudio neoadyuvante, los autores pudieron estudiar los niveles de E2 y E1 a nivel tumoral, tanto en la biopsia diagnóstica como en la pieza quirúrgica en un subgrupo de pacientes; hallando igualmente una mayor supresión estrogénica con anastrozol en el tumor en el momento de la cirugía, que sólo resultó estadísticamente significativa para E1, pero no para E2.

Figura 48 Supervivencia Libre de Enfermedad a Distancia (SLED) y Supervivencia Global (SG) en función de la FSH medida durante el tratamiento endocrino (goserelina-tamoxifeno o goserelina-anastrozol) en el estudio ABCSG 12.



FSH alta / baja: por encima / ha codebajo de la media (4.87 mUI/mL)

6.3.2. En el contexto metastásico

Otros trabajos han investigado la supresión estrogénica obtenida con aGnRH+ IA o tamoxifeno en enfermedad metastásica. Los datos clínicos y endocrinos de dichos estudios se han comentado extensamente en la sección 1.4.4. (Tablas 21 y 22). Como resumen podemos afirmar lo siguiente:

En cuanto a eficacia clínica, diferentes estudios fase II [255, 259-261, 263, 264, 357, 358] han demostrado eficacia del uso de aGnRH con IA, con tasas de BC entre 62 y 71% y TTP entre 8.3 y 12 meses. De forma interesante, en uno de estos estudios

[263], el TTP y la tasa de BC fue similar a la descrita en un grupo paralelo de pacientes postmenopáusicas.

Desde el punto de vista endocrino, estos trabajos presentan como limitaciones un número pequeño de pacientes [259-261, 263, 264, 358], el uso de métodos poco sensibles [251, 259, 263], y/o corto seguimiento [255, 259-261, 263, 264, 358]. Ninguno de estos trabajos randomiza las pacientes a aGnRH con tamoxifeno o IA, sino que en algún caso IA substituye a tamoxifeno a la progresión a aGnRH+tamoxifeno, observándose en este caso una mayor profundización de la supresión estrogénica al introducirse el IA [259]. Asimismo se puede comprobar como la adición de tamoxifeno al aGnRH induce una mayor supresión estrogénica que aGnRH en monoterapia [258]. Finalmente, también en estos estudios existen indicios de supresión subóptima con IA en algunas pacientes [255, 260, 358] y en esta línea destaca el estudio de Dowsett *et al* que añade vorozol a goserelina en una población postmenopáusica y observa que, aunque la introducción del IA se relaciona con una caída de los niveles de E1, E2, y E1S, éstos son claramente superiores a lo observado a una población paralela postmenopáusica tratada con vorozol [358].

6.3.3 Relevancia del estudio SOFT-EST en comparación con estudios previos en población premenopáusica

En contraposición a las limitaciones metodológicas de los trabajos descritos en la Secciones inmediatamente anteriores (6.2.2 y 6.2.3) el estudio SOFT-EST constituye, según nuestro conocimiento, la serie más larga (ya sea en el escenario precoz o avanzado) que investiga prospectivamente los niveles de estrógeno en mujeres premenopáusicas en tratamiento con aGnRH e IA, la que tiene determinaciones hormonales -y un perfil estrogénico completo-, durante un período más largo (hasta 48 meses), usando un método de referencia (GC-MS/MS), además de ser el único llevado a cabo en el seno de un estudio fase III adyuvante internacional.

6.4 FACTORES PREDICTIVOS DE SUPRESIÓN ESTROGÉNICA SUBÓPTIMA EN EL GRUPO QUE RECIBIÓ EXEMESTANO+TRIPTORELINA

Como se ha mencionado previamente en el apartado de Objetivos, el análisis de factores predictores de supresión subóptima (Sección 5.2.4.4, tabla 45) debe considerarse exploratorio. Aún así, arroja resultados interesantes, que se comentan a continuación:

Los *niveles bajos de FSH y LH basales* fueron las variables predictoras de supresión estrogénica subóptima más potentes y de hecho las únicas que alcanzaron plena significación estadística durante este primer año del subestudio ($p= 0.002$ y $p= 0.004$ en ambos casos) Este hallazgo refuerza el papel de las gonadotropinas en la definición del estado menopáusico, particularmente tras quimioterapia, más allá de los meros niveles de E2 local exigidos para la inclusión en el estudio SOFT. En estudios que investigan una situación similar, la de RFO en mujeres con amenorrea quimioinducida que reciben tratamiento con IA en monoterapia (sin aGnRH) los niveles de FSH no fueron, en cambio, predictores de recuperación de niveles de E2 [283-285].

A diferencia de las gonadotropinas, los *niveles de E2 basales* obtenidos mediante GC-MS/MS no resultaron factores predictores de supresión estrogénica subóptima, lo que puede ser debido a la naturaleza cíclica de los niveles de E2 en la mujer con menstruaciones. Ello es similar a lo descrito en mujeres con amenorrea quimioinducida sometidas a tratamiento con IA, en las que los niveles de E2 basal elevados tampoco se asociaron a una mayor posibilidad de recuperación [283-285]. La experiencia clínica y las recomendaciones actuales avalan la determinación de los niveles de gonadotropinas junto con E2, y sobre todo, la realización de un perfil hormonal seriado, para una mejor definición del estado menopausico de la paciente, sobretodo en el contexto de amenorrea quimioinducida [206, 370]. En estas pacientes, sin embargo, incluso con un perfil hormonal completo y repetido compatible con menopausia, la posibilidad de una recuperación posterior existe todavía, y ello viene ilustrado por nuestra observación de niveles de E2 >2.72 pg/mL

a lo largo de los 12 meses de observación en 5 pacientes con niveles de E2 por GC-MS/MS <20 pg/mL en el momento del reclutamiento en el estudio (Figura 40, paneles A y B)

Por el contrario, la *edad joven* no se relacionó con una supresión estrogénica subóptima en nuestro estudio. Este hecho debe valorarse con mucha cautela, ya que: 1) el número de pacientes muy jóvenes (<35 años) es muy limitado y precisamente en este subgrupo la proporción de supresión estrogénica subóptima fue particularmente elevada (50%, 4 de 8 mujeres); y 2) entra en contradicción con otros trabajos en los que la edad ha sido el factor predictor más importante de no desarrollo de amenorrea quimioinducida [269], así como de recuperación estrogénica en pacientes con amenorrea quimioinducida y tratamiento con IA, si bien en estos últimos estudios las pacientes no recibieron tratamiento concomitante con aGnRH [283-285].

La *no administración de QT adyuvante* previa tendió a asociarse con la detección de supresión estrogénica subóptima (59.3% de elevaciones de E2 >2.72 pg/mL en las pacientes sin QT previa vs 40.7 en las pacientes que no la habían recibido, $p = 0.06$) Éste fue un hallazgo coherente con otros estudios que han relacionado el tratamiento de QT con una baja reserva gonadal y falta de recuperación ovárica [277, 371, 372]. Globalmente, 44.3% de las 79 pacientes asignadas a exemestano+triptorelina que disponían de muestra post-basal recibieron QT, y los esquemas más frecuentemente utilizados fueron los basados en antraciclinas (22.7%) o en antraciclinas más taxanos (75%). Como ya se ha comentado anteriormente, se sabe que los agentes alquilantes como la ciclofosfamida (presente en esquemas tipo FAC/FEC o CMF) se relacionan con una toxicidad gonadal más definitiva, mientras que existe una cierta fase de recuperación para los esquemas que no contienen o contienen menos dosis acumulada de ésta (por ejemplo antraciclinas y taxanos). Lamentablemente no pudimos disponer de datos de dosis acumulada de ciclofosfamida para este análisis, aunque no se descarta que podamos obtenerlo en el siguiente, en los que se dispondrá de los datos a 4 años.

A diferencia de la tendencia observada con la administración o no de QT, el *estado menstrual basal* no se asoció a elevaciones de E2 durante el tratamiento con exemestano+triptorelina. En nuestro estudio, y centrándonos únicamente en este

último grupo, 44.3%, 38% y 17.7% de las 79 pacientes con determinación de E2 post-tratamiento presentaron amenorrea, menstruaciones irregulares o menstruaciones regulares, respectivamente, no observándose diferencias en el estado menstrual entre los grupos con o sin supresión estrogénica subóptima. Si bien es cierto que el estado menstrual basal se relacionó con haber recibido o no QT (20.6% vs 85.5% de menstruaciones regulares en las pacientes con o sin QT adyuvante previa), el hecho de no asociarse con la supresión estrogénica posterior se explica nuevamente por la presencia de niveles estrogénicos en la franja premenopáusica en una proporción sustancial de pacientes con amenorrea inducida por QT (Véase Sección 1.5.3.).

El *antecedente de tratamiento con tamoxifeno*, presente en un 33% de mujeres en el grupo de exemestano+triptorelina, contribuye a que se pueda interpretar erróneamente el estado de amenorrea. Debe recordarse que la prescripción de este antiestrógeno sólo se hizo en mujeres que habían recibido QT previa y presentaban amenorrea inducida por ésta, en espera de una posible recuperación ovárica; en cambio el resto de pacientes fueron directamente randomizadas tras la cirugía. La mediana de duración del tamoxifeno adyuvante fue de 17 semanas. Dicho esto, debe recordarse también (Sección 1.6.2) que el tratamiento con tamoxifeno, por una parte, se asocia a una mayor tasa de amenorrea quimioinducida con respecto a pacientes con QT previa sin tamoxifeno [268]; y por otra, tiende a elevar los niveles de E2 basal [373] y a disminuir algo los niveles de FSH [283] en pacientes realmente premenopáusicas, incluso en situación de amenorrea, lo que, en realidad, podría acelerar la detección de estado premenopáusico y, por tanto, reducir el intervalo entre fin de QT y reclutamiento de las pacientes en el estudio SOFT (hecho del que no disponemos de datos). Sin embargo, ello no tendría que incidir necesariamente en la evolución posterior de los niveles de estrógenos durante el tratamiento de estudio, y más teniendo en cuenta que la vida media del metabolito que permanece más tiempo en plasma, el *N* desmetil-tamoxifeno es de sólo 14 días [374]. De hecho, en el caso de que la acción de tamoxifeno se prolongara algo más de este período, o que pudiera ser algo más prolongada en tejidos diana que en plasma, y descartando la acción de exemestano, que no se prescribió hasta 4 o 6 semanas de iniciado el aGnRH, la acción de tamoxifeno en presencia del aGnRH tendería a disminuir más los niveles de E2 en comparación con el aGnRH en monoterapia [258, 356].

Especulaciones aparte, en nuestro estudio el tratamiento con tamoxifeno no fue predictor de supresión estrogénica, aunque numéricamente hubo una mayor proporción de pacientes que habían recibido tamoxifeno en el grupo con supresión estrogénica óptima (38.5 vs 22.2%). Revisando los estudios que han investigado la RFO en pacientes con amenorrea quimioinducida y tratamiento con IA, sólo 1 de ellos ha estudiado el papel de tamoxifeno como factor predictor, sin encontrar asociación [283] y otros 2 estudios no han podido explorar esta cuestión ya que el 94-100% de pacientes habían recibido tamoxifeno previo [284, 285]. Un cuarto estudio, en cambio, de (9 de 12 mujeres) , mientras que sólo 64% de la población había recibido este fármaco anteriormente (29 de 45 pacientes), sugiriendo que el tamoxifeno previo habría podido enmascarar un estado realmente premenopáusico.

Otra variable que se asoció de forma marginal con elevaciones de E2 por encima del dintel preespecificado fue el *IMC elevado*. Ello avala la robustez del método analítico utilizado y la coherencia de nuestros datos, ya que el IMC se ha utilizado precisamente para correlacionar la precisión de los diferentes métodos de determinación de E2 en la población postmenopáusica [334].

- *Desde un punto de vista puramente endocrino*, la obesidad se ha relacionado con niveles más altos de E2 y E1S en una población postmenopáusica con CM avanzado de forma basal y tras tratamiento con IA cuando se han utilizado métodos ultrasensibles y específicos [350, 375, 376] (véase también Sección 1.6.2.2), mientras que otros estudios que han utilizado métodos con límites de sensibilidad más convencionales para E2 (del orden de 5 pg/mL) [377] o con riesgo de reactividad cruzada con exemestano [378], no han podido detectar dichas diferencias, y/o sólo han podido poner de relieve niveles más bajos de FSH, como marcador surrogado de la menor supresión estrogénica obtenida [377]. Inicialmente se había atribuido la elevación de los estrógenos a una mayor aromatización periférica, pero recientemente se han publicado datos que apuntan a un metabolismo de los estrógenos disfuncional, más que a una aromatización excesiva como causa última de este incremento en los estrógenos plasmáticos en situación de obesidad [376]. Sea cual fuere la causa, si bien es cierto que los niveles de E2 y E1S son más elevados en la población obesa en tratamiento con IA, el cambio en los niveles estrogénicos es mayor también en este grupo, y el nivel de estrógeno residual es también relativamente bajo [379]. Al igual que se ha visto en la población general

[212], el letrozol parece más efectivo que anastrozol también en el contexto de IMC alto [350], por lo que no es totalmente descartable que el primero pudiera ser más apropiado particularmente en este grupo de mujeres. Se ha sugerido asimismo que en la población obesa niveles de anastrozol superiores podrían ser más efectivos, pero en el contexto metastásico 2 estudios que analizaron 1 mg vs 10 mg no vieron diferencias, pese a la inclusión de pacientes con IMC muy elevados [380, 381].

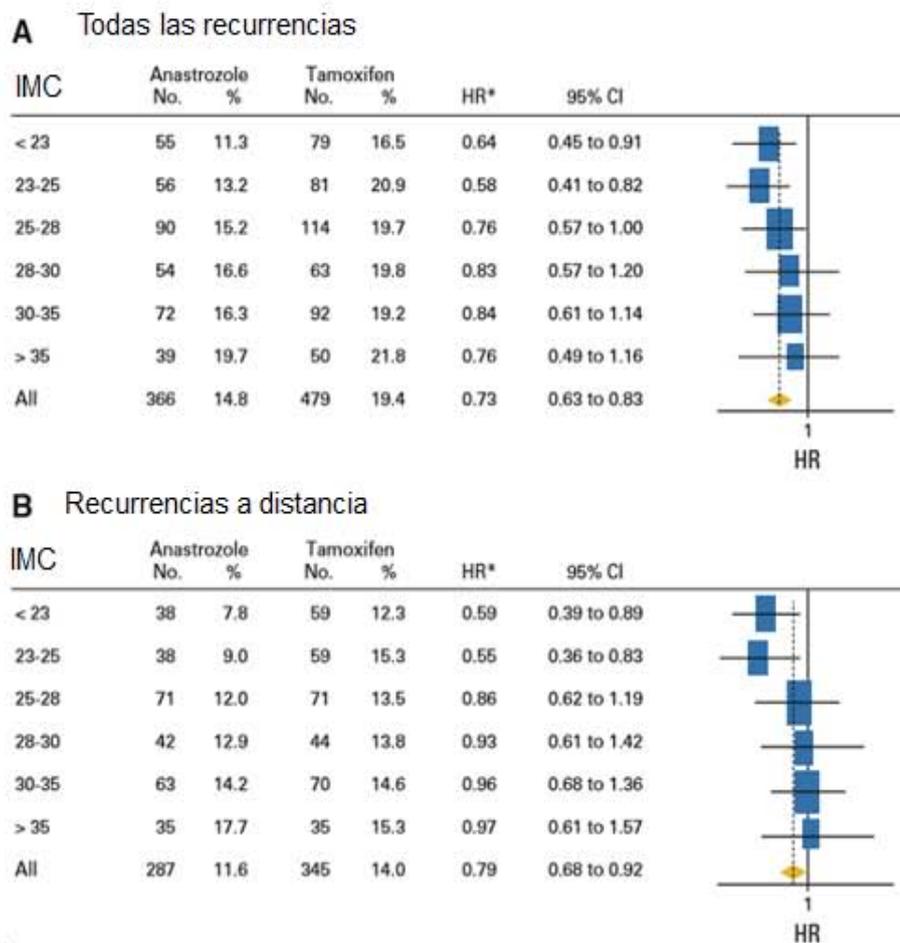
- *Desde el punto de vista clínico*, la obesidad se ha relacionado con una peor mortalidad por CM en pacientes RE+ en un metaanálisis recientemente comunicado que incluyó 60000 pacientes con CM precoz endocrinosensible [382]. Dicho peor pronóstico se describió en mujeres pre- y postmenopáusicas ($2P < 0.00001$ en ambos casos), pero tras ajustarlo por características del tumor la asociación solo fue significativa en las mujeres pre/perimenopáusicas (RR de Mortalidad específica por CM comparando $IMC \geq 30$ versus $BMI 20-25 \text{ kg/m}^2 = 1.34$, 95%CI 1.22-1.47, $2P < 0.00001$).

En cuanto al impacto de la obesidad con respecto a la eficacia de los tratamientos hormonales, debemos referirnos a estudios individuales. Sabemos, por datos del estudio NSABP-B14, que el tamoxifeno es igualmente efectivo para todas las categorías de IMC [383]. Un segundo trabajo llevado a cabo en el seno del estudio adyuvante ABCSG-06, que randomizó a las pacientes a recibir tamoxifen o tamoxifen + aminoglutetimida (IA de segunda generación), reportó una peor SLED (HR 1.67, Cox $p=0.03$) en pacientes con sobrepeso/obesidad que recibieron la combinación con el IA en comparación con las pacientes con normopeso. En cambio, el sobrepeso/obesidad no comportó un peor pronóstico entre las pacientes asignadas a tamoxifeno en monoterapia[384].

En lo que se refiere a la interacción de la obesidad con el tratamiento con IA de tercera generación, ésta resulta controvertida a día de hoy. En el contexto metastásico no se ha descrito asociación [167, 385]. En el escenario adyuvante, en cambio, cuatro estudios adyuvantes muestran resultados dispares. Ciñéndonos a pacientes postmenopáusicas, y en cuanto a datos pronósticos, el estudio ATAC [351] y el estudio BIG 1-98 [353] describen un peor pronóstico para las pacientes obesas, relación que no se halla en el estudio TEAM [386]. Los datos sobre eficacia relativa del IA en función del IMC tampoco son consistentes. Así, el BMI alto ($> 30 \text{ kg/m}^2$ en

comparación con <28 kg/m²) se ha relacionado con una menor eficacia relativa de anastrozol, en términos de SLE y SLED en el estudio ATAC [351] (Figura 41) mientras que en el estudio BIG 1-98 [353], con letrozol, y en el estudio TEAM [386], con exemestano, no se describió interacción de BMI con el tratamiento con el IA.

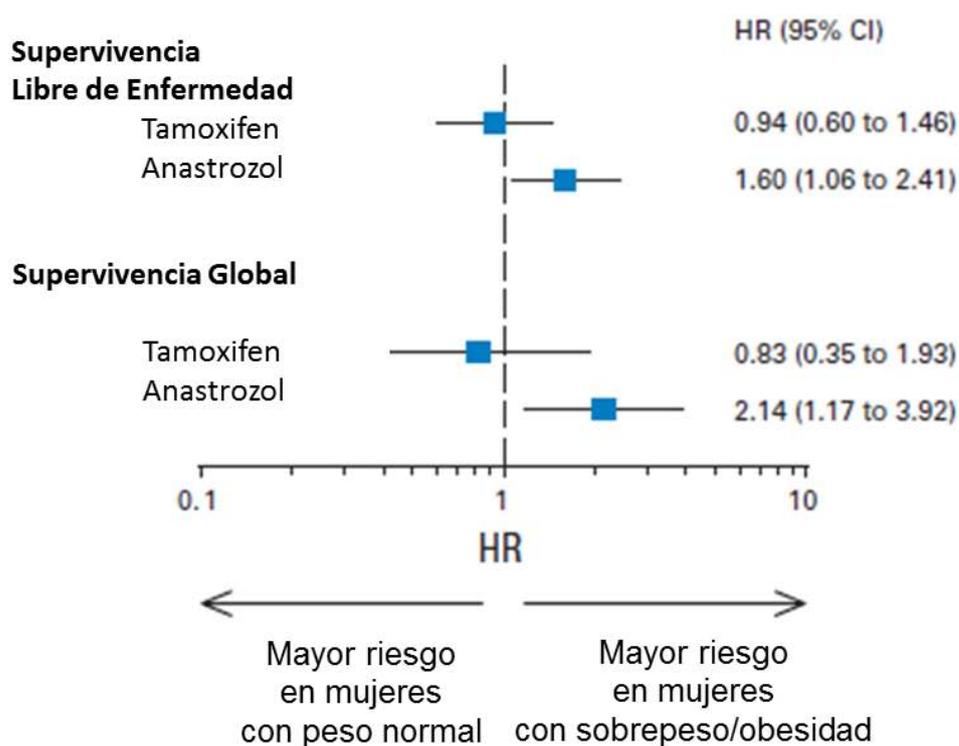
Figura 49. Beneficio relativo de Anastrozol vs Tamoxifeno en función de IMC en el estudio ATAC: Razón de Riesgo (HR) de recurrencias y recurrencias a distancia [351].



Nótese cómo la HR incrementa a medida que aumenta a medida que lo hace el IMC

En lo que respecta a la población premenopáusica el estudio ABCSG-12 [387] describió un peor pronóstico para las pacientes obesas sólo en el grupo que recibió anastrozol. Las razones de riesgo de SLE y SG de este estudio en función del tratamiento se ilustran en la Figura 46.

Figura 50. Estudio ABCSG-12: Razones de riesgo (HR) de SLE y SG en función del tratamiento (tamoxifeno o anastrozol) en pacientes con sobrepeso/obesidad vs pacientes con peso normal [387].



- Finalmente, desde el punto de vista predictivo de RFO, y en relación con nuestros hallazgo de asociación marginal de IMC y supresión estrogénica subóptima, no estadísticamente significativa, debemos referirnos nuevamente a los tres estudios prospectivos que han investigado la RFO en pacientes con amenorrea quimioinducida en tratamiento con IA sin aGnRH[283-285], ninguno de los cuales ha encontrado asociación entre IMC y RFO.

6.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO SOFT-EST

Se ha señalado anteriormente que el carácter prospectivo, internacional, longitudinal, del presente subestudio, y que la metodología utilizada (espectrometría de masas, perfil estrogénico completo) confieren robustez a nuestro trabajo. Sin embargo, deben admitirse una serie de limitaciones, que comentamos a continuación:

Nuestro estudio adolece de un número no desdeñable de discontinuaciones precoces (12%), así como de muestras no recolectadas y/o analizadas, a lo que debe añadirse el valor clínico incierto asociado a elevaciones aisladas de E2. Globalmente, sólo 48 pacientes en el grupo de exemestano+triptorelina tuvieron las 3 muestras post-basales del primer año analizadas. A pesar de ello pudimos objetivar que 8% de las pacientes (4 of 48) presentaban niveles de E2 > 2.72 pg/mL en todos los puntos de tiempo, lo cual razonablemente podría tener un impacto pronóstico algo más relevante. Tomado en su conjunto, nuestros resultados ilustran la proporción de pacientes con supresión estrogénica suóptima en un punto de tiempo determinado más que una descripción completa de la dinámica de estrógenos en una paciente individual.

Observamos una elevada proporción de pacientes con valores de E2 y E1 < LLQ (>81% and >83% en cualquier punto de tiempo, respectivamente, Tabla 51) demostrando que es posible obtener una supresión estrogénica profunda en pacientes con exemestano+triptorelina, similar a la descrita en pacientes con menopausia natural y tratamiento con IA. Sin embargo, resulta complejo explicar por qué en una minoría de pacientes / muestras sanguíneas se observan niveles de E2 > 2.72 pg/mL. Nuestro estudio no fue diseñado para estudiar todas las posibles causas de supresión estrogénica subóptima:

Así, por ejemplo, no se determinaron niveles plasmáticos de exemestano para comprobar el cumplimiento terapéutico. Sabemos que en el contexto adyuvante la adherencia al tratamiento hormonal dista de ser óptima, y que ello redundaría en la eficacia clínica, pero esta “no-adherencia” al tratamiento es sobre todo evidente a largo plazo (ej a los 5 años) y, particularmente en el ámbito asistencial, más que en el de un estudio clínico [388]. En nuestro caso, y desde un punto de vista bioquímico (niveles de estrógenos) podría considerarse que el cumplimiento terapéutico es particularmente relevante en un

compuesto con una vida media plasmática de 24-48 horas, como es el exemestano; sin embargo, sabemos también que, dada la naturaleza irreversible de la inhibición de la aromatasa, los niveles de estrógenos continúan suprimidos durante al menos 4 días tras la administración única de 25 mg [389], con lo que la omisión muy esporádica de una dosis no tendría que modificar esencialmente los resultados. En nuestro estudio el cumplimiento del tratamiento oral se interrogó en cada visita y la administración de triptorelina se registró a partir un diario específico de las pacientes. En cuando a la administración del aGnRH, después de analizar exhaustivamente los datos relativos a la medicación (Ver Sección 5.5), que fueron completos en un 75% de casos, no se evidenciaron omisiones ni retrasos sustanciales. La mayoría de la pacientes recibieron las inyecciones dentro del período establecido de 28 días \pm 2 días y sólo un 15% de lo recibió en un intervalo \geq 30 días, siendo este grupo el más susceptible de presentar un efecto subóptimo del aGnRH y por tanto, una mayor probabilidad de niveles de E2 por encima del dintel pre-especificado. Para estudiar el peso de este efecto, analizamos el intervalo transcurrido entre la obtención de la muestra sanguínea y la administración de la última dosis d triptorelina, sin que observáramos un perfil hormonal evidente (Figura 39A) que sustentara el no cumplimiento como causa principal de supresión estrogénica subóptima.

Tampoco se estudiaron otras variables con potencial influencia en el efecto farmacodinámico del IA, como son polimorfismos en CYP19, el gen que codifica para el enzima aromatasa (sección 1.4.2.1). Así, determinadas variantes alélicas de este gen se han relacionado con una mayor eficacia de IA tanto en CM metastásico [194] como en CM precoz [195, 390]. En nuestro caso, al igual que sucedió con los niveles plasmáticos de exemestano, la determinación de los polimorfismos de CYP19 se consideró en el momento del diseño del estudio, pero se desestimó finalmente por cuestiones de presupuesto.

Un hallazgo interesante de nuestro estudio, pero que puede ser visto como una limitación, es la elevada proporción de pacientes (34%) con niveles centrales de E2 en el rango de la menopausia en la población incluida en el brazo de exemestano+triptorelina (56% y 8% de mujeres con y sin quimioterapia, resectivamente). Ello pone de manifiesto la dificultad clínica ya comentada de la determinación de estado menopáusico tras quimioterapia, sobre todo si ésta se basaba únicamente en los niveles de E2 local como exigía el protocolo del estudio SOFT y como se ha continuado realizando en estudios recientemente publicados [285]. Tras estudiar con más detalle esta población con niveles de E2 por GC-MS/MS en el rango de la menopausia, se observó que tenía niveles significativamente más elevados

de FSH y LH, así como una mayor proporción de amenorrea, corroborando, por tanto, la menor reserva ovárica de estas pacientes. Aún así, aun con niveles de E2 centrales compatibles con post-menopausia, pudimos comprobar que es todavía posible presentar elevaciones de E2 posteriores, durante el tratamiento, encima del *cut-off* preespecificado (Figura 35, panel A). En relación con este último punto es interesante mencionar un estudio japonés reciente que ha descrito elevaciones de E2 con IA incluso en 6 de 66 pacientes consideradas menopáusicas; lamentablemente este estudio, interesante en su concepto, no ha comunicado la edad mediana de las pacientes incluidas ni ha separado claramente los datos en función de haber recibido o no QT (14 vs 52 pacientes, respectivamente)[391].

En relación con el punto anterior, debe decirse que no se analizaron tampoco otros factores que se han evaluado recientemente como marcadores de la reserva ovárica, tanto en la población general como en la tratada con QT. Estos factores son la AMH [392], la inhibina B [285] o bien el volumen ovárico o el conteo de folículos antrales determinado por Ecografía transvaginal [284]. Sin embargo, los hallazgos de esta última prueba en pacientes con amenorrea quimioinducida no se han demostrado predictores de un RFO posterior [284]. En cuanto a la AMH, la determinación de ésta tendría interés en principio porque no está tan sujeta al *feed-back* E2/gonadotropinas y se sabe que sus niveles preQT puede predecir tanto el desarrollo de amenorrea quimioinducida [393] como la RFO a largo plazo[287]. Pero su determinación en nuestro caso tampoco hubiera sido informativa. A nivel basal, porque un grupo sustancial de pacientes (55.2% en la cohorte analítica) había recibido QT y se ha visto que, tras ella, la práctica totalidad de pacientes tiene niveles de AMH indetectables, inutilizando su capacidad de predicción de una futura RFO [283, 284]. Y a nivel de determinaciones seriadas, durante el tratamiento, tampoco habría podido estudiarse como potencial marcador indirecto o subrogado de supresión estrogénica subóptima, ya que se ha visto que, en curso de tratamiento con IA en monoterapia, la AMH permanece indetectable a pesar de que exista recuperación de E2 y FSH en el rango de la pre-menopausa, por lo que no es un parámetro indicador de la función ovárica existente en este contexto [394].

La inhibina B, por otra parte, ha demostrado ser, junto con la edad menor de 45 años, un marcador predictivo independiente de RFO en pacientes con amenorrea quimioinducida y tratamiento con IA en el mencionado estudio de Krekow *et al* (Sección 6.2.2.1), de manera que en este trabajo cada incremento en una unidad se asoció a casi el doble de probabilidad de presentar RFO (Odds ratio. 1.993; 95% IC 1-064-3.512, $p= 0.03$) [285]. Sin

embargo los otros dos estudios prospectivos también comentados que tuvieron un diseño similar, pero menor tamaño muestral, no hallaron dicha asociación [283, 284]. En nuestro estudio se valoró particularmente la inclusión de la inhibina B dentro de las determinaciones hormonales a efectuar basalmente y durante el tratamiento, con el objetivo de estudiarlo como posible marcador subrogado de supresión estrogénica óptima, dada la dificultad de disponer de métodos ultrasensibles de determinación de E2 en la práctica asistencial. Lamentablemente tuvimos que abandonar esta idea, en este caso por cuestiones de estabilidad de la muestra (sólo 1 mes entre obtención y determinación de inhibina B) que eran incompatibles con la logística de un estudio internacional académico como el que proponíamos.

Y finalmente, en relación a lo apuntado recientemente, nuestros resultados no son directamente aplicables a la clínica, en primer lugar, por el difícil acceso, coste, etc de la GC-MS/MS, del que fuimos conscientes desde el diseño del estudio; y en segundo lugar, pero no menos importante, por la escasez de datos que confieran relevancia clínica al dintel y dinteles pre-especificados. Ambas limitaciones se abordarán en el próximo análisis del estudio SOFT-EST, con los datos completos a 4 años y con un seguimiento mediano que excederá los 5 años (Ver Sección 6.7),

“

6.6 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL SUBESTUDIO SOFT-EST EN EL CONTEXTO DE LOS HALLAZGOS DE LOS ESTUDIOS SOFT Y TEXT

Los hallazgos de este subestudio deben interpretarse a la luz de los resultados de los estudios parentales SOFT y TEXT.

Así, el análisis combinado de los estudios SOFT y TEXT [329] ha demostrado una mejoría significativa en SLE de la combinación de exemestano+SFO en comparación con tamoxifeno+SFO. Por otra parte, el estudio SOFT [327] ha revelado beneficios en SLE con tamoxifeno+SFO comparado con tamoxifeno en monoterapia en el grupo de mujeres con QT previa -esto es, con factores pronósticos desfavorables que han promovido la indicación de QT por el oncólogo investigador-, y en el grupo de pacientes < 35 años; beneficios que se ven, además, incrementados con la combinación de exemestano+SFO. Por todo ello, exemestano+SFO se ha convertido en una nueva opción de tratamiento endocrino adyuvante de la paciente premenopáusica. Considerando que este tratamiento se está indicando cada vez más, el hecho de conocer si una paciente está subóptimamente suprimida en tiempo real se ha convertido en una cuestión clínicamente importante y en una necesidad acuciante. Es importante, asimismo, destacar, que, aunque la edad no se asoció a una supresión subóptima en nuestro estudio, la población < 35 años fue muy pequeña (sólo 8 mujeres, todas ellas incluidas en el grupo de exemestano+triptorelina) y aún así, constatamos que la supresión subóptima mantenida se daba predominantemente en este subgrupo (3 pacientes, 2 de ellas sin QT previa). Estos hallazgos parecen entrar en contradicción con los del estudio SOFT, que, como se ha comentado, describió que la SFO beneficiaba particularmente a las mujeres más jóvenes, pero ello puede explicarse por la menor proporción de pacientes <35 años en el SOFT-EST que recibió QT previa (50% vs 94% en estudio SOFT).

Adicionalmente nuestro subestudio reveló que 56% de las mujeres tratadas previamente con QT podían ser realmente postmenopáusicas en el momento de la randomización (pudiendo haber o no una recuperación estrogénica posterior), lo que abre la puerta a la posibilidad de que haya existido un efecto “dilutorio” en estudio SOFT, o dicho de otra forma, que el beneficio observado con la adición de la SFO en el grupo que recibió QT hubiera sido mayor en el caso de que toda la población incluida fuera estrictamente

premenopáusica en el momento de la randomización. Ciertamente desconocemos la proporción de pacientes que hubieran tenido niveles de E2 en el rango de la postmenopausa con GC-MS/MS en el estudio parental si todas ellas se hubieran testado. Si comparamos las características clínicas en la cohorte analítica del subestudio SOFT EST con las comunicadas en el análisis primario del estudio SOFT[327] (Ver Tabla 64) vemos que la mediana de edad es bastante similar, pero la proporción de pacientes con edades superiores a 40 años es algo mayor en nuestro estudio, al tiempo que es algo inferior el porcentaje de mujeres menores de 40. No se observan diferencias relevantes en lo que respecta a la administración previa de QT. En cuanto al estado menstrual (menstruaciones regulares, menstruaciones irregulares, amenorrea), no ha sido posible efectuar la comparación, al no haberse publicado este dato en el estudio parental. Globalmente, toda la información disponible apunta a que en nuestro estudio podría haber una población con una leve mayor probabilidad de estado menopáusico basal real, pero al no disponer de datos hormonales centralizados en el estudio parental, todo ello resulta especulativo.

Tabla 56. Características clínicas con potencial influencia en el estado menopáusico real a la randomización en la población incluida en el análisis primario del estudio SOFT y en el estudio SOFT-EST

Característica	SOFT (N=2033)*	SOFT-EST (N=116)
Edad		
Mediana	43	44
Distribución (N y %)		
<35 años	233 (11.5)	8 (6.9)
35-39	387 (19)	16 (13.8)
40-49	1224 (60.2)	79 (68.1)
≥ 50	189 (9.3)	13 (11.2)
QT previa (N y %)	1084 (53)	64 (55.2)

*Sólo se incluyen los datos de las pacientes randomizadas a tamoxifen o tamoxifen + triptorelina (los únicos publicados)

6.7 DIRECCIONES FUTURAS

Más allá de los resultados presentados en la presente tesis, nuestra intención es cumplir con los todos objetivos del estudio SOFT-EST y ello incluye analizar los datos hormonales (E1, E2, E1S, FSH y LH) de las pacientes incluidas, ya no sólo durante el primer año de tratamiento, sino durante todo el período comprendido desde la randomización hasta los 48 meses. Se anticipa que en el tiempo transcurrido entre los 12 y 48 meses habrá proporcionalmente menos discontinuaciones y menos muestras perdidas o no analizadas, puesto que, una vez detectado este problema recurrente durante el primer año del estudio se reentrenaron los centros participantes, se intensificó el seguimiento desde la oficina de SOLTI y se modificó la logística del transporte de muestras, centralizando y re-comprobando éstas en el Laboratorio de Hormonas del Hospital Vall d'Hebrón antes de su posterior envío a InVentiv Health. Este análisis final permitirá, a nuestro entender, conocer mejor la dinámica de los niveles de estrógenos y gonadotropinas en cada paciente individual, y dilucidar, por ejemplo, si la supresión estrogénica obtenida en los primeros 12 meses nos permite predecir la supresión estrogénica obtenida a largo plazo. Asimismo, y de forma exploratoria, se compararán los datos de recurrencia a 5 años de las pacientes con y sin supresión estrogénica subóptima para valorar en lo posible el impacto clínico que ésta pueda tener. Se planea disponer de estos resultados para 2017 y presentarlos conjuntamente con una actualización de datos del estudio SOFT en el Congreso de Cáncer de Mama de San Antonio en Diciembre de 2017. Ello implica que los datos de recurrencia se actualizarán entre el segundo y tercer cuartil de 2017.

La determinación de FSH y LH se consideró como un objetivo secundario que tenía como fin arrojar luz sobre las posibles causa de supresión subóptima, en caso de detectarse ésta. Con el tiempo han surgido datos, comentados previamente, que han señalado el posible papel de la FSH como marcador subrogado de un funcionamiento subóptimo o de una pérdida de actividad del aGnRH, que sería particularmente relevante para el funcionamiento del IA. Esta cuestión fue abordada en el seno del estudio ABCSG-12 [369], en más de 500 pacientes, concluyendo que niveles elevados de FSH se relacionaban con un peor pronóstico, lo que sugería una menor eficacia del tratamiento hormonal para estas pacientes. Este estudio tuvo algunas limitaciones, puesto que la determinación de FSH fue local y se estudiaron conjuntamente los dos brazos de tratamiento (goserelina+tamoxifeno y goserelina+ anastrozol), cuando hoy sabemos, por nuestros datos y por los de otros

grupos [265], que la evolución de la FSH difiere en función de éste. Una revisión reciente firmada por las máximas autoridades en el campo del tratamiento hormonal hace hincapié en la necesidad de estudiar el papel de la FSH como marcador subrogado de supresión óptima en pacientes sometidas a aGnRH de forma separada, según reciban concomitantemente tamoxifen o IA [395], y ello es lo que pretendemos estudiar también en nuestro próximo análisis. En él investigaremos la asociación de las tres fracciones estrogénicas, y en particular de los niveles de E2, con los niveles de FSH y, de demostrarse dicha asociación, intentaremos determinar un dintel de FSH que alerte al clínico de la posible existencia de niveles de estrógenos inadecuados, en este caso más difíciles de demostrar con los métodos habitualmente disponibles en el contexto asistencial. Igualmente relacionaremos dichos niveles con los datos de recurrencia de las pacientes, de forma similar a como se hizo en el estudio ABCSG-12.

En relación con este último punto, el de ofrecer al clínico una metodología de determinación de estrógenos precisa, asequible en coste y capaz de dar resultados en tiempo real, nos gustaría re-analizar todas las muestras con LC-MS/MS. Esta técnica se caracteriza por una buena sensibilidad, con LLQ del orden de 2 pg/mL para E2 y ha demostrado tener una buena correlación con GC-MS/MS (r de Pearson = 0.77, $p < 0.0001$), aunque con un mayor número de *outliers* con respecto a ésta [283]. Este proyecto está aun en fase muy preliminar, pendiente de conversaciones con el grupo cooperativo IBCSG y, evidentemente condicionado a la obtención de un presupuesto específico adicional.

Por último, y fuera del ámbito de proyectos concretos asociados a nuestro subestudio, parece apropiado comentar que, en base a los resultados del estudio SOFT, la supresión con aGnRH se prescribe ya, y se prescribirá probablemente con mayor frecuencia en los próximos años, en las pacientes de riesgo que han recibido QT y sobre todo, en las pacientes <35 años, subgrupo éste en el que los beneficios son más significativos. Con los datos obtenidos por nosotros, y particularmente si en el nuevo análisis se sugiere un impacto pronóstico será imperativo efectuar un seguimiento de los niveles hormonales en las mujeres que reciban aGnRH y AI. En las pacientes identificadas como subóptimamente suprimidas a pesar de una buena adherencia al tratamiento la única alternativa a día de hoy y a corto plazo para continuar con IA será la ooforectomía bilateral, que puede no ser aceptada por todas las pacientes, dada su naturaleza irreversible. En este sentido preveemos que se investigará el uso, ya no de aGnRH, sino de antagonistas de la

hormona liberadora de gonadotropinas como el degarelix. El degarelix es un antagonista de la LHRH de segunda generación, de formulación s.c.mensual, aprobado para cáncer de próstata en 2008, y con una experiencia clínica que avala su seguridad. En comparación con leuprolide se ha asociado una depresión de testosterona más rápida, sin el efecto *flare* inicial de los aGnRH, y algo más profunda, sin elevación de testosterona asociadas al fenómeno de fin de dosis. Adicionalmente induce una caída mas profunda en la FSH, sin recuperación posterior [396]. Este último efecto es especialmente interesante en el contexto de CM adyuvante, puesto que es precisamente la elevación de la FSH la que se ha relacionado con una pérdida de actividad del aGnRH, y por tanto, la que sería necesario evitar. De hecho, un estudio fase II randomizado en el contexto neoadyuvante, el estudio *TRial on the Endocrine activity of Neoadjuvant Degarelix* TREND está abordando ya esta cuestión, y comparando el tratamiento de triptorelina+letrozol con degarelix+letrozol durante 6 meses en 55 pacientes premenopáusicas con CM RE+-. El objetivo primario de este estudio es comparar el tiempo a la supresión estrogénica óptima, definida como en nuestro estudio, es decir a niveles de E2 <2.72 pg/mL y como objetivos secundarios se incluye la tolerabilidad de ambos tratamientos. Este y otros potenciales estudios deberían averiguar si existe todavía un grupo de mujeres no óptimamente suprimidas utilizando estos nuevos fármacos y/o si es posible inducir una supresión estrogénica óptima en aquellas mujeres en las que se haya demostrado niveles elevados de E2 durante el tratamiento combinado con aGnRH e IA.



7 Conclusiones

7. CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio el 66% de las mujeres tratadas con exemestano+triptorelina mostraron una supresión óptima y persistente de los niveles de E2 durante los primeros 12 meses de tratamiento. En este grupo de pacientes, los niveles de E2 post-basales fueron inferiores al límite de cuantificación en más del 80% de casos, demostrando que en pacientes premenopáusicas que reciben aGnRH e IA es posible obtener una supresión estrogénica muy profunda, similar a la comunicada en población postmenopáusica que recibe IA.
2. Al igual que en estudios previos, la reducción estrogénica asociada a exemestano+triptorelina fue significativamente mayor que la obtenida con tamoxifeno+triptorelina, para todos los puntos de tiempo post-basales (3, 6 y 12 meses) y para todas tres fracciones estrogénicas estudiadas.
3. Treinta y cuatro por ciento del grupo de pacientes asignadas a exemestano+triptorelina y con al menos una muestra post-basal analizada, presentaron una o más elevaciones de E2 por encima de 2.72 pg/mL, el dintel pre-especificado para definir supresión estrogénica subóptima. En este brazo de tratamiento, además, al menos 17% de pacientes en cada punto de tiempo mostraron elevaciones de E2 por encima de dicho dintel.
4. Los porcentajes de supresión estrogénica subóptima observados no parecen relacionarse con una adherencia incompleta al tratamiento hormonal.
5. La FSH y la LH fueron los únicos factores basales que presentaron una asociación significativa con el desarrollo de supresión estrogénica subóptima durante el primer año de estudio, mientras que la ausencia de QT previa y la obesidad mostraron sólo una asociación marginal. Tampoco la edad joven fue un factor predictor, pero el hallazgo de una supresión estrogénica subptima en todos los puntos de tiempo en 3 de las 8 pacientes menores de 35 años, impiden, junto con lo limitado de la muestra, establecer conclusiones definitivas sobre este punto.

6. Treinta y cinco por ciento de las pacientes incluidas presentaron niveles centrales de E2 compatibles con postmenopausia, corroborando así la dificultad de determinar el estado menopáusico real en situación de amenorrea quimioinducida. La existencia de una proporción sustancial de pacientes postmenopáusicas en nuestro subestudio sugiere que la tasa de supresión estrogénica subóptima podría haber sido infraestimada, y apunta incluso a la posibilidad de una infraestimación del beneficio de la adición de la SFO en el estudio parental SOFT.

7. Aunque en los dos grupos de tratamiento se observó una rápida caída en los niveles de gonadotropinas, la reducción de la FSH fue menor y la de la LH, mayor, con exemestano+triptorelina, en todos los puntos de tiempo, con respecto a tamoxifeno+triptorelina.

8. La relativa elevación de la FSH observada con exemestano+triptorelina podría reflejar una acción incompleta del aGnRH, a la que se sumaría la desaparición del *feed-back* negativo sobre la hipófisis asociada a la disminución de estrógenos circulantes. Este *feed-back* se vería minimizado en el brazo de tamoxifeno, tanto por una menor caída del estradiol como un efecto del tamoxifeno sobre la hipófisis predominantemente agonista.

9. En el próximo análisis del estudio SOFT-EST, previsto para finales de 2017, se analizarán los datos completos a 4 años, con lo que se conocerá mejor la evolución del perfil hormonal a nivel individual. Asimismo se describirá la SLE en los grupos con o sin supresión estrogénica subóptima, de cara a conocer el impacto pronóstico de ésta. Por último, se investigará el papel de la FSH como potencial marcador sustituto de dicha supresión



8
Annexo

Twelve-Month Estrogen Levels in Premenopausal Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer Receiving Adjuvant Triptorelin Plus Exemestane or Tamoxifen in the Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT): The SOFT-EST Substudy

Merixell Bellet, Kathryn P. Gray, Prudence A. Francis, István Láng, Eva Ciruelos, Ana Lluch, Miguel Angel Climent, Gustavo Catalán, Antoni Avella, Uriel Bohn, Antonio González-Martin, Roser Ferrer, Roberto Catalán, Analía Azaro, Agniata Rajasekaran, Josefa Morales, Josep Vázquez, Gini F. Fleming, Karen N. Price, and Meredith M. Regan

See accompanying article doi:10.1200/JCO.2015.62.3728

Author affiliations appear at the end of this article.

Published online ahead of print at www.jco.org on January 4, 2016.

Written on behalf of the Suppression of Ovarian Function Trial Estrogen Substudy (SOFT-EST) Investigators, the SOLTI Group and the International Breast Cancer Study Group. The investigators in SOFT-EST and the central coordination leadership and staff are listed in the Appendix (online only).



Processed as a Rapid Communication manuscript.

SOFT-EST was supported by Pfizer International Oncology, Spain and Portugal Cluster, and the International Breast Cancer Study Group (IBCSG). IBCSG was supported by the Frontier Science and Technology Research Foundation, the Swiss Group for Clinical Cancer Research, National Cancer Institute (Grant No. CA75362), and the Swiss Cancer Research/Oncosuisse.

Pfizer had no role in the reporting or interpretation of the substudy, other than a minority representation on the SOFT Steering Committee.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest are found in the article online at www.jco.org. Author contributions are found at the end of this article.

Clinical trial information: NCT00975676.

Corresponding author: Merixell Bellet, MD, Vall d'Hebron Institute of Oncology and Vall d'Hebron University Hospital and SOLTI Group, Universitat Autònoma de Barcelona, P. Vall d'Hebron 119–129 08035 Barcelona, Spain; e-mail: mbellet@vhio.net.

© 2016 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/15/3499-1/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2259

A B S T R A C T

Purpose

To describe estradiol (E2), estrone (E1), and estrone sulfate (E1S) levels during the first year of monthly triptorelin plus exemestane or tamoxifen and to assess possible suboptimal suppression while receiving exemestane plus triptorelin.

Patients and Methods

Premenopausal patients with early breast cancer on the Suppression of Ovarian Function Trial who selected triptorelin as the ovarian suppression method and were randomly assigned to exemestane plus triptorelin or tamoxifen plus triptorelin were enrolled until the target population of 120 patients was reached. Blood sampling time points were 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, and 48 months. Serum estrogens were measured with a highly sensitive and specific assay. This preplanned 12-month analysis evaluated E2, E1, E1S, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone levels in all patients and the proportion of patients with E2 levels greater than 2.72 pg/mL at any time point during treatment with exemestane plus triptorelin.

Results

One hundred sixteen patients (exemestane, $n = 86$; tamoxifen, $n = 30$; median age, 44 years; median E2, 51 pg/mL; 55% prior chemotherapy) started triptorelin and had one or more samples drawn. With exemestane plus triptorelin, median reductions from baseline E2, E1, and E1S levels were consistently $\geq 95\%$, resulting in significantly lower levels than with tamoxifen plus triptorelin at all time points. Among patients on exemestane plus triptorelin, 25%, 24%, and 17% had an E2 level greater than 2.72 pg/mL at 3, 6, and 12 months, respectively. Baseline factors related to on-treatment E2 level greater than 2.72 pg/mL were no prior chemotherapy ($P = .06$), higher body mass index ($P = .05$), and lower follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (each $P < .01$).

Conclusion

During the first year, most patients on exemestane plus triptorelin had E2 levels below the defined threshold of 2.72 pg/mL, consistent with levels reported in postmenopausal patients on aromatase inhibitors, but at each time point, at least 17% of patients had levels greater than the threshold.

J Clin Oncol 34. © 2016 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Ovarian function suppression (OFS) has been a therapeutic strategy for premenopausal women with endocrine-responsive breast cancer for more than a century.¹ In advanced disease, two underpowered

phase III trials from the 1990s reported similar efficacy between ovarian ablation (oophorectomy or ovarian radiation) and the use of gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa).^{2,3} Studies testing GnRHa alone⁴⁻⁶ or in combination with tamoxifen⁷⁻¹⁰ or aromatase inhibitors (AIs)^{6,9-16} have shown clinical activity with effective estrogen

suppression for most patients with breast cancer. The combined efficacy analysis of the Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT) and Tamoxifen and Exemestane Trial (TEXT) adjuvant trials¹⁷ demonstrated a significant benefit in disease-free survival for exemestane plus OFS compared with tamoxifen plus OFS. Furthermore, SOFT reported improved outcomes with the addition of OFS to tamoxifen, and further improvement with OFS plus exemestane, in women who remained premenopausal after prior chemotherapy and in women younger than age 35 years, with striking benefits in this latter group.¹⁸ Approximately 95% of patients used GnRHa as an OFS method in these trials. However, studies addressing estrogen levels while receiving GnRHa treatment in benign (endometriosis¹⁷⁻²⁰) or malignant (breast cancer^{4,5,8,21,22}) diseases have shown incomplete OFS for a minority of patients and/or higher mean estrogen levels than those found in postmenopausal women.

Most reports describing endocrine effects of GnRHa, either alone or combined with tamoxifen or AI,^{6,8,9,11-16,22,23} have short follow-up (3 to 6 months on average), small sample size, or inadequate quantification of estradiol (E2) levels. More informative data regarding GnRHa-related estrogen suppression is needed in the adjuvant setting, particularly for the combination of GnRHa plus AIs, because AIs have a suboptimal effect and may even have stimulatory activity in the presence of residual ovarian function.^{24,25}

The SOFT Estrogen Substudy (SOFT-EST), a prospective substudy of SOFT, aims to describe estrogen levels during the first 4 years of adjuvant treatment in patients receiving the GnRHa triptorelin plus either tamoxifen or the AI exemestane and to determine whether a subgroup experiencing suboptimal estrogen suppression exists among patients on exemestane plus triptorelin. For estrogen measurements, gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS/MS), a benchmark assay,^{26,27} was used. We report results of a preplanned analysis during first 12 months of treatment.

PATIENTS AND METHODS

Study Design

The design of the parent SOFT trial has been described elsewhere.^{17,18} Briefly, 3,066 women remaining premenopausal after (neo)adjuvant chemotherapy or for whom adjuvant tamoxifen alone was considered a suitable treatment were randomly assigned to 5-year treatment with exemestane plus OFS, tamoxifen plus OFS, or tamoxifen alone. OFS was achieved by choice of triptorelin acetate (Decapeptyl Depot, Ipsen, Paris, France; 3.75 mg intramuscularly every 28 ± 3 days), bilateral oophorectomy, or ovarian irradiation. In patients with prior chemotherapy, eligibility was on the basis of local E2 level within premenopausal range, with menses not required. Because chemotherapy can induce transient ovarian suppression, random assignment was permitted up to 8 months after completing chemotherapy, and tamoxifen was allowed until recovery of premenopausal E2 level. Follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) measurements were not required because tamoxifen may lower gonadotropin levels in some postmenopausal women into premenopausal range. For patients without prior chemotherapy, random assignment was permitted until 12 weeks from breast surgery, and premenopausal status was defined by regular menses (prior 6 months) or local E2 level in the premenopausal range. In the tamoxifen plus OFS group, tamoxifen was started with triptorelin, whereas exemestane was recommended to begin 6 to 8 weeks after triptorelin initiation.

All patients enrolled in SOFT at 24 selected sites who were randomly assigned to tamoxifen plus OFS or exemestane plus OFS and who chose triptorelin as the OFS method were offered participation in the SOFT-EST

substudy. An inclusion ratio of 1:3 was planned, to enroll 30 patients receiving tamoxifen plus triptorelin and 90 patients receiving exemestane plus triptorelin. The baseline sample was collected before trial treatment initiation and thereafter at 3, 6, 12, 18, 24, 36, and 48 months, and samples were taken while fasting and before triptorelin injection. Compliance was assessed during visits by patient diaries. The SOLTI Group coordinated sample collection, and the International Breast Cancer Study Group Statistical Center performed the data analysis.

Study Objectives

After study activation, we planned an early analysis providing 12-month results coinciding with first SOFT efficacy results and an analysis providing 4-year results coinciding with a subsequent update of SOFT. The objectives for the 4-year SOFT-EST study are available at ClinicalTrials.gov (Data Supplement). The primary objectives for this 12-month analysis were to describe E2, estrone (E1), and estrone sulfate (E1S) levels at different time points (3, 6, and 12 months) and to assess the proportion of patients receiving exemestane plus triptorelin with E2 levels greater than 2.72 pg/mL (> 10 pmol/L²⁴), a strict threshold to indicate E2 inconsistent with postmenopausal levels on AI, at each postbaseline time point. The secondary objectives were to assess the differential effects of exemestane plus triptorelin versus tamoxifen plus triptorelin on estrogen, FSH, and LH levels; describe estrogen dynamics in exemestane plus triptorelin-treated patients with E2 levels greater than 2.72 pg/mL at any time point; and explore the characteristics of these patients. In patients treated with exemestane plus triptorelin, exploratory thresholds of E2 greater than 10 pg/mL and greater than 20 pg/mL were also summarized, representing less stringent thresholds above which E2 was clearly inconsistent with postmenopausal levels on AI and inconsistent with GnRHa-induced postmenopausal status, respectively.

Sample Management and Hormone Assays

Serum aliquots were stored locally at -20°C until shipment to inVentiv Health Clinical Laboratory (Princeton, NJ) for estrogen analysis and to Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) for FSH and LH analyses. GC/MS/MS was used to measure E2, E1, and E1S, with a lower limit of quantification (LLQ) of 0.625, 1.56, and 3.13 pg/mL, respectively. Additional data regarding the GC/MS/MS assay and its validation have been described elsewhere.²⁶ No cross-reactivity with exemestane was observed in an ad hoc experiment conducted before testing samples. All samples from the first 12 months of protocol treatment were run consecutively without knowledge of treatment assignment.

LH and FSH levels were determined by electrochemiluminescence with a Cobas 6000 automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The measurement range was 0.100 to 200 mIU/mL (defined by the lower detection limit and the maximum of the master curve) for both tests.

Statistical Methods

Longitudinal estrogen and FSH/LH levels were summarized descriptively. Values less than the LLQ were imputed at the LLQ. Among patients randomly assigned to exemestane plus triptorelin, the proportions of patients with E2 greater than 2.72 pg/mL at each time point, along with the 95% exact binomial CIs, were reported. Patient characteristics potentially related to estrogen suppression (ie, age, body mass index [BMI], and menstruation status at random assignment; prior chemotherapy and tamoxifen use; smoking history; and baseline estrogen, FSH, and LH levels) were compared between patients who had on-treatment E2 levels greater than 2.72 pg/mL at any time point and patients who did not using *t* tests, Wilcoxon rank sum tests, or Fisher's exact tests.

Comparisons of estrogen and gonadotropin levels between treatment groups at each time point were performed using exact Wilcoxon rank sum tests that handled tied data induced by LLQ.²⁸⁻³⁰ Semiparametric longitudinal modeling of levels over time that adjusted for patient characteristics provided consistent results (Appendix Fig A1, online only).

The protocol estimated, on the basis of a paired Wilcoxon signed rank test ($\alpha = .05$, two-sided), that the sample size of 120 patients total, and 90 and

30 patients receiving exemestane plus triptorelin and tamoxifen plus triptorelin, respectively, provided 90% power to detect a mean difference between time points of 1.2 pg/mL (and 1.4 and 2.5 pg/mL, respectively). A Wilcoxon rank sum test ($\alpha = .05$, two-sided) provided 80% power to detect a mean difference between treatment groups of 2.5 pg/mL at any time point.

values (Appendix Table A1, online only). In the exemestane plus triptorelin group, 56% and 8% of women with or without prior chemotherapy, respectively, had central E2 levels at entry consistent with postmenopausal status (Appendix Table A2, online only).

RESULTS

Study Population

From March 2009 to January 2011, 123 patients were enrolled (tamoxifen plus triptorelin, n = 32; exemestane plus triptorelin, n = 91), of whom 116 patients started triptorelin and had one or more samples analyzed (Fig 1). This group (tamoxifen plus triptorelin, n = 30; exemestane plus triptorelin, n = 86) constituted the analytic cohort (Table 1). Despite meeting the protocol premenopausal definition, 35% of patients in this cohort had baseline E2 levels by GC/MS/MS consistent with postmenopause (≤ 20 pg/mL), which was supported by higher centrally assessed mean FSH and LH

Estrogen Levels Over Time According to Treatment

After accounting for missing samples and early discontinuations during the first year, 79 patients treated with exemestane plus triptorelin with at least one postbaseline sample were analyzed. For the three estrogen fractions, a median reduction from baseline of $\geq 95\%$ at all time points was observed in the exemestane plus triptorelin group after treatment initiation (Table 2). Median E2 and E1 levels were 0.625 and 1.56 pg/mL (ie, LLQ), respectively, at all postbaseline time points, whereas median E1S levels were reduced to 11.7, 14.9, and 10.6 pg/mL at 3, 6, and 12 months, respectively (Fig 2 and Appendix Table A3, online only).

The reductions in E2, E1, and E1S were greater in the exemestane plus triptorelin group than in the tamoxifen plus

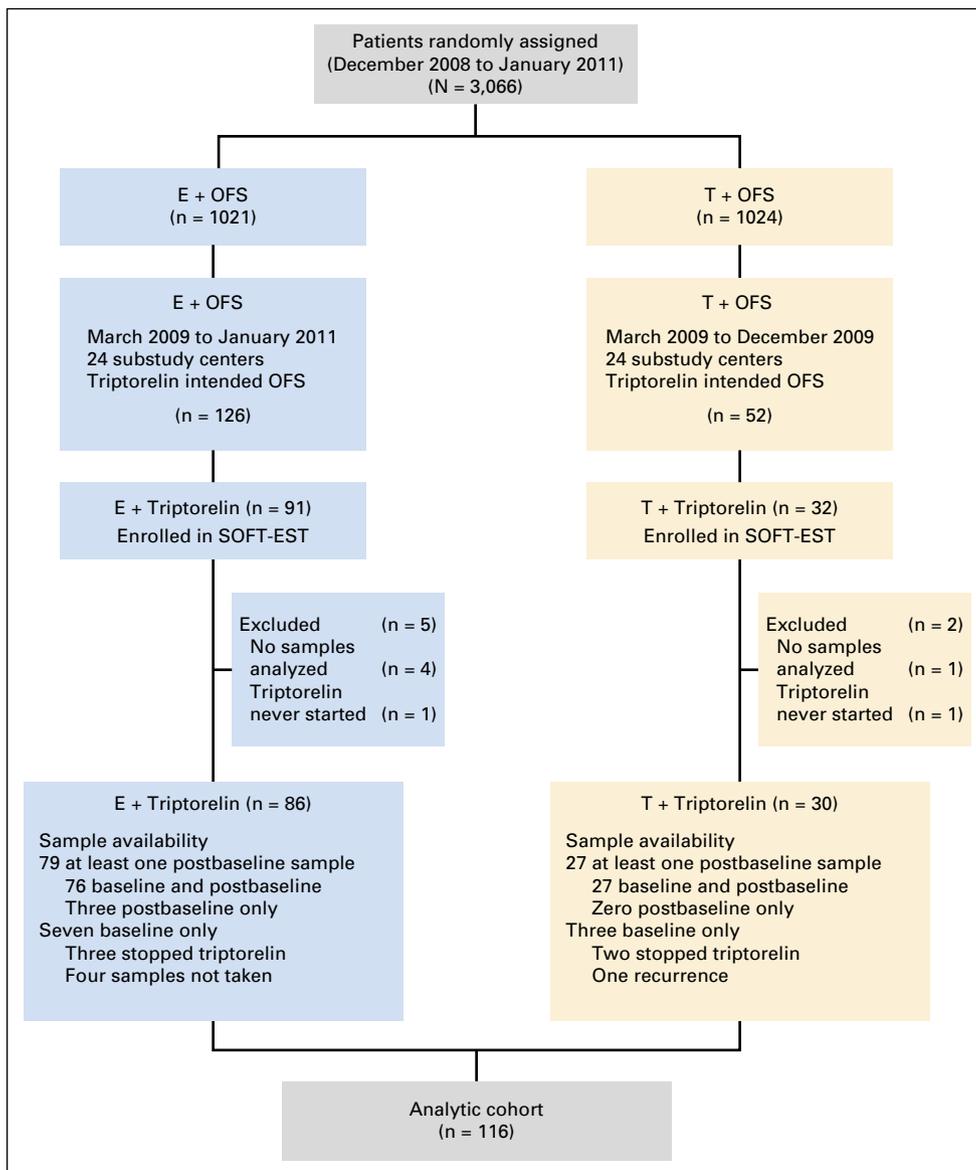


Fig 1. Consort diagram of patient flow from random assignment on the parent Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT) to inclusion in the analytic cohort for the SOFT Estrogen substudy (SOFT-EST). E, exemestane; OFS, ovarian function suppression; T, tamoxifen.

Table 1. Patient and Treatment Characteristics and Baseline (Pretreatment) Hormone Levels in the Analytic Cohort, Overall and According to Treatment Assignment

Characteristic	No. of Patients (%)*		
	Exemestane Plus Triptorelin (n = 86)	Tamoxifen Plus Triptorelin (n = 30)	All Patients (N = 116)
Age at random assignment, years			
Median (IQR)	44 (40-48)	44 (41-48)	44 (41-48)
< 35	8 (9.3)	0 (0.0)	8 (6.9)
35-39	10 (11.6)	6 (20.0)	16 (13.8)
40-44	27 (31.4)	9 (30.0)	36 (31.0)
45-49	31 (36.0)	12 (40.0)	43 (37.1)
Menstruation			
Normal	39 (45.3)	18 (60.0)	57 (49.1)
Irregular	14 (16.3)	3 (10.0)	17 (14.7)
Amenorrhea	33 (38.4)	9 (30.0)	42 (36.2)
Hysterectomy, yes	2 (2.3)	0 (0.0)	2 (1.7)
BMI, kg/m ²			
Median (IQR)	24 (22-28)	23 (22-26)	24 (22-28)
Normal (< 25)	45 (52.3)	19 (63.3)	64 (55.2)
Overweight (25 to < 30)	26 (30.2)	5 (16.7)	31 (26.7)
Obese (≥ 30)	13 (15.1)	4 (13.3)	17 (14.7)
Unknown	2 (2.3)	2 (6.7)	4 (3.4)
Smoking history			
Currently smokes	25 (29.1)	3 (10.0)	28 (24.1)
Stopped smoking	11 (12.8)	9 (30.0)	20 (17.2)
Never smoked	48 (55.8)	18 (60.0)	66 (56.9)
Unknown	2 (2.3)	0 (0.0)	2 (1.7)
Prior chemotherapy			
No	39 (45.3)	13 (43.3)	52 (44.8)
Yes	47 (54.7)	17 (56.7)	64 (55.2)
Chemotherapy regimen			
Anthracycline plus taxane	34 (72.3)	10 (58.8)	44 (68.8)
Anthracycline based	11 (23.4)	4 (23.5)	15 (23.4)
Taxane based	2 (4.3)	3 (17.6)	5 (7.8)
Months from last chemotherapy dose to random assignment, median (IQR)	4 (2-6)	4 (2-6)	4 (2-6)
Prior tamoxifen			
No	58 (67.4)	22 (73.3)	80 (69.0)
Yes	28 (32.6)	8 (26.7)	36 (31.0)
Prior tamoxifen duration, weeks, median (IQR)	16 (9-20)	21 (10-23)	18 (9-21)
Hormone levels			
Estradiol, pg/mL			
Median (IQR)	49.9 (6.8-110.0)	72.5 (6.2-199.0)	50.6 (6.5-124.0)
No. of missing samples	3	0	3
Estrone, pg/mL			
Median (IQR)	43.6 (24.0-70.0)	39.2 (24.8-102.2)	41.8 (24.1-71.3)
No. of missing samples	3	0	3
Estrone sulfate, pg/mL			
Median (IQR)	784.0 (315.0-1,320.0)	1,000.0 (272.2-1,620.0)	894.0 (307.0-1,380.0)
No. of missing samples	3	0	3
FSH, IU/L			
Median (IQR)	19.6 (7.6-47.9)	13.7 (6.4-41.8)	15.5 (6.9-46.8)
No. of missing samples	6	1	7
LH, IU/L			
Median (IQR)	15.9 (5.9-26.8)	10.3 (6.9-30.4)	13.7 (6.0-27.7)
No. of missing samples	5	1	6

Abbreviations: BMI, body mass index; FSH, follicle-stimulating hormone; IQR, interquartile range; LH, luteinizing hormone.

*Values are numbers and percentages of patients, unless noted otherwise.

triptorelin group ($P < .001$ for each postbaseline time point; Fig 2). Estrogen values over time according to treatment group are summarized in Appendix Table A3.

Patients With E2 Greater Than 2.72 pg/mL in Exemestane Plus Triptorelin Group

In total, 27 (34.2%; 95% CI, 23.9% to 45.7%) of 79 patients had at least one postbaseline E2 value greater than 2.72 pg/mL. At 3, 6, and

12 months, 25%, 24%, and 17% of patients, respectively, had E2 levels greater than 2.72 pg/mL. These results, and those obtained by exploring additional thresholds of 10 and 20 pg/mL, are summarized in Fig 3 and are further summarized according to prior chemotherapy use in Appendix Table A2. Two patients in the exemestane plus triptorelin group experienced vaginal bleeding more than 3 months after triptorelin initiation, but elevated E2 (41 pg/mL) was centrally demonstrated in only one patient (Appendix Table A4, online only).

Table 2. Percent Change in Estrogen Levels From Baseline to Each Time Point Among Patients Randomly Assigned to Exemestane Plus Triptorelin

Estrogen Level	Percentage of Change From Baseline		
	3 Months	6 Months	12 Months
No. of patients*	64	66	63
Estradiol, pg/mL			
Mean (SD)	-76 (76)	-82 (62)	-85 (46)
Geometric mean	-88	-90	-83
Median (IQR)	-96 (-99 to -83)	-96 (-99 to -85)	-97 (-99 to -87)
Estrone, pg/mL			
Mean (SD)	-90 (18)	-87 (27)	-82 (61)
Geometric mean	-78	-79	-91
Median (IQR)	-95 (-98 to -91)	-95 (-98 to -91)	-95 (-98 to -90)
Estrone sulfate, pg/mL			
Mean (SD)	-89 (27)	-86 (36)	-93 (13)
Geometric mean	-90	-89	-92
Median (IQR)	-98 (-99 to -93)	-97 (-99 to -92)	-98 (-99 to -94)

Abbreviations: IQR, interquartile range; SD, standard deviation.
 *Denotes the number of patients with two samples, at baseline and at specified time point, to calculate change.

The estrogen levels over time for the 27 patients who had at least one postbaseline E2 level greater than 2.72 pg/mL are displayed in Fig 4. Among them, 14 and nine patients had E2 levels greater than the threshold at one and two postbaseline time points, respectively. Four patients (three of whom were younger than age 35 years and three of whom had not received prior chemotherapy) had E2 levels greater than 2.72 pg/mL at all three postbaseline time points, which corresponds to 8% of the women (four of 48 women) with all three postbaseline samples analyzed (Appendix Table A5, online only).

These 27 patients had lower baseline FSH ($P = .002$) and LH ($P = .004$), had higher BMI ($P = .05$), and were less likely to have received prior chemotherapy ($P = .06$) than patients whose E2 levels remained less than 2.72 pg/mL (Table 3).

FSH and LH Levels Over Time

FSH and LH levels showed a marked reduction after treatment initiation in both groups (Appendix Fig A2, online only). Median FSH values were higher in the exemestane plus triptorelin group compared with the tamoxifen plus triptorelin group ($P < .001$ at each postbaseline time point). Conversely, LH values were persistently lower ($P \leq .01$ at each postbaseline time point) in the exemestane plus triptorelin group compared with the tamoxifen plus triptorelin group.

DISCUSSION

In this study, 66% of premenopausal patients treated with exemestane plus triptorelin showed a profound, persistent reduction in E2 levels during the first 12 months of treatment. This decrease was significantly greater than in the tamoxifen plus triptorelin group at all time points. However, at least 17% of patients had an E2 level greater than 2.72 pg/mL at each time point. Overall, 34% of patients receiving exemestane plus triptorelin had an E2 level greater than the predefined threshold at least once. This finding was more frequent in chemotherapy-naïve patients (46%) and in patients younger than age 35 years (four of eight women;

Table 3). We now consider the methodology, prior studies, and the chosen threshold in interpreting the clinical relevance of these results.

The reliable measurement of estrogen levels is challenging given the low levels expected in this study.²⁹ The use of GC/MS/MS, a benchmark assay^{26,27,31} with high specificity and sensitivity, ensures accuracy. GC/MS/MS has one of the lowest limits of quantification for each estrogen component and has been shown to lack exemestane cross-reactivity,^{6,32} as we verified. In comparison with other direct and indirect assay results, mean E2 values measured by GC/MS/MS are lower in postmenopausal women (4.0 to 7.3 pg/mL^{26,27,32}) and, importantly, in postmenopausal patients on AI (< 0.65 pg/mL in all samples from letrozole-treated patients²⁶). Furthermore, the complete estrogen profile obtained, which is a unique feature in an international study, provides insight into the estrogen pharmacodynamic effect because E1 is the main product of the aromatase enzyme and E1S is the most abundant estrogen fraction in plasma and, therefore, relevant to the degree of estrogen suppression.

As a result of the high sensitivity of GC/MS/MS and the lower estrogen levels observed, we prospectively selected the E2 threshold of 2.72 pg/mL²⁴ to define suboptimal suppression in patients receiving triptorelin plus exemestane. Using ultrasensitive assays, similar thresholds (2.18 or 2.72 pg/mL) have previously been suggested to determine E2 levels not consistent with postmenopausal status on AIs.^{33,34} Nevertheless, the clinical implication of these ultra-low E2 thresholds is still uncertain. In the postmenopausal setting, small differences in the degree of aromatase inhibition and estrogen suppression between the third-generation AIs³⁵⁻³⁸ have not translated into clinically meaningful differences in efficacy in head-to-head comparisons in early or advanced disease.^{39,40} Therefore, and as in other studies,^{33,34} we explored two additional less stringent E2 cutoff values, finding that 18% and 13% of patients had E2 levels greater than 10 and greater than 20 pg/mL, respectively, at least once during the 12-month period. However, these were mostly nonpersistent E2 increases, because only six women (8%) and one woman (1%) had E2 values greater than these two thresholds, respectively, at more than one postbaseline time point (Appendix Table A2).

Similar results have been reported in the adjuvant Hormonal Bone Effects (HOBEO) trial,⁹ in which patients were randomly assigned to receive triptorelin plus either letrozole or tamoxifen, and hormone levels were evaluated at baseline and after 6 months. Consistent with our findings, median E2 levels were lower in the AI group than in the tamoxifen group. The median on-treatment FSH and LH levels showed a decline in both treatment groups, with LH levels significantly lower and FSH significantly higher in the AI group compared with the tamoxifen group. These complex gonadotropin dynamics probably result from the direct suppressive effect of the GnRHa, together with the decrease in E2 that removes E2 physiologic feedback on gonadotropins (FSH is more sensitive to this than LH) and the direct effect of tamoxifen on the pituitary.

Aside from the AI used, the HOBEO trial differs from SOFT-EST in several respects. The HOBEO trial was a single-institution study in which premenopausal status was determined before chemotherapy, and only one postbaseline time point was assessed for 81 patients (letrozole plus triptorelin, n = 51; tamoxifen plus

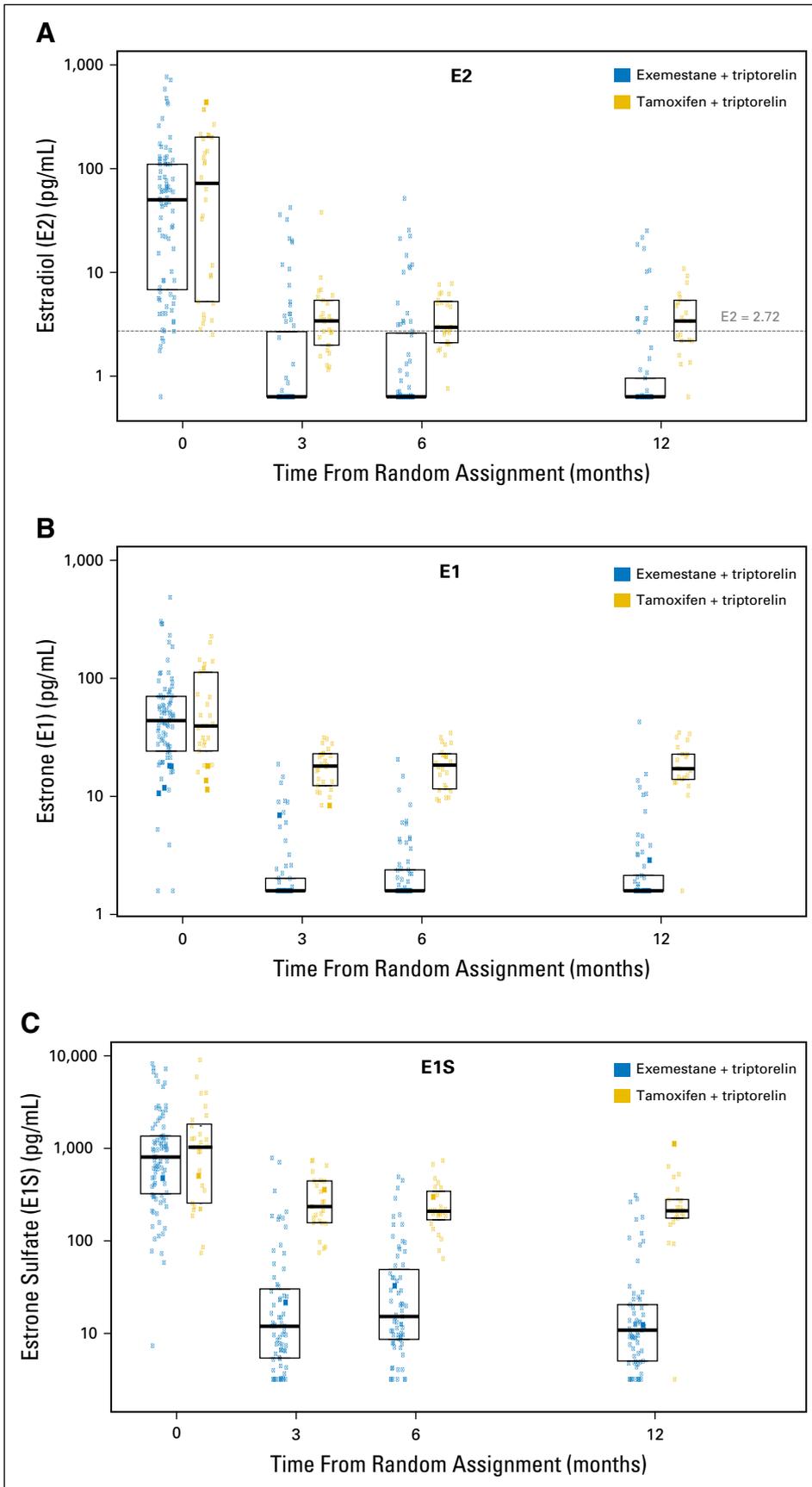


Fig 2. Distributions of (A) estradiol (E2), (B) estrone (E1), and (C) estrone sulfate (E1S) over time according to treatment assignment. Boxes indicate the 25th, 50th, and 75th percentiles. (A) The horizontal dashed line indicates the threshold of 2.72 pg/mL. Levels were significantly different at each postbaseline time point (each $P < .001$).

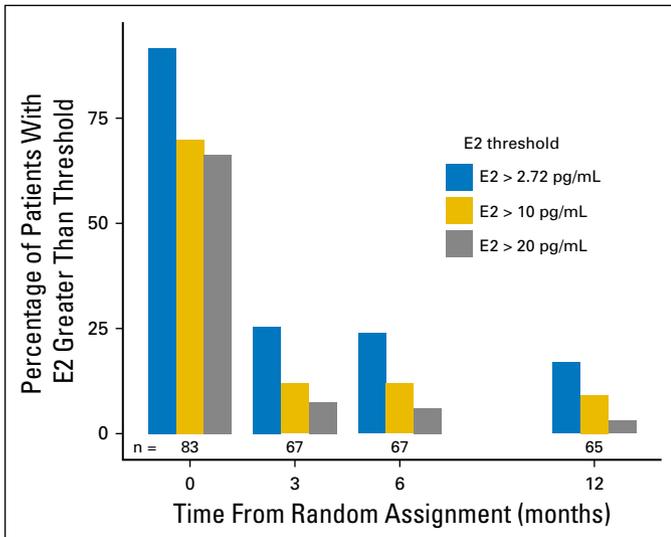


Fig 3. Percentages of patients in the exemestane plus triptorelin group with estradiol (E2) values greater than the predefined threshold (> 2.72 pg/mL, which defines a strict threshold to indicate E2 inconsistent with postmenopausal levels on an aromatase inhibitor) and greater than two additional exploratory thresholds (> 10 and > 20 pg/mL, representing a less strict threshold above which E2 was clearly inconsistent with postmenopausal levels on an aromatase inhibitor and a threshold above which E2 was inconsistent with gonadotropin-releasing hormone agonist-related postmenopausal status, respectively) at each time point. The number of patients tested at each time point is shown at the bottom of the bars.

triptorelin, n = 30). The main objective was to compare endocrine effects between treatments, including adrenal function, but not to explore suboptimal estrogen suppression in the letrozole plus triptorelin group. A much less sensitive electrochemiluminescence immunoassay (LLQ, 5 pg/mL) was used for E2 measurements, and E1 and E1S were not studied.⁹

Other studies have addressed estrogen suppression with GnRHa plus AI in the neoadjuvant and metastatic settings. Many are flawed by the use of low-sensitivity assays,^{4,8,9,13,15,16} short follow-up duration,^{6,9,11,12,14,15,22,23} and small numbers of patients.^{6,11,12,22,23} In addition to the accurate estrogen measurements, the SOFT-EST substudy constitutes, to our knowledge, the largest series addressing estrogen levels in premenopausal women on GnRHa plus AI, with the longest sampling duration (until 48 months), and uniquely conducted in the context of an international phase III trial.

Our study is limited by early discontinuations, missing samples, and the uncertain clinical value associated with isolated E2 increases. Overall, 48 patients in the exemestane plus triptorelin group had all three postbaseline samples analyzed within the first year of treatment. However, 8% of patients (four of 48 patients) had E2 levels greater than 2.72 pg/mL at all three time points, which would most likely have an unfavorable impact on the prognosis of these patients.

A high proportion of E2 and E1 values less than the LLQ were observed (> 81% and > 83% at any time point, respectively; Appendix Table A3), demonstrating that a profound estrogen reduction is possible in premenopausal women receiving exemestane plus triptorelin. Conversely, to understand why a minority of women and samples showed E2 values greater than 2.72 pg/mL is complex, and the SOFT-EST study was not designed

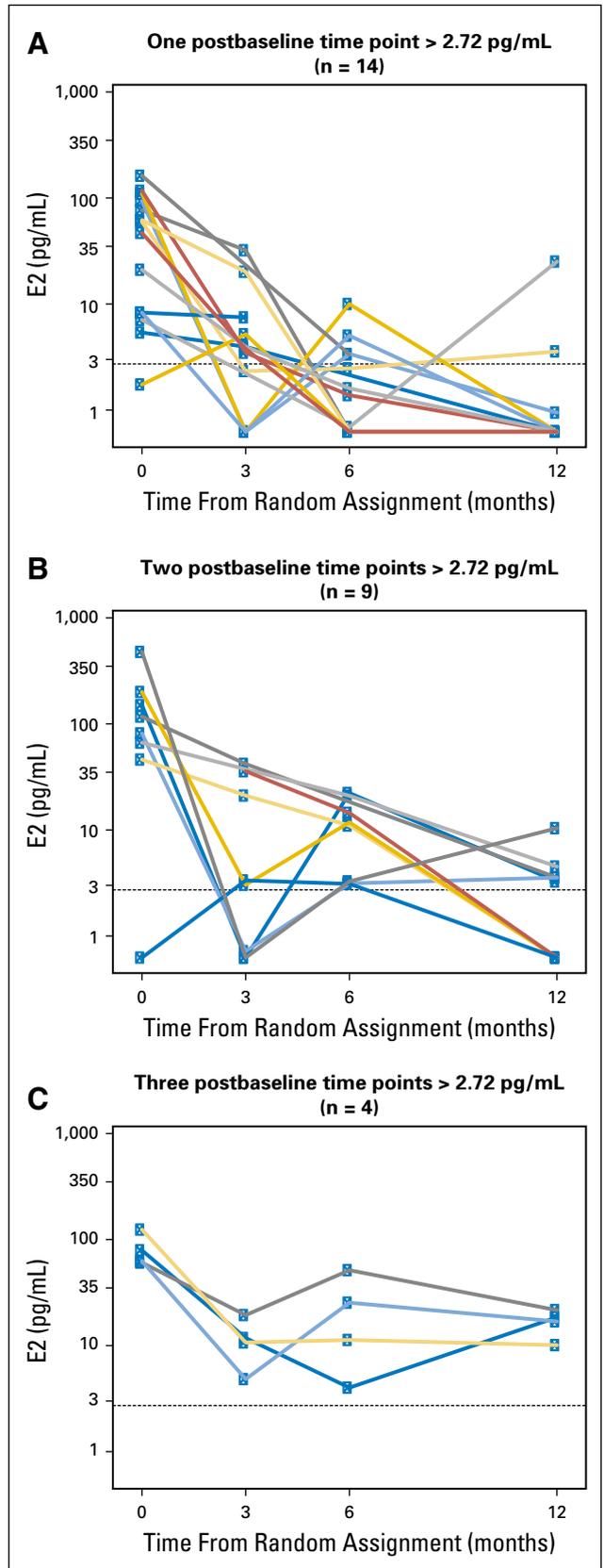


Fig 4. Estradiol (E2) levels over time for 27 patients with at least one E2 level greater than 2.72 pg/mL according to the number (one, two, or three) of post-baseline samples with E2 level greater than 2.72 pg/mL. The horizontal dashed line indicates the threshold of 2.72 pg/mL.

Table 3. Characteristics of Patients Randomly Assigned to Exemestane Plus Triptorelin Who Had at Least One Postbaseline Sample Analyzed, According to Occurrence of E2 Level Greater Than 2.72 pg/mL During at Least One Time Point

Characteristic	No. of Patients (%)*			P
	Postbaseline E2		All Patients (N = 79)	
	All Assay Values < 2.72 pg/mL (n = 52)	At Least One Assay Value > 2.72 pg/mL (n = 27)		
Age at random assignment, years				
Median (IQR)	44 (40-48)	45 (40-48)	44 (40-48)	.792
< 35	4 (7.7)	4 (14.8)	8 (10.1)	
Menstruation				
Normal	12 (23.1)	2 (7.4)	14 (17.7)	.162
Irregular	20 (38.5)	10 (37.0)	30 (38.0)	
Amenorrhea	20 (38.5)	15 (55.6)	35 (44.3)	
BMI, kg/m ² , median (IQR)	24 (22-27)	27 (23-29)	24 (22-28)	.054
Smoking history				.926
Currently smokes	15 (28.8)	9 (33.3)	24 (30.4)	
Stopped smoking	7 (13.5)	3 (11.1)	10 (12.7)	
Never smoked	29 (55.8)	14 (51.9)	43 (54.4)	
Unknown	1 (1.9)	1 (3.7)	2 (2.5)	
Prior chemotherapy				.061
No	19 (36.5)	16 (59.3)	35 (44.3)	
Yes	33 (63.5)	11 (40.7)	44 (55.7)	
Chemotherapy regimen				.788
Anthracycline plus taxane	25 (75.8)	8 (72.7)	33 (75.0)	
Anthracycline-based	7 (21.2)	3 (27.3)	10 (22.7)	
Taxane-based	1 (3.0)	0 (0.0)	1 (2.3)	
Prior chemotherapy duration, weeks, median (IQR)	21 (18-24)	20 (18-24)	20 (18-24)	ND
Prior tamoxifen				.207
No	32 (61.5)	21 (77.8)	53 (67.1)	
Yes	20 (38.5)	6 (22.2)	26 (32.9)	
Prior tamoxifen duration, weeks, median (IQR)	18 (12-20)	12 (10-12)	16 (10-20)	ND
Baseline hormone levels				
E2, pg/mL, median (IQR)	41 (5-110)	65 (27-115)	50 (6-110)	.183
Estrone, pg/mL, median (IQR)	41 (24-72)	47 (22-61)	42 (24-70)	.780
Estrone sulfate, pg/mL				
Median (IQR)	637 (303-1,278)	854 (490-1,282)	712 (306-1,288)	.669
FSH, IU/L, median (IQR)	34 (12-58)	8 (5-34)	21 (8-51)	.002
LH, IU/L, median (IQR)	21 (7-32)	7 (4-20)	16 (6-28)	.004

Abbreviations: BMI, body mass index; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; IQR, interquartile range; LH, luteinizing hormone; ND, not done.
*Values are numbers and percentages of patients, unless noted otherwise.

to assess all possible reasons. Compliance is particularly relevant for a compound with a 24-hour half-life such as exemestane, although because of the irreversible nature of its aromatase inhibition, estrogen levels remain suppressed for 4 days after a 25-mg single-dose administration.⁴¹ Other variables that can influence pharmacodynamic effects of AIs, such as polymorphisms in the *CYP19* aromatase gene,^{42,43} were not studied. In addition, compliance with the every-28-day triptorelin injections is relevant, but there was no evidence of missed injections or overt delays between injections (Appendix Tables A6-A8, online only). Variability of the interval between the blood draw and the last triptorelin injection could lead to variability in E2 levels, but no pattern was evident (Appendix Fig A3, online only).

The analysis of potential predictive factors for suboptimal suppression, albeit exploratory, reinforces the additional role of FSH and LH levels to better define a truly premenopausal status, particularly after chemotherapy, which is superior to that provided by locally assessed E2 levels that defined eligibility for the SOFT trial. Even with serial estrogen and gonadotropin assessments, establishing a definitive menopausal status remains elusive, and the

possibility of a later recovery still exists, as illustrated by E2 levels greater than 2.72 pg/mL observed during triptorelin plus exemestane among women with baseline postmenopausal levels (Figs 4A and 4B). Of note, higher BMI was marginally associated with increases in E2 greater than 2.72 pg/mL. The relationship of obesity with higher E2 and E1S has been recently reported in postmenopausal patients with advanced breast cancer on non-steroidal AIs.⁴⁴ However, its impact on clinical resistance to AIs in premenopausal plus ovarian suppression and postmenopausal populations is not clear.⁴⁴⁻⁴⁷

The findings of this substudy should be viewed in light of the results of SOFT and TEXT trials. The SOFT and TEXT combined analysis¹⁷ showed improved disease-free survival with exemestane plus OFS compared with tamoxifen plus OFS, whereas the SOFT trial showed benefits in freedom from breast cancer with tamoxifen plus OFS compared with tamoxifen alone, which were further improved with exemestane plus OFS in patient who received prior chemotherapy and in the youngest patients. Therefore, exemestane plus OFS has emerged as a new option in adjuvant endocrine therapy for premenopausal women. Considering that treatment

with a GnRHa plus AI will be increasingly adopted, knowing whether a patient has suboptimal estrogen suppression in real time will become clinically important. Of note, although age was not related to isolated suboptimal suppression in our substudy, the population younger than age 35 years was small (eight women, all in the exemestane plus triptorelin group), and we observed that sustained suboptimal suppression was mainly seen in these youngest women (three patients, two of whom were chemotherapy naïve). In contrast to SOFT results (greatest benefit from OFS in population younger than age 35 years), this finding might be explained by the lower proportion of patients younger than age 35 in SOFT-EST who received prior chemotherapy (50% v 94% in SOFT). Additionally, our substudy revealed that 56% of women who received prior chemotherapy may actually have been postmenopausal at random assignment, which raises the possibility of a diluted effect of OFS in SOFT.

In conclusion, in our study, the majority of premenopausal patients with breast cancer treated with exemestane plus triptorelin had a profound reduction in estrogen levels during the first 12 months of treatment, which was similar to that reported in postmenopausal patients on AI. One-third of patients had an E2 level inconsistent with that expected for a postmenopausal level on AI (< 2.72 pg/mL) at least once. Further analysis of the 4-year data

will better establish the dynamics of estrogen levels over time at the individual patient level.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Disclosures provided by the authors are available with this article at www.jco.org.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Meritxell Bellet, Prudence A. Francis, Josefa Morales, Josep Vázquez, Karen N. Price, Meredith M. Regan
Administrative support: Josefa Morales, Josep Vázquez
Provision of study materials or patients: Josefa Morales, Josep Vázquez
Collection and assembly of data: Meritxell Bellet, Prudence A. Francis, István Láng, Eva Ciruelos, Ana Lluch, Miguel Angel Climent, Gustavo Catalán, Antoni Avella, Uriel Bohn, Antonio González-Martin, Roberto Catalán, Analia Azaro, Agnita Rajasekaran, Josefa Morales, Meredith M. Regan
Data analysis and interpretation: Meritxell Bellet, Kathryn P. Gray, Prudence A. Francis, Roser Ferrer, Gini F. Fleming, Karen N. Price, Meredith M. Regan
Manuscript writing: All authors
Final approval of manuscript: All authors

REFERENCES

1. Beatson GW. On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 2:104-107, 162-165, 1896
2. Boccardo F, Rubagotti A, Perrotta A, et al: Ovarian ablation versus goserelin with or without tamoxifen in pre-perimenopausal patients with advanced breast cancer: Results of a multicentric Italian study. *Ann Oncol* 5:337-342, 1994
3. Taylor CW, Green S, Dalton WS, et al: Multicenter randomized clinical trial of goserelin versus surgical ovariectomy in premenopausal patients with receptor-positive metastatic breast cancer: An intergroup study. *J Clin Oncol* 16: 994-999, 1998
4. Blamey RW, Jonat W, Kaufmann M, et al: Goserelin depot in the treatment of premenopausal advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 28A:810-814, 1992
5. Schmid P, Untch M, Kossé V, et al: Leuprorelin acetate every-3-months depot versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant treatment in premenopausal patients with node-positive breast cancer: The TABLE study. *J Clin Oncol* 25:2509-2515, 2007
6. Jannuzo MG, Di Salle E, Spinelli R, et al: Estrogen suppression in premenopausal women following 8 weeks of treatment with exemestane and triptorelin versus triptorelin alone. *Breast Cancer Res Treat* 113:491-499, 2009
7. Walker KJ, Walker RF, Turkes A, et al: Endocrine effects of combination antioestrogen and LH-RH agonist therapy in premenopausal patients with advanced breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25:651-654, 1989
8. Klijn JG, Beex LV, Mauriac L, et al: Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: A randomized study. *J Natl Cancer Inst* 92:903-911, 2000
9. Rossi E, Morabito A, De Maio E, et al: Endocrine effects of adjuvant letrozole + triptorelin compared with tamoxifen + triptorelin in premenopausal patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 26: 264-270, 2008
10. Masuda N, Sagara Y, Kinoshita T, et al: Neoadjuvant anastrozole versus tamoxifen in patients receiving goserelin for premenopausal breast cancer (STAGE): A double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13:345-352, 2012
11. Celio L, Martinetti A, Ferrari L, et al: Premenopausal breast cancer patients treated with a gonadotropin-releasing hormone analog alone or in combination with an aromatase inhibitor: A comparative endocrine study. *Anticancer Res* 19:2261-2268, 1999
12. Forward DP, Cheung KL, Jackson L, et al: Clinical and endocrine data for goserelin plus anastrozole as second-line endocrine therapy for premenopausal advanced breast cancer. *Br J Cancer* 90: 590-594, 2004
13. Torrisi R, Bagnardi V, Pruneri G, et al: Antitumour and biological effects of letrozole and GnRH analogue as primary therapy in premenopausal women with ER and PgR positive locally advanced operable breast cancer. *Br J Cancer* 97:802-808, 2007
14. Cheung KL, Agrawal A, Folkler E, et al: Suppression of ovarian function in combination with an aromatase inhibitor as treatment for advanced breast cancer in premenopausal women. *Eur J Cancer* 46: 2936-2942, 2010
15. Carlson RW, Schurman CM, et al: Phase II trial of anastrozole plus goserelin in the treatment of hormone receptor-positive, metastatic carcinoma of the breast in premenopausal women. *J Clin Oncol* 28: 3917-3921, 2010
16. Park IH, Ro J, Lee KS, et al: Phase II parallel group study showing comparable efficacy between premenopausal metastatic breast cancer patients treated with letrozole plus goserelin and postmenopausal patients treated with letrozole alone as first-line hormone therapy. *J Clin Oncol* 28: 2705-2711, 2010
17. Pagani O, Regan MM, Walley BA, et al: TEXT and SOFT Investigators; International Breast Cancer Study Group: Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 371:107-118, 2014
18. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, et al: Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 372:1673, 2015
19. Soysal S, Soysal ME, Ozer S, et al: The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: A prospective randomized trial. *Hum Reprod* 19:160-167, 2004
20. Reichel RP, Schweppe KW; Zoladex Endometriosis Study Group: Goserelin (Zoladex) depot in the treatment of endometriosis. *Fertil Steril* 57: 1197-1202, 1992
21. Filicori M, Flamigni C, Cognigni G, et al: Comparison of the suppressive capacity of different depot gonadotropin-releasing hormone analogs in women. *J Clin Endocrinol Metab* 77:130-133, 1993
22. Dowsett M, Stein RC, Coombes RC: Aromatization inhibition alone or in combination with GnRH agonists for the treatment of premenopausal breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 155-159, 1992
23. Dowsett M, Doody D, Miall S, et al: Vorozole results in greater oestrogen suppression than formestane in postmenopausal women and when added to goserelin in premenopausal women with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 56: 25-34, 1999
24. Smith IE, Dowsett M, Yap YS, et al: Adjuvant aromatase inhibitors for early breast cancer after chemotherapy-induced amenorrhoea: Caution and suggested guidelines. *J Clin Oncol* 24:2444-2447, 2006
25. Burstein HJ, Mayer E, Patridge AH, et al: Inadvertent use of aromatase inhibitors in patients with breast cancer with residual ovarian function: Cases and lessons. *Clin Breast Cancer* 7:158-161, 2006

26. Santen RJ, Demers L, Ohorodnik S, et al: Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy. *Steroids* 72:666-671, 2007
27. Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, et al: Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3791-3797, 2006
28. Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, et al: A lego system for conditional inference. *Am Stat* 60:257-263, 2006
29. Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, et al: Implementing a class of permutation tests: The coin package. *J Stat Softw* 28:1-23, 2008
30. Hajek J, Sidak Z, Sen PK. *Theory of Rank Tests*. San Diego, CA, Academic Press, 1999
31. Folkert EJ, Lønning PE, Dowsett M: Interpreting plasma estrogen levels in breast cancer: Caution needed. *J Clin Oncol* 32:1396-1400, 2014
32. Lønning PE, Geisler J, Krag LE, et al: Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer. *J Clin Oncol* 23:5126-5137, 2005
33. Guerrero A, Gavilá J, Folkert E, et al: Incidence and predictors of ovarian function recovery (OFR) in breast cancer (BC) patients with chemotherapy-induced amenorrhea (CIA) who switched from tamoxifen to exemestane. *Ann Oncol* 24:674-679, 2013
34. Henry NL, Xia R, Banerjee M, et al: Predictors of recovery of ovarian function during aromatase inhibitor therapy. *Ann Oncol* 24:2011-2016, 2013
35. Geisler J, Haynes B, Anker G, et al: Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* 20:751-757, 2002
36. Dixon JM, Renshaw L, Young O, et al: Letrozole suppresses plasma estradiol and estrone sulphate more completely than anastrozole in postmenopausal women with breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1671-1676, 2008
37. Geisler J, Helle H, Ekse D, et al: Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clin Cancer Res* 14:6330-6335, 2008
38. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, et al: Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype—ACOSOG Z1031. *J Clin Oncol* 29:2342-2349, 2011
39. Rose C, Vtoraya O, Pluzanska A, et al: An open randomised trial of second-line endocrine therapy in advanced breast cancer: Comparison of the aromatase inhibitors letrozole and anastrozole. *Eur J Cancer* 39:2318-2327, 2003
40. Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, et al: Exemestane versus anastrozole in postmenopausal women with early breast cancer: NCIC CTG MA.27—A randomized controlled phase III trial. *J Clin Oncol* 31:1398-1404, 2013
41. Spinelli R, Januzzo MG, Poggesi I, et al: Pharmacokinetics (PK) of aromasin (exemestane, EXE) after single and repeated doses in healthy postmenopausal volunteers (HPV). *Eur J Cancer* 35:S295, 1999 (suppl 4)
42. Wang L, Ellsworth KA, Moon I, et al: Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer Res* 70:319-328, 2010
43. Lunardi G, Piccioli P, Bruzzi P, et al: Plasma estrone sulfate concentrations and genetic variation at the CYP19A1 locus in postmenopausal women with early breast cancer treated with letrozole. *Breast Cancer Res Treat* 137:167-174, 2013
44. Folkert EJ, Dixon JM, Renshaw L, et al: Suppression of plasma estrogen levels by letrozole and anastrozole is related to body mass index in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 30:2977-2980, 2012
45. Sestak I, Distler W, Forbes JF, et al: Effect of body mass index on recurrences in tamoxifen and anastrozole treated women: An exploratory analysis from the ATAC trial. *J Clin Oncol* 28:3411-3415, 2010
46. Ewertz M, Gray KP, Regan MM, et al: Obesity and risk of recurrence or death after adjuvant endocrine therapy with letrozole or tamoxifen in the Breast International Group 1-98 trial. *J Clin Oncol* 30:3967-3975, 2012
47. Pfeiler G, Königsberg R, Fesl C, et al: Impact of body mass index on the efficacy of endocrine therapy in premenopausal patients with breast cancer: An analysis of the prospective ABCSG-12 trial. *J Clin Oncol* 29:2653-2659, 2011

Affiliations

Meritxell Bellet and Analía Azaro, Vall d'Hebron Institute of Oncology; Meritxell Bellet, Roser Ferrer, Roberto Catalán, and Analía Azaro, Vall d'Hebron University Hospital; Meritxell Bellet, Universitat Autònoma de Barcelona; Meritxell Bellet, Eva Ciruelos, Ana Lluch, Miguel Angel Climent, Gustavo Catalán, Antoni Avella, Uriel Bohn, Antonio González-Martin, Josefa Morales, and Josep Vázquez, SOLTI Group, Barcelona; Eva Ciruelos, University Hospital 12 de Octubre; Antonio González-Martin, MD Anderson Cancer Center Madrid, Madrid; Ana Lluch, Hospital Clinico Universitario de Valencia/Incliva Biomedical Research Institute; Miguel Angel Climent, Instituto Valenciano de Oncología, Valencia; Gustavo Catalán, Hospital Son Llàtzer; Antoni Avella, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca; Uriel Bohn, Hospital Dr Negrín de Gran Canaria, Canary Islands, Spain; Kathryn P. Gray and Meredith M. Regan, Dana-Farber Cancer Institute; Kathryn P. Gray, Harvard T.H. Chan School of Public Health; Kathryn P. Gray, Karen N. Price, and Meredith M. Regan, International Breast Cancer Study Group Statistical Center; Karen N. Price, Frontier Science and Technology Research Foundation; Meredith M. Regan, Harvard Medical School, Boston, MA; Agnita Rajasekaran, inVentiv Health Clinical Laboratory, Princeton, NJ; Gini F. Fleming, The University of Chicago Medical Center and Alliance for Clinical Trials in Oncology, Chicago, IL; Prudence A. Francis, Peter MacCallum Cancer Center, St Vincent's Hospital, University of Melbourne, and International Breast Cancer Study Group, Melbourne, Victoria, Australia; and István Láng, National Institute of Oncology and International Breast Cancer Study Group, Budapest, Hungary.



AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Twelve-Month Estrogen Levels in Premenopausal Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer Receiving Adjuvant Triptorelin Plus Exemestane or Tamoxifen in the Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT): The SOFT-EST Substudy

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or jco.ascopubs.org/site/ifc.

Meritxell Bellet

Honoraria: AstraZeneca

Consulting or Advisory Role: AstraZeneca

Kathryn P. Gray

No relationship to disclose

Prudence A. Francis

Honoraria: Pierre Fabre

Travel, Accommodations, Expenses: Amgen, Roche

István Láng

No relationship to disclose

Eva Ciruelos

No relationship to disclose

Ana Lluch

Consulting or Advisory Role: Novartis, Roche, Pfizer

Miguel Angel Climent

Honoraria: Pfizer

Consulting or Advisory Role: Pfizer

Speakers' Bureau: Pfizer

Travel, Accommodations, Expenses: Pfizer

Gustavo Catalán

No relationship to disclose

Antoni Avella

No relationship to disclose

Uriel Bohn

No relationship to disclose

Antonio González-Martin

No relationship to disclose

Roser Ferrer

No relationship to disclose

Roberto Catalán

No relationship to disclose

Analía Azaro

No relationship to disclose

Agnita Rajasekaran

No relationship to disclose

Josefa Morales

No relationship to disclose

Josep Vázquez

Research Funding: Pfizer, Novartis, Roche, Eisai, Sanofi, Bayer, Puma Biotechnology, Pierre Fabre Medicament, Genentech, AstraZeneca

Gini F. Fleming

Research Funding: Corcept

Other Relationship: Aetna Zentaris

Karen N. Price

No relationship to disclose

Meredith M. Regan

Research Funding: Veridex, OncoGenex, Pfizer, Ipsen, Novartis, Merck, Ferring, Celgene, AstraZeneca

Acknowledgment

We thank the patients, physicians, nurses, trial coordinators, and pathologists who participated in the Suppression of Ovarian Function Trial Estrogen Substudy, and the SOLTI Group, the International Breast Cancer Study Group, and Pfizer for study support. We acknowledge Cecilia Guzman, Medical Head Oncology Spain and Portugal Cluster, for her contribution in launching this substudy, and Raquel Espallargas, Senior Study Coordinator at Vall d'Hebron Institute of Research Hospital, for her contribution in the substudy development and sample management.

Appendix

Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT)-EST Investigators and the SOLTI and International Breast Cancer Study Group (IBCSG) Participating Centers

SOFT/TEXT Steering Committee: P.A. Francis (Chair, SOFT Co-Chair), G.F. Fleming (SOFT Co-Chair), M.M. Regan (Trial Statistician), R. Torrissi, L. Blacher, H. Bonnefoi, E. Ciruelos, A.S. Coates, M. Colleoni, N. Dif, R.D. Gelber, A. Goldhirsch, T. Goulioti, T. Heckman-Scolese, A. Hiltbrunner, R. Kammler, R. Maibach, O. Ortmann, O. Pagani, E.A. Perez, K.N. Price, M. Rabaglio, B. Ruepp, K. Tryfonidis, K. Scott, H. Shaw, G. Viale, G. von Minckwitz, B.A. Walley, D. Zardavas, L. Cisar (Pfizer), and E. Chetaille (Ipsen).

IBCSG Coordinating Center, Bern, Switzerland: A. Hiltbrunner (Director), R. Kammler, R. Maibach, M. Rabaglio, S. Roux, B. Ruepp, and P. Sicher.

IBCSG Statistical Center, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA: R.D. Gelber (Director), M.M. Regan (Group Statistician), J. Aldridge, M. Bonetti, Y. Feng, A. Giobbie-Hurder, K.P. Gray, H. Huang, W. Luo, K.N. Price, and L. Zickl.

IBCSG Data Management Center, Frontier Science & Technology Research Foundation, Amherst, NY: L. Blacher (Director), K. Scott (Data Management Section Head), M. Blackwell, A. Cesario, A. Dickinson, K. Donahue, M. Greco, P. Gonzalez, T. Heckman-Scolese, R. Hecker, R. Hinkle, M. Kalera, K. Lupejkis, A. Mora de Karasch, V. Palermo, H. Shaw, R. Starkweather, and J. Swick-Jemison.

Participating Centers and Principal Investigators

Breast International Group (BIG)

SOLTI, SPAIN

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; E. Ciruelos

Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca; J.G. Catalán

Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, Barcelona; M. Muñoz

Hospital Universitari Vall D' Hebron and Vall d'Hebron Institute of Oncology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona;

M. Bellet

Instituto Valenciano de Oncología, Valencia; M.A. Climent

Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca), Palma de Mallorca; A. Avella

H.U. Arnau de Vilanova, Lleida; A. Llombart

Hospital Clinico Universitario de Valencia, Valencia; A. Lluch

Hospital Ramon Y Cajal, Madrid; N. Martínez Jañez

Hospital Sant Joan de Reus, Reus; M. Melé

Hospital Dr Negrin, Las Palmas de Gran Canari; U. Bohn

Centro Oncologico MD Anderson, Madrid; A. González Martín

Hospital Sant Pau i Santa Tecla, Tecla; C. Pérez Segura

IBCSG, HUNGARY

National Institute of Oncology, Budapest; I. Láng

IBCSG, ITALY

Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia; L. Pavesi

Dipartimento di Oncologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine, Udine; F. Puglisi

IBCSG, PERU

Instituto de Enfermedades Neoplásicas, Lima; H.L. Gomez

IBCSG, SWEDEN

Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg; P. Karlsson

SWISS GROUP FOR CLINICAL CANCER RESEARCH (SAKK), SWITZERLAND

Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne; K. Zaman

Estrogen Levels in Premenopausal Women Receiving Triptorelin

Onkologiezentrum Thun-Berner Oberland, Thun; D. Rauch

Brust-Zentrum Zurich, Zurich; C. Rageth

Kantonsspital Graubünden; R. von Moos

EUROPEAN ORGANIZATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, FRANCE

Centre Rene Huguenin, Saint-Cloud; E. Brain

EUROPEAN ORGANIZATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, PORTUGUAL

Centro de Lisboa, Lisboa; A. Moreira

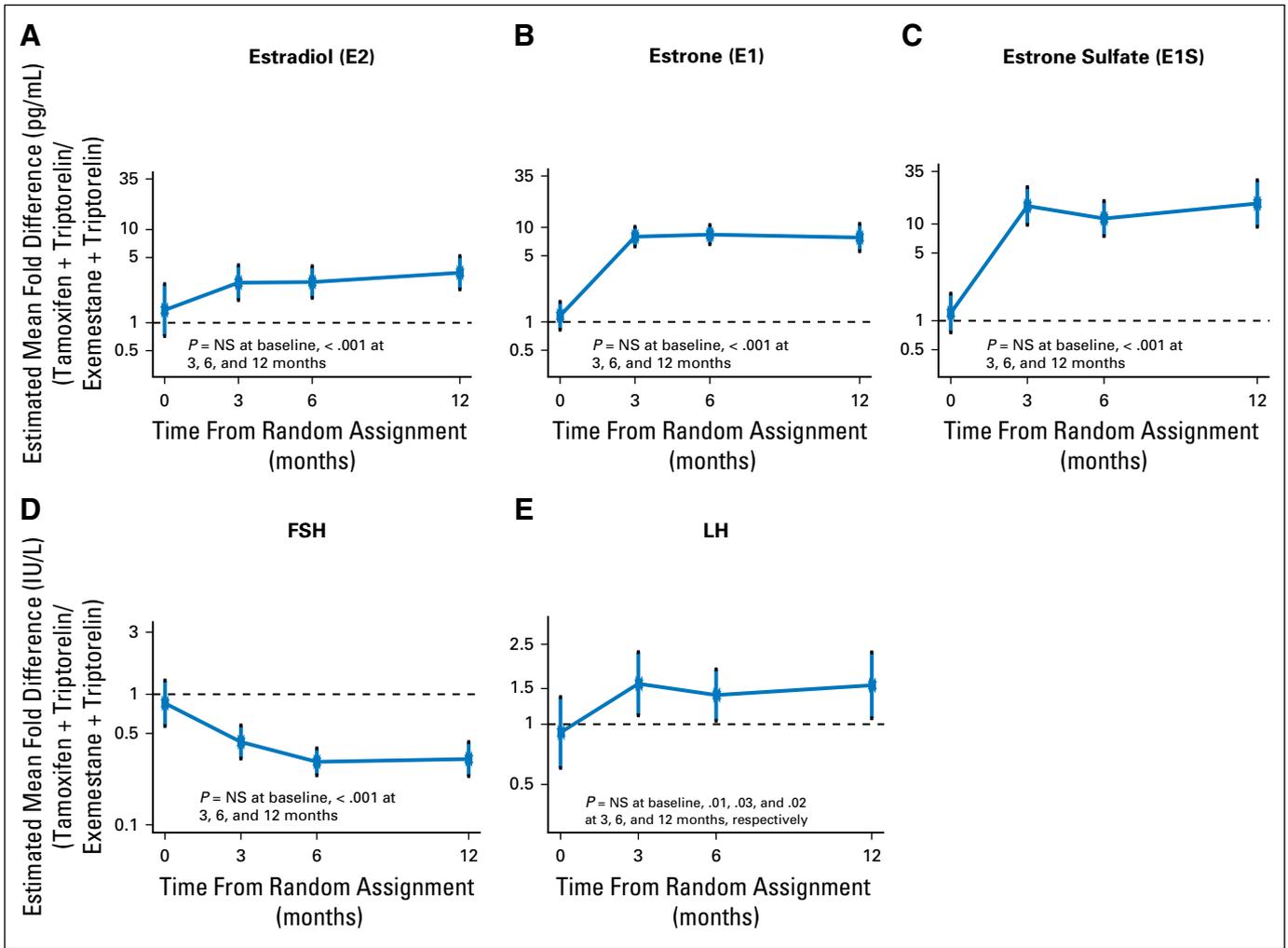


Fig A1. Estimated mean fold-difference between treatment groups (tamoxifen plus triptorelin relative to exemestane plus triptorelin) for each hormone level over time. Levels (log10-transformed) were modeled using generalized estimating equation (GEE) as a function of time point, treatment assignment, the treatment-by-time interaction, and patient characteristics, accounting for correlation of longitudinal values. Mean fold-differences are plotted with 95% CIs. SE used robust (sandwich) variance calculation. The horizontal dashed line at 1 indicates no difference. NS=not statistically significant.

Estrogen Levels in Premenopausal Women Receiving Triptorelin

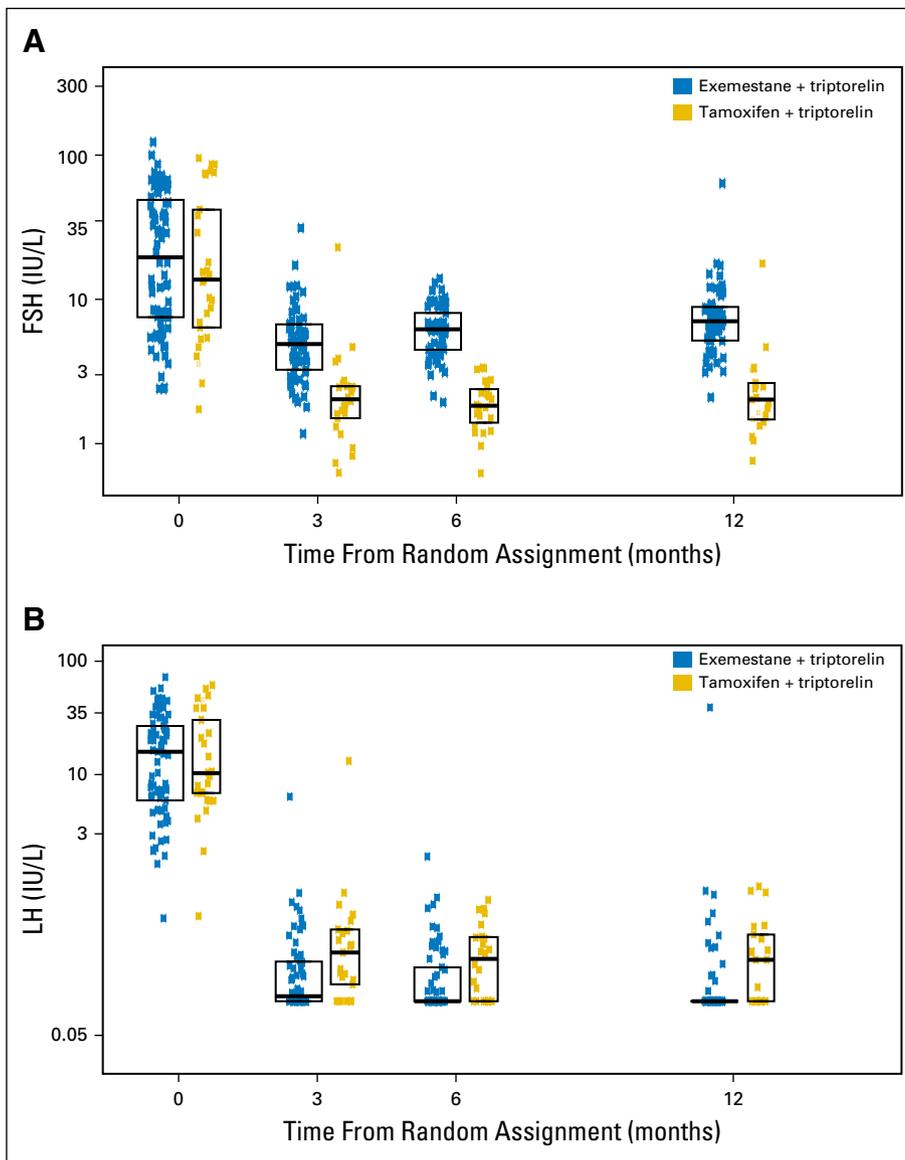


Fig A2. Distribution of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) levels over time according to treatment assignment. Boxes indicate the 25th, 50th, and 75th percentiles.

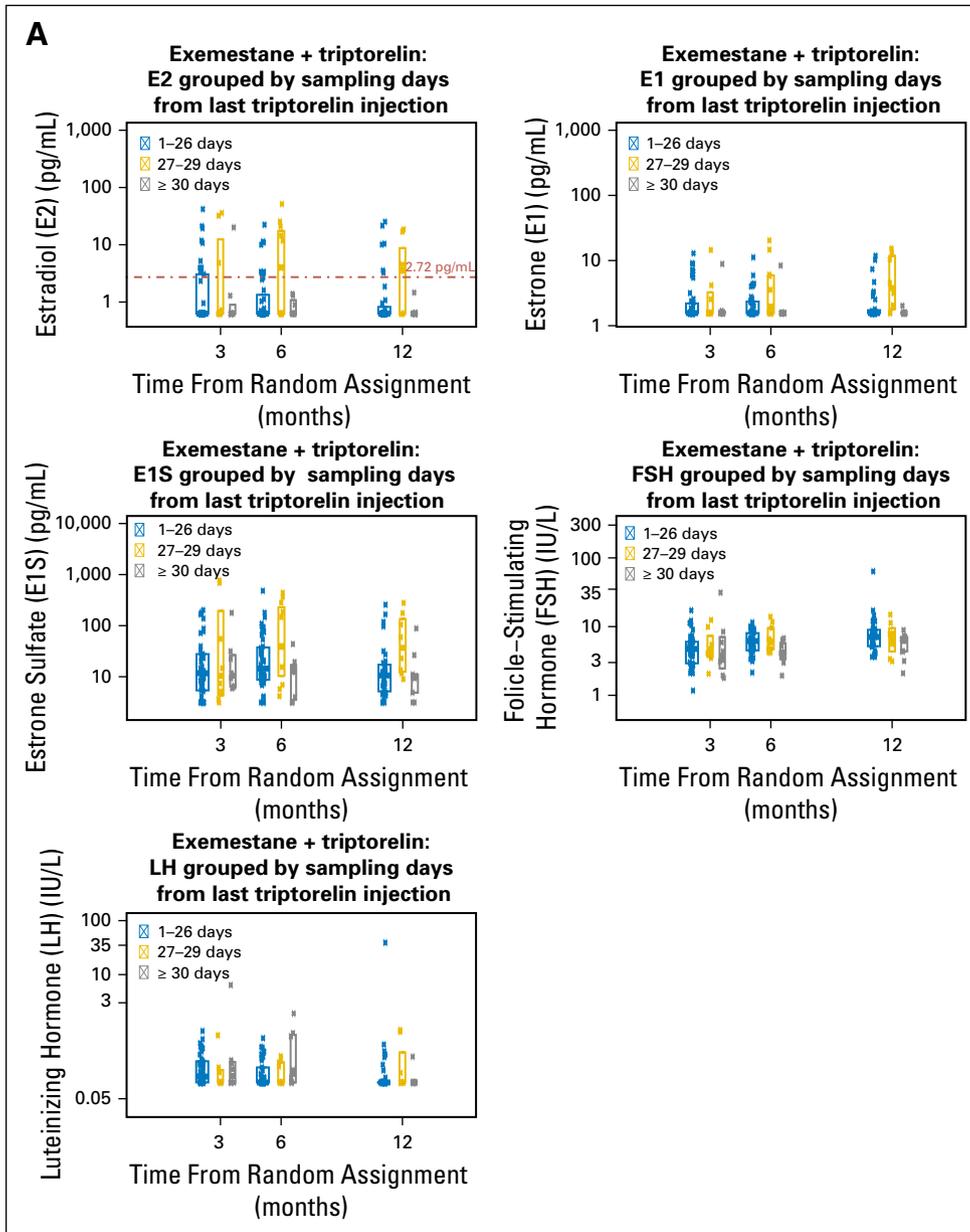


Fig A3. Distribution of estrogen and gonadotropin levels at each scheduled sampling time grouped by sampling days from last triptorelin injection.

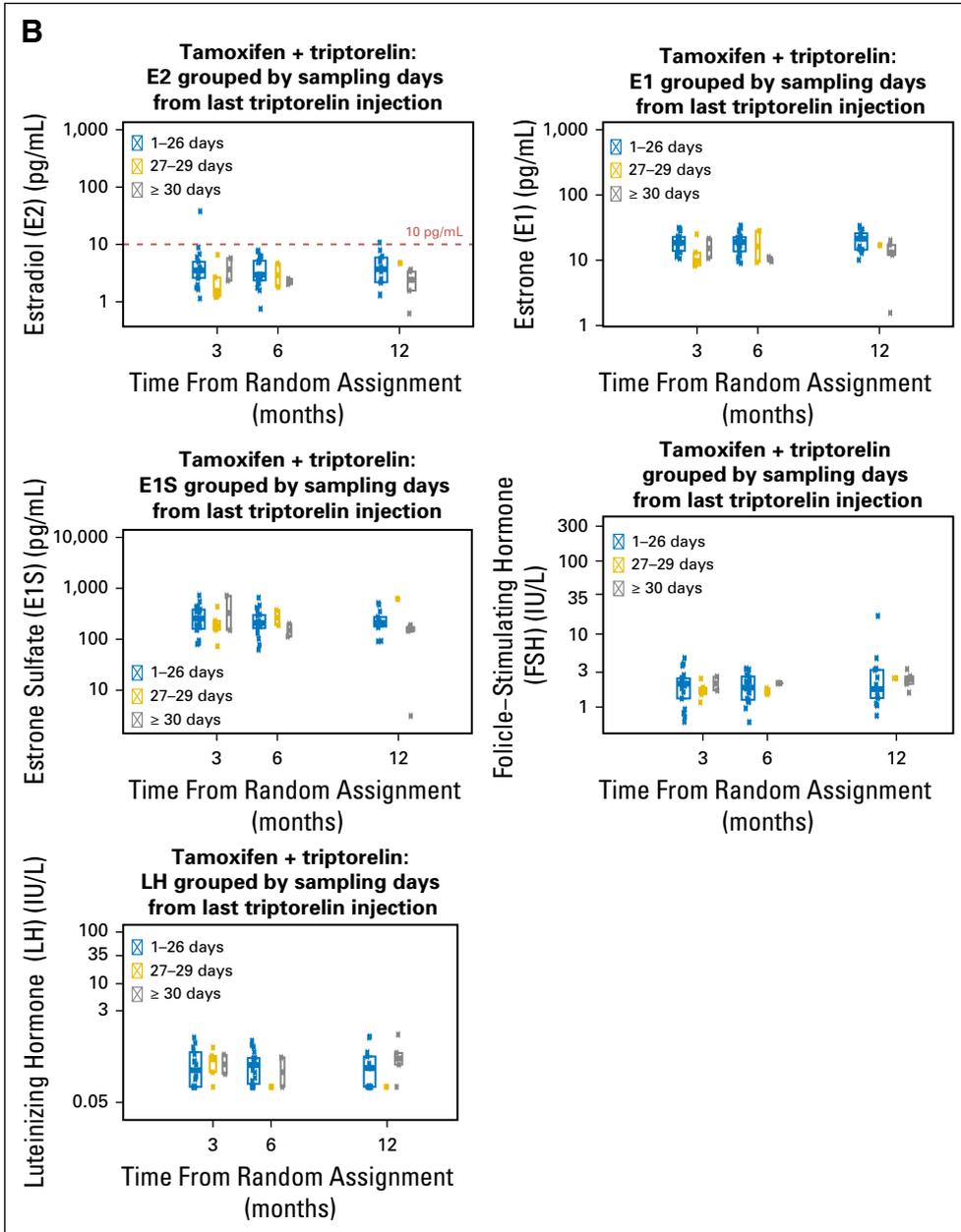


Fig A3. (continued)

Treatment adherence and timing of sampling relative to triptorelin injections

Among all 106 patients with at least one postbaseline sample in this 1-year analysis, the median duration receiving triptorelin injections was 12 months. Triptorelin injections were stopped early by eight patients before 12 months; these patients were included in the analysis until the time of early discontinuation and were adherent with injections before early discontinuation. For all other patients, there was no indication of missed injections during the 12-month period. The same eight patients also stopped the assigned oral endocrine therapy early. Seven additional patients stopped exemestane but remained on triptorelin; early discontinuation of exemestane may have led to some values of estradiol (E2) greater than 2.72 pg/mL after stopping, but these few values were unlikely to substantially affect the results. For all other patients, there was no indication of nonadherence with assigned oral endocrine therapy. Postbaseline E2 values for 15 patients who stopped protocol treatment early are listed in [Tables A6](#) and [A7](#) according to treatment assignment.

The interval of time between the blood draw sample and the last triptorelin injection could potentially account for variability in E2 levels. For approximately 75% of patients we had complete, accurate data in the database for dates of triptorelin injections and blood samples. We calculated the duration of the interval (in days) for each blood draw. [Table A8](#) shows the number of patients with complete date information for dates of triptorelin injections and blood samples, grouped by the interval between blood sampling and the last injection of triptorelin, at each scheduled blood draw time point. Approximately 15% of patients had samples 30 or more days since their last injection, which also indicates that the triptorelin injections were not always given within the 28 ± 3 -day window. [Figures A3A](#) and [A3B](#) plot the estrogen and follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels according to the interval between blood sampling and the last triptorelin injection, by treatment assignment. There is no clear pattern in the relationship of the sampling interval with E2 level; there is variability in E2 levels even within the 1- to 26-day interval from the last injection and remarkably small variability when the sample was obtained 30 or more days from last injection.

Estrogen Levels in Premenopausal Women Receiving Triptorelin

Table A1. Patient Characteristics According to Groups Defined by Baseline E2 20 pg/mL or Less Versus E2 Greater Than 20 pg/mL

	Baseline E2 ≤ 20 pg/mL (n = 39)	Baseline E2 > 20 pg/mL (n = 74)	Total (N = 113)*
Treatment assignment			
Exemestane plus triptorelin	28 (71.8)	55 (74.3)	83 (73.5)
Tamoxifen plus triptorelin	11 (28.2)	19 (25.7)	30 (26.5)
Age at random assignment, years			
Median (IQR)	45 (42, 48)	44 (39, 48)	44 (40, 48)
< 35	2 (5.1)	6 (8.1)	8 (7.1)
≥ 35	37 (94.9)	68 (91.9)	105 (92.9)
Menstruation before random assignment			
Normal	8 (20.5)	49 (66.2)	57 (50.4)
Irregular	5 (12.8)	11 (14.9)	16 (14.2)
Persistent amenorrhea	26 (66.7)	14 (18.9)	40 (35.4)
BMI, kg/m ²			
Median (IQR)	26 (24, 28)	23 (22, 27)	24 (22, 28)
Smoking history			
Currently smokes	8 (20.5)	19 (25.7)	27 (23.9)
Stopped smoking	10 (25.6)	10 (13.5)	20 (17.7)
Never smoked	21 (53.8)	43 (58.1)	64 (56.6)
Unknown	0 (0.0)	2 (2.7)	2 (1.8)
Prior chemotherapy			
No	4 (10.3)	47 (63.5)	51 (45.1)
Yes	35 (89.7)	27 (36.5)	62 (54.9)
Chemotherapy regimen			
Anthracycline-based	11 (31.4)	3 (11.1)	14 (22.6)
Anthracycline + taxane	21 (60.0)	22 (81.5)	43 (69.4)
Taxane-based	3 (8.6)	2 (7.4)	5 (8.1)
Prior chemotherapy duration, weeks			
Median (IQR)	18 (18, 24)	24 (18, 24)	20 (18, 24)
Prior tamoxifen			
No	26 (66.7)	52 (70.3)	78 (69.0)
Yes	13 (33.3)	22 (29.7)	35 (31.0)
Prior tamoxifen duration, weeks			
Median (IQR)	18 (14, 20)	16 (8, 22)	18 (8, 21)
Baseline hormone levels			
E2, pg/mL			
Median (IQR)	4 (3, 7)	110 (54, 170)	51 (6, 124)
E1, pg/mL			
Median (IQR)	19 (15, 28)	60 (41, 106)	42 (24, 71)
E1S, pg/mL			
Median (IQR)	265 (146, 396)	1205 (890, 2,342)	894 (307, 1,380)
FSH (IU/L)			
Median (IQR)	60 (30, 73)	8 (6, 20)	15 (7, 47)
LH (IU/L)			
Median (IQR)	25 (17, 44)	8 (5, 21)	14 (6, 28)

Abbreviations: BMI, body mass index; E1, estrone; E1S, estrone sulfate; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; IQR, interquartile range.

*Excludes three patients without baseline samples.

Table A2. Proportions of Patients Treated With Exemestane Plus Triptorelin With an Estradiol Level Above the Predefined Threshold (2.72 pg/mL) and With Respect to Two Additional Thresholds According to Use of Prior Chemotherapy

Time Point, Months	No. of Patients	E2 > 2.72 (pg/mL)			E2 > 10 (pg/mL)			E2 > 20 (pg/mL)			E2 ≤ 20 (pg/mL)		
		Total	No Prior Chemotherapy	Prior Chemotherapy	Total	No Prior Chemotherapy	Prior Chemotherapy	Total	No Prior Chemotherapy	Prior Chemotherapy	Total	No Prior Chemotherapy	Prior Chemotherapy
0 (Baseline)	83	76 (92)	37 (97)	39 (87)	58 (70)	36 (95)	22 (49)	55 (66)	35 (92)	20 (44)	28 (34)	3 (8)	25 (56)
3	67	17 (25)	10 (37)	7 (18)	8 (12)	7 (26)	1 (2)	5 (7)	4 (15)	1 (2)	62 (93)	23 (85)	39 (98)
6	67	16 (24)	9 (29)	7 (19)	8 (12)	4 (13)	4 (11)	4 (6)	1 (3)	3 (8)	63 (94)	30 (97)	33 (92)
12	65	11 (17)	8 (27)	3 (9)	6 (9)	5 (17)	1 (3)	2 (3)	2 (7)	0 (0)	63 (97)	28 (93)	35 (100)
3, 6, or 12	79	27 (34.2)	16 (45.7)	11 (25)	14 (17.7)	10 (28.6)	4 (9.1)	10 (12.7)	6 (17.1)	4 (9.1)	69 (87.3)	29 (82.9)	40 (90.9)
≥ 1 with E2 > cutoffs													
≥ 2 with E2 > cutoffs		13 (16.5)			6 (7.6)			1 (1.3)					

NOTE: Data are presented as No. (%). Estradiol (E2) greater than 2.72 pg/mL defines a strict threshold to indicate E2 inconsistent with postmenopausal levels on an aromatase inhibitor. E2 greater than 10 pg/mL defines a less-strict threshold, and thus above which E2 was clearly inconsistent with postmenopausal levels on an aromatase inhibitor. E2 greater than 20 pg/mL defines a threshold above which E2 was inconsistent with gonadotropin-releasing hormone agonist-related postmenopausal status.

Table A3. Estrogen Levels at Each Time Point According to Treatment Assignment

Estrogen Levels	Treatment Assignment											
	Exemestane Plus Triptorelin (n = 86)					Tamoxifen Plus Triptorelin (n = 30)						
	Baseline	3 Months	6 Months	12 Months	Baseline	3 Months	6 Months	12 Months	Baseline	3 Months	6 Months	12 Months
Samples expected, No.	86	83	80	78	30	28	27	26	30	28	27	26
E2, pg/mL												
No. of samples analyzed	83	67	67	65	30	26	24	20	30	26	24	20
Geometric mean	32.7	1.3	1.3	1	40.4	3.4	3.2	3.2	40.4	3.4	3.2	3.2
Median (IQR)*	49.9 (6.8, 110)	0.6 (0.6, 2.7)	0.6 (0.6, 2.6)	0.6 (0.6, 0.9)	72.5 (6.2, 199)	3.4 (2.1, 5.3)	2.9 (2.1, 5.1)	3.4 (2.2, 5.2)	72.5 (6.2, 199)	3.4 (2.1, 5.3)	2.9 (2.1, 5.1)	3.4 (2.2, 5.2)
Mean (SD)	95.4 (149.91)	4 (8.44)	3.6 (7.95)	2.5 (5.07)	114.5 (124.99)	4.9 (6.98)	3.8 (2.02)	4 (2.77)	114.5 (124.99)	4.9 (6.98)	3.8 (2.02)	4 (2.77)
Range	(0.6, 766)	(0.6, 41.9)	(0.6, 51.4)	(0.6, 25.1)	(2.5, 436)	(1.1, 37.7)	(0.8, 7.8)	(0.6, 10.8)	(2.5, 436)	(1.1, 37.7)	(0.8, 7.8)	(0.6, 10.8)
No. (%) < LLQ	4 (5)	61 (91)	54 (81)	57 (88)	0 (0)	4 (15)	5 (21)	6 (30)	0 (0)	4 (15)	5 (21)	6 (30)
E1, pg/mL												
No. of samples analyzed	83	67	67	65	30	26	24	21	30	26	24	21
Geometric mean	41	2.2	2.2	2.2	45.1	16.9	17.2	16.6	45.1	16.9	17.2	16.6
Median (IQR)	43.6 (24, 70)	1.6 (1.6, 2)	1.6 (1.6, 2.3)	1.6 (1.6, 2.1)	39.2 (24.8, 102.2)	17.9 (12.4, 22.7)	18.2 (11.6, 22.5)	17 (13.8, 22.6)	39.2 (24.8, 102.2)	17.9 (12.4, 22.7)	18.2 (11.6, 22.5)	17 (13.8, 22.6)
Mean (SD)	65.3 (77.24)	2.9 (3.33)	2.8 (3.17)	3.4 (5.75)	64.4 (57.84)	18.2 (6.88)	18.7 (7.54)	19 (8.4)	64.4 (57.84)	18.2 (6.88)	18.7 (7.54)	19 (8.4)
Range	(1.6, 486)	(1.6, 18.6)	(1.6, 20.4)	(1.6, 42.5)	(11.3, 226)	(8.3, 31.2)	(9.1, 34.2)	(1.6, 34.5)	(11.3, 226)	(8.3, 31.2)	(9.1, 34.2)	(1.6, 34.5)
No. (%) < LLQ	5 (6)	64 (96)	57 (86)	54 (83)	0 (0)	3 (12)	4 (17)	5 (24)	0 (0)	3 (12)	4 (17)	5 (24)
E1S, pg/mL												
No. of samples analyzed	83	67	67	65	30	26	24	21	30	26	24	21
Geometric mean	710.3	15.4	20.6	13.1	787.5	239.9	216.8	193.6	787.5	239.9	216.8	193.6
Median (IQR)	784 (315, 1,320)	11.7 (5.3, 29.6)	14.9 (8.4, 48.1)	10.6 (4.9, 20)	1,000 (272, 1,620)	229 (154.8, 420.8)	204 (173.8, 321.2)	206 (172, 273)	1,000 (272, 1,620)	229 (154.8, 420.8)	204 (173.8, 321.2)	206 (172, 273)
Mean (SD)	1,377.9 (1,752.51)	56 (133.71)	54.5 (96.93)	34.2 (65.11)	1,501.5 (1,897.57)	295 (192.65)	259 (167.23)	278.5 (236.38)	1,501.5 (1,897.57)	295 (192.65)	259 (167.23)	278.5 (236.38)
Range	(7.2, 8,000)	(3.1, 766)	(3.1, 480)	(3.1, 303)	(72.2, 8,770)	(72.8, 725)	(62.5, 718)	(3.1, 1,090)	(72.2, 8,770)	(72.8, 725)	(62.5, 718)	(3.1, 1,090)
No. (%) < LLQ	5 (6)	25 (37)	22 (33)	19 (29)	0 (0)	3 (12)	4 (17)	5 (24)	0 (0)	3 (12)	4 (17)	5 (24)

Abbreviations: E1, estrone; E1S, estrone sulfate; E2, estradiol; IQR, interquartile range, SD, standard deviation; LLQ, lower limit of quantification.
 *Values are rounded to one decimal, including values at LLQ for each estrogen fraction (eg, E2 = 0.6 was rounded to one decimal from 0.625).

Table A4. Characteristics of the Two Patients in the Exemestane Plus Triptorelin Group Who Experienced Vaginal Bleeding

Patient ID	Time Point, Months	Blood Draw Date	E2 (pg/mL)	E1 (pg/mL)	E1S (pg/mL)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	Age	BMI	Menstruation	Chemotherapy	Prior Tamoxifen	Triptorelin Injection Dates			
													First	Second	Third	Fourth
A*	0	August 3, 2001	117	49	192	5.5	2.9	47	Overweight	Normal	No	No	August 3, 2001	August 31, 2001	September 29, 2001	October 27, 2001
	3	November 2, 2001	41.9	9.1	27.8	11.2	0.2						November 23, 2001	December 21, 2001	January 18, 2002	
	6	—											February 16, 2002	March 16, 2002	April 13, 2002	
	9												May 11, 2002	June 8, 2002	July 5, 2002	August 2, 2002
B†	0	August 2, 2002	3.5	10.4	22.8	6	0.9			Normal	No	No	August 3, 2001	August 31, 2001	September 29, 2001	October 27, 2001
	3	March 9, 2001	120.4	5.2	71.2	NA	NA	40	Normal	Irregular	Yes	Yes	November 23, 2001	December 21, 2001	January 18, 2002	
	6	June 11, 2001	0.6	1.6	3.9	5.0	0.6						February 16, 2002	March 16, 2002	April 13, 2002	
	9	August 31, 2001	1.3	8.4	43.5	4.1	1.9						May 11, 2002	June 8, 2002	July 5, 2002	August 2, 2002
	Postoophorectomy	December 22, 2001	0.6	1.6	3.13	146.5	54.1						March 9, 2001	April 6, 2001	May 4, 2001	

NOTE: Visit time points were 0 (baseline), 3, 6, 9, and 12 months. Sampling time points were 0, 3, 6, and 12 months. In blood draw and injection dates, the years were changed for the purpose of anonymity. Abbreviations: BMI, body mass index; E1, estrone; E1S, estrone sulfate; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone.
 *Patient A was administered exemestane from August 2001 to December 2001, then started tamoxifen; a 6-month sample was not obtained. The change to tamoxifen was made because the patient continued to have regular menses.
 †Patient B had vaginal bleeding 6 months after triptorelin initiation and proceeded to oophorectomy on the basis of premenopausal local E2 levels taken on August 18, 2001; a postoophorectomy sample was obtained 3 months later.

Table A5. Summary of Four Patients Assigned Exemestane Plus Triptorelin With Persistently Suboptimal E2 Less Than 2.72 pg/mL Throughout Follow-Up

Patient ID	Time Point, Months	Blood Draw Date	Triptorelin Injection Dates								
			E2 (pg/mL)	E1 (pg/mL)	E1S (pg/mL)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	First	Second	Third	Fourth
C1	0	August 5, 2001	79.1	58.8	625	2.4	1.6	August 5, 2001	September 1, 2001	September 29, 2001	October 20, 2001
	3	October 22, 2001	11.8	8.9	181	3.7	0.1	November 24, 2001	December 22, 2001	January 19, 2002	
	6	January 19, 2002	4	2	39.3	6.4	0.1	February 16, 2002	March 16, 2002	April 13, 2002	
	9	April 13, 2002	1.8	33.9	29.8	5.4	0.1	May 11, 2002	June 8, 2002	July 7, 2002	August 5, 2002
	12	July 7, 2002	18.5	13.5	176	5.6	0.1	November 10, 2001	December 8, 2001	January 5, 2002	February 2, 2002
	3	January 27, 2002	60.6	47.5	582	5.7	2.6	March 2, 2002	March 30, 2002	April 27, 2002	
C2	0	November 10, 2001	19.4	6.8	167	6.8	0.1	May 25, 2002	June 22, 2002	July 20, 2002	October 12, 2002
	3	January 27, 2002	21.6	10.2	257	7.5	0.1	August 17, 2002	September 14, 2002	October 12, 2002	November 9, 2002
	6	April 27, 2002	51.4	20.4	439	4.8	0.1	December 4, 2001	January 4, 2002	February 4, 2002	March 4, 2002
	9	November 10, 2002	62.8	30.6	923	8.4	4.8	April 8, 2002	May 6, 2002	June 3, 2002	
C3	0	December 4, 2001	4.8	4.2	55.1	5.5	0.2	July 1, 2002	August 26, 2002	November 18, 2002	
	3	March 4, 2002	25.4	14.7	363	4.2	0.3	September 23, 2002	October 21, 2002		
	6	June 3, 2002	16.9	4.5	105	8	0.1	December 4, 2001	January 4, 2002	February 4, 2002	March 4, 2002
	9	November 18, 2002	62.8	30.6	923	8.4	4.8	April 8, 2002	May 6, 2002	June 3, 2002	
C4	0	November 18, 2001	124	61.3	934	4	4.9	July 1, 2002	August 26, 2002	November 18, 2002	
	3	February 21, 2002	10.7	5.5	76.8	7.2	0.1	September 23, 2002	October 21, 2002		
	6	May 23, 2002	11.3	4.4	84.2	6.5	0.1	November 18, 2001	December 17, 2001	January 14, 2002	February 11, 2002
	9	November 22, 2002	10.1	3.2	96.6	5.4	0.1	March 11, 2002	April 8, 2002	May 6, 2002	August 27, 2002

NOTE: For all patients, case report forms indicate exemestane taken per protocol throughout period. For the blood draw and injection dates, the years were changed arbitrarily to 2001-2002 for the purpose of anonymity. Abbreviations: E1, estrone; E1S, estrone sulfate; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone.

Table A6. Exemestane Plus Triptorelin: Patients With Treatment Nonadherence (n = 10) and Sampling Time From Last Triptorelin Injection

Patient ID	Visit Time Point, Months	Blood Draw, Months	Blood Sample Since Last Injection, Days	E2 (pg/mL)	Duration of Exemestane, Months	Duration of Triptorelin, Months
A1	3	3	6	41.9	4.4	12
	6	6			4.4	
	9				4.4	
	12	12*			4.4	
A2	3	3	28	0.625	4.2	12
	6	6			4.2	
	9				4.2	
	12				4.2	
A3	3	3	28	32.1	8.5	9.2
	6	6	28	0.625	8.5	9.2
	9	9	7	0.625	8.5	9.2
A4	3	3	4	1.03	11.8	12
	6	6			11.8	
	9				11.8	
	12	12			11.8	
A5	3	3	38	0.625	9	12
	6	6	25	0.625	9	12
	9				9	12
A6	3	3*	23	2.33*	1.2	12
	6	6*	19	2.47*	1.2	
	9				1.2	
	12	12*	28	3.57*	1.2	
A7	3	3		7.48	0.3	4.3
	6	6			0.3	4.3
	12	12		7.38	0.3	4.3
A8	3	3	31	0.625	7.8	12
	6	6	29	0.625	7.8	
	9				7.8	
	12				7.8	
A9	3	3	6	0.625	3.5	3.7
	6				3.5	3.7
A10	3	3	21	3.95	12	12
	6	6	14	1.6	12	
	9				12	
	12	12	28	0.625	12	

Abbreviations: E2, estradiol.

*The patient was on tamoxifen at this blood draw.

Estrogen Levels in Premenopausal Women Receiving Triptorelin

Table A7. Tamoxifen Plus Triptorelin: Patients With Treatment Nonadherence (n = 5) and Sampling Time From Last Triptorelin Injection

Patient ID	Visit Time Point, Months	Blood Draw, Months	Blood Sample Since Last Injection, Days	E2 (pg/mL)	Duration of Tamoxifen, Months	Duration of Triptorelin, Months
B1	3	3	26	37.7	11.4	2.8
B2	3	3	29	1.21	10.6	11.5
	6	6	35	2.03	10.6	11.5
	9				10.6	11.5
	12	12	47	1.57	10.6	11.5
B3	3	3	10	6.78	10.1	11.2
	6	6	19	6.33	10.1	11.2
	9				10.1	11.2
	12	12			10.1	11.2
B4	3	3	6	2.68	4	12
	6	6	13	2.92	4	12
	9				4	12
	12	12*	108*	0.625*	4	12
B5	3	3 (ED)		5.35	3	1

Abbreviations: E2, estradiol; ED, early discontinuation
 *The patient was on aromatase inhibitor plus triptorelin at this blood draw; there is uncertainty about the value of 108 days since last injection.

Table A8. Number of Patients Grouped by Sampling Days from Last Triptorelin Injection at Each Scheduled Blood Draw Time Point

Time Point, Months	Exemestane Plus Triptorelin			Tamoxifen Plus Triptorelin		
	1-26 Days	27-29 Days	30 Days or More	1-26 Days	27-29 Days	30 Days or More
3	42	8	9	17	5	2
6	43	11	8	19	2	2
12	37	8	11	13	1	5

NOTE. Data are restricted to those patients for whom we have complete date information. Data are presented as the No. of patients having a blood sample drawn within the indicated number of days from their last triptorelin injection.

9 Referencias

9. REFERENCIAS

1. Ferlay J, S.I., Ervik M. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.*
2. Jacques Ferlay, H.-R.S., Freddie Bray, David Forman, Colin Mathers and Donald Maxwell Parkin, *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008.* INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, 2010. 127.
3. (SEOM)., S.E.d.O.M. *Las Cifras del Cáncer en España 2014.* 2014.
4. *PDFs online - Cancer Epidemiology Cancer Incidence in Five Continents Vol. X*, F.B. Edited by D. Forman, D.H. Brewster, C. Gombe Mbalawa, B. Kohler, M. Piñeros, E. Steliarova-Foucher, R. Swaminathan and J. Ferlay, Editor 2014. p. 1436 pages.
5. Bray, F., et al., *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study.* Lancet Oncol. 13(8): p. 790-801.
6. Bleyer, A. and H.G. Welch, *Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence.* N Engl J Med, 2012. 367(21): p. 1998-2005.
7. SF, A. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007.* 2010 [cited 2015].
8. Peter M. Ravdin, P.D., M.D., Kathleen A. Cronin, Ph.D., Nadia Howlader, M.S., M.D. Christine D. Berg, Rowan T. Chlebowski, M.D., Ph.D., Eric J. Feuer, Ph.D., and P.D. Brenda K. Edwards, and Donald A. Berry, Ph.D., *The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States.* N Engl J Med, 2007. 356(16): p. 1670.
9. Cronin, K.A., P.M. Ravdin, and B.K. Edwards, *Sustained lower rates of breast cancer in the United States.* Breast Cancer Res Treat, 2009. 117(1): p. 223-4.
10. Lambe, M., et al., *Reductions in use of hormone replacement therapy: effects on Swedish breast cancer incidence trends only seen after several years.* Breast Cancer Res Treat, 2010. 121(3): p. 679-83.
11. Renard, F., et al., *Decline in breast cancer incidence in the Flemish region of Belgium after a decline in hormonal replacement therapy.* Ann Oncol, 2010. 21(12): p. 2356-60.
12. Howlader N, N.A., Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). . *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012.* Cancer Statistics. 2015 August 20, 2015 [cited 2015 April 2015]; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/
13. Mama, G.E.p.I.I.d.C.d. *Proyecto El Álamo III. Encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama en hospitales del grupo GEICAM 1998-2001.* 2014 [cited 2014].
14. P, R. *Gobal Cancer Facts and Figures. Second Edition.* 2015.
15. Campeau, P.M., W.D. Foulkes, and M.D. Tischkowitz, *Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues.* Hum Genet, 2008. 124(1): p. 31-42.

16. Allred, C.G.A.a.C. *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors* 2013 Oct 23, 2013 Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1697353-overview#a3>.
17. Chlebowski, R.T., et al., *Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women*. *N Engl J Med*, 2009. 360(6): p. 573-87.
18. Cardoso, F. and M. Castiglione, *Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2009. 20 Suppl 4: p. 15-8.
19. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf.
20. Sinn, H.P. and H. Kreipe, *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. *Breast Care (Basel)*, 2013. 8(2): p. 149-54.
21. Pestalozzi, B.C., et al., *Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials*. *J Clin Oncol*, 2008. 26(18): p. 3006-14.
22. Rakha, E.A., et al., *Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(1): p. 99-104.
23. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(8): p. 591-602.
24. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson,, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. *Cancer*, 1989. 63(1): p. 7.
25. Elston, D.W.a., *Pathological prognostic factors in breast cancer.I. The value of histological grade in breast cancer:experience from a large study with long-term follow-up*. *Histopathology*, 1991. 19: p. 8.
26. Arpino, G., et al., *Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome*. *Breast Cancer Res*, 2004. 6(3): p. R149-56.
27. Bevilacqua, J.L., et al., *Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(24): p. 3670-9.
28. Hammond, M.E., et al, *American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. *JCO*, 2010. 28(16): p. 13.
29. Coates, A.S., et al., *Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. *Ann Oncol*, 2015. 26(8): p. 1533-46.
30. Pan H, G.R., Davies C et al on behalf E. *Long-term recurrence risks after use of endocrine therapy for only 5 years. Relevance of tumor characteristics*. in *2016 ASCO Meeting*. 2016. Chicago.
31. Dunnwald, L.K., M.A. Rossing, and C.I. Li, *Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2007. 9(1): p. R6.
32. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. *Lancet*, 2011. 378(9793): p. 771-84.
33. Hefti, M.M., et al., *Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype*. *Breast Cancer Res*, 2013. 15(4): p. R68.

34. De Maeyer L, V.L.E., De Nys K, Moerman P, Pochet N, Hendrickx W,, P.R. Wildiers H, Smeets A, Christiaens MR, Vergote I, Leunen K, Amant F,, and N. P.: *Does estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast carcinoma exist?* Journal of Clinical Oncology, 2008. 26: p. 2.
35. Nadji, M., et al., *Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers.* Am J Clin Pathol, 2005. 123(1): p. 21-7.
36. Prat, A., et al., *Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer.* J Clin Oncol, 2013. 31(2): p. 203-9.
37. Wolff, A.C., *Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update.* Journal of Clinical Oncology, 2013. 31(31).
38. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice.* N Engl J Med, 2007. 357(1): p. 39-51.
39. Dowsett, M., et al., *Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group.* J Natl Cancer Inst, 2011. 103(22): p. 1656-64.
40. de Azambuja, E., et al, *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients.* Br J Cancer, 2007. 96: p. 10.
41. . Yerushalmi, R., et al, *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential.* Lancet Oncol, 2010. 11(2).
42. Criscitiello, C., et al., *High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer.* Breast, 2014. 23(1): p. 69-75.
43. Cuzick, J., et al, *Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer* JCO, 2011. 29(32).
44. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 2009. 101(10): p. 736-50.
45. Goldhirsch, A., 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. 24(9): p. 2206-23.
46. Fredholm A., e.a., *Breast Cancer in Young Women: Poor Survival Despite Intensive Treatment.* PLoS One, 2009.
47. Goldhirsch, A., et al., *Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: need for tailored treatments.* J Natl Cancer Inst Monogr, 2001(30): p. 44-51.
48. Ravdin, P., et al., *Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer.* Journal of clinical oncology, 2001. 19(4): p. 980-991.
49. Olivotto, I.A., et al., *Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer.* J Clin Oncol, 2005. 23(12): p. 2716-25.
50. Perou, C., et al., *Molecular portraits of human breast tumours.* Nature, 2000. 406: p. 747-752.

51. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(19): p. 10869-74.
52. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(14): p. 8418-23.
53. Dowsett, M., et al., *Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy*. J Clin Oncol, 2013. 31(22): p. 2783-90.
54. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. 351(27): p. 2817-26.
55. van de Vijver, M.C.e.a., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer*. N Engl J Med, 2002. 347(25): p. 11.
56. Buyse, M., et al., *Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(17): p. 1183-92.
57. Drukker, C.A., et al., *A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study*. Int J Cancer, 2013. 133(4): p. 929-36.
58. Martin, M., et al., *Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial*. Breast Cancer Res, 2014. 16(2): p. R38.
59. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. J Clin Oncol, 2009. 27(8): p. 1160-7.
60. Gluck, S., et al., *Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy*. Breast Cancer Res Treat, 2013. 139(3): p. 759-67.
61. Paik, S., et al., *Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2006. 24(23): p. 3726-34.
62. Albain, K.S., et al., *Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial*. Lancet Oncol, 2010. 11(1): p. 55-65.
63. Prat, A., et al., *Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen*. Ann Oncol, 2012. 23(11): p. 2866-73.
64. Fan, C., et al., *Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer*. N Engl J Med, 2006. 355(6): p. 560-9.
65. Sparano, J.A., *TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx)*. Clin Breast Cancer, 2006. 7(4): p. 347-50.
66. ; Available from: <http://breast-cancer.oncotypedx.com/en-CA/Patient-Invasive/Resources/ClinicalTrials.aspx>.
67. Cardoso, F., et al., *The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool*. Mol Oncol, 2007. 1(3): p. 246-51.
68. Piccart M, R.E., van't Veer L et al on behalf of TRANSBIG consortium and MINDACT investigators. , *70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer*. N Engl J Med, 2016. 375: p. 717-729.
69. Sparano, J.A., et al., *Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer*. N Engl J Med, 2015.

70. Sestak, I., 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): p. 916-22.
71. Sestak, I., et al., *Factors predicting late recurrence for estrogen receptor-positive breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 2013. 105(19): p. 1504-11.
72. Dubsy, P., et al., *The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients.* Br J Cancer, 2013. 109(12): p. 2959-64.
73. Zhang, Y., et al., *Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence.* Clin Cancer Res, 2013. 19(15): p. 4196-205.
74. Fisher, B., et al., *Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation.* N Engl J Med, 2002. 347(8): p. 567-75.
75. Salama, J.K., et al., *Does the number of lymph nodes examined in patients with lymph node-negative breast carcinoma have prognostic significance?* Cancer, 2005. 103(4): p. 664-71.
76. Sosa, J.A., et al., *Association between extent of axillary lymph node dissection and survival in patients with stage I breast cancer.* Ann Surg Oncol, 1998. 5(2): p. 140-9.
77. Silberman, A.W., et al., *Comparative morbidity of axillary lymph node dissection and the sentinel lymph node technique: implications for patients with breast cancer.* Ann Surg, 2004. 240(1): p. 1-6.
78. Krag, D.N., et al., *Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2010. 11(10): p. 927-33.
79. Peg, V., et al., *Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 2013. 139(1): p. 87-93.
80. Giuliano, A.E., et al., *Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial.* JAMA, 2011. 305(6): p. 569-75.
81. Galimberti, V., et al., *Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial.* Lancet Oncol, 2013. 14(4): p. 297-305.
82. Giuliano A. E., M.C.C., Beitsch PD et al. *Ten year survival results of ACOSOG Z0011: A Randomized Trial of Axillary Node Dissection in Women with Clinical T1-2 N0 M0 Breast Cancer who have a Positive Sentinel Node.* in ASCO Annual Meeting 2016, Abstract 1007. 2016.
83. *N.C.C.N Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN guidelines). Breast Cancer. Version 3.2015 2015; 20th Annual Edition:[Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf.*
84. Emiel J. Rutgers, M.D., Marieke Evelien Straver et al, in *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr LBA1001).
85. EBCTCG, *Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials.* The Lancet, 1998. 352: p. 930-942.

86. EBCTCG, *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. *The Lancet*, 2005. 365(9472): p. 1687-717.
87. Muss, H.B., et al., *Adjuvant chemotherapy in older women with early-stage breast cancer*. *N Engl J Med*, 2009. 360(20): p. 2055-65.
88. Darby, S., et al, *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials*. *Lancet*, 2011. 378(9804): p. 1707-16.
89. McGale, P., et al, *Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials*. *Lancet*, 2014. 383(9935): p. 2127-35.
90. Kunkler, I.H., et al., *Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2015. 16(3): p. 266-73.
91. Hughes KS, e.a., *Lumpectomy plus Tamoxifen with or without Irradiation in Women 70 Years of Age or Older with Early Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2004. 351: p. 8.
92. Bajaj, Y., et al., *Evaluation of voice and quality of life after transoral endoscopic laser resection of early glottic carcinoma*. *J Laryngol Otol*, 2011. 125(7): p. 706-13.
93. Kunkler, I.H., *Elucidating the role of chest wall irradiation in 'intermediaterisk' breast cancer: the MRC/EORTC SUPREMO trial*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008. 20(1): p. 31-34.
94. Whelan T, O.I., Ackerman I. *NCIC-CTG MA.20: An Intergroup Trial of Regional Nodal Irradiation in Early Breast Cancer*. in *Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*. 2011. 2011. Chicago: American Society of Clinical Oncology.
95. Mauri, D., N. Pavlidis, and J.P. Ioannidis, *Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(3): p. 188-94.
96. Cortázar, P., et al, *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis*. *Lancet*, 2014. 384(9938): p. 164-72.
97. FDA, U.S.F.a.D.A. *FDA approves Perjeta for neoadjuvant breast cancer treatment*. 2013; Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm370393.htm>.
98. Underwood, G. *Roche's Perjeta gets new EU indication* PharmaTimes digital, 2015.
99. Ian E. Smith, M.D., Stephen R. Ebbs, J. Michael Dixon, Anthony Skene, J.-U. Blohmer, and S.F. Susan E. Ashley, Irene Boeddinghaus, and Geraldine Walsh, *Neoadjuvant Treatment of Postmenopausal Breast Cancer With Anastrozole, Tamoxifen, or Both in Combination: The Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined With Tamoxifen (IMPACT) Multicenter Double-Blind Randomized Trial*. *J Clin Oncol*, 2005. 23: p. 5108-5116.
100. Matthew J. Ellis, A.C., Baljit Singh, Louis Mauriac, Antonio Llombert-Cussac, Fritz Ja'nicke, William R. Miller, and M.D. Dean B. Evans, Carolyn Brady,

Erhard Quebe-Fehling, and Mieke Borgs, *Letrozole Is More Effective Neoadjuvant Endocrine Therapy Than Tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-Positive, Estrogen Receptor-Positive Primary Breast Cancer: Evidence From Phase III Randomized Trial*. J Clin Oncol, 2001. 19: p. 3808-3816.

101. Cataliotti L, B.A., Noguchi, S, et al M.D., *Comparison of Anastrozole versus Tamoxifen as Preoperative Therapy in Postmenopausal Women with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer The Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen (PROACT) Trial*. Cancer, 2006. 106(10): p. 2095-2103.
102. Semiglazov V, K.A., Zhiltzova V, Ivanov V, Dashyan G, Bozhok A, Melnikova O, Paltuev R, Berstein L, *Exemestane (E) vs tamoxifen(T) as neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with ER+ breast cancer (T2N1-2, T3N0-1, T4N0M0)*. Proc Am Soc Clin Oncol 23: 530 (abstract)I, 2005.
103. Ellis, M.J., et al., *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics*. J Natl Cancer Inst, 2008. 100(19): p. 1380-8.
104. Investigators, W.G.f.t.W.s.H.I., *Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial*. JAMA, 2002. 288(3): p. 321-333.
105. Simpson, E.R., *Sources of estrogen and their importance*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. 86(3-5): p. 225-30.
106. Zhu, B.T., et al., *Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding*. Endocrinology, 2006. 147(9): p. 4132-50.
107. Kuhl, H., *Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration*. Climacteric, 2005. 8 Suppl 1: p. 3-63.
108. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens*. N Engl J Med, 2002. 346(5): p. 340-52.
109. Ross, R.L., M.R. Serock, and R.A. Khalil, *Experimental benefits of sex hormones on vascular function and the outcome of hormone therapy in cardiovascular disease*. Curr Cardiol Rev, 2008. 4(4): p. 309-22.
110. Dawling, S., N. Roodi, and F.F. Parl, *Methoxyestrogens exert feedback inhibition on cytochrome P450 1A1 and 1B1*. Cancer Res, 2003. 63(12): p. 3127-32.
111. Chang, M., *Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis*. BMB reports, 2011(7): p. 423-434.
112. Aad, G., et al., *Observation of associated near-side and away-side long-range correlations in $\sqrt{s(NN)}=5.02$ TeV proton-lead collisions with the ATLAS detector*. Phys Rev Lett, 2013. 110(18): p. 182302.
113. Dunn, J.F., et al., *Testosterone-estradiol binding globulin binds to 2-methoxyestradiol with greater affinity than to testosterone*. J Clin Endocrinol Metab, 1980. 51(2): p. 404-6.
114. Zhu, B.T. and A.H. Conney, *Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives*. Carcinogenesis, 1998. 19(1): p. 1-27.
115. Michaud, D.S.e.a., *Reproducibility of plasma and urinary hormone levels in premenopausal women over 1-year period*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 1999. 8: p. 1059-1064.
116. Vrtacnik, P., et al., *The many faces of estrogen signaling*. Biochem Med (Zagreb), 2014. 24(3): p. 329-42.

117. Ascenzi, P., A. Bocedi, and M. Marino, *Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health*. Mol Aspects Med, 2006. 27(4): p. 299-402.
118. Miller, V.M. and S.P. Duckles, *Vascular actions of estrogens: functional implications*. Pharmacol Rev, 2008. 60(2): p. 210-41.
119. Couse, J.F., et al., *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse*. Endocrinology, 1997. 138(11): p. 4613-21.
120. Mayes, J.S. and G.H. Watson, *Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity*. Obes Rev, 2004. 5(4): p. 197-216.
121. Haas, E., et al., *Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis*. Hypertension, 2007. 49(6): p. 1358-63.
122. Dubey, R.K., et al., *Estrogen and tamoxifen metabolites protect smooth muscle cell membrane phospholipids against peroxidation and inhibit cell growth*. Circ Res, 1999. 84(2): p. 229-39.
123. Jensen, J., L. Nilas, and C. Christiansen, *Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins*. Maturitas, 1990. 12(4): p. 321-31.
124. Beato, M. and J. Klug, *Steroid hormone receptors: an update*. Hum Reprod Update, 2000. 6(3): p. 225-36.
125. Levin, E.R., *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. Mol Endocrinol, 2005. 19(8): p. 1951-9.
126. Dahlman-Wright, K., et al., *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors*. Pharmacol Rev, 2006. 58(4): p. 773-81.
127. Leung, Y.K., et al., *Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(35): p. 13162-7.
128. Stirone, C., S.P. Duckles, and D.N. Krause, *Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. 284(1): p. E184-92.
129. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. 389(6652): p. 753-8.
130. Li, X., et al., *Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways*. Mol Cell Biol, 2004. 24(17): p. 7681-94.
131. Htun, H., et al., *Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor*. Mol Biol Cell, 1999. 10(2): p. 471-86.
132. Pedram, A., et al., *Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology*. J Biol Chem, 2002. 277(52): p. 50768-75.
133. Hurtado, A., et al., *Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen*. Nature, 2008. 456(7222): p. 663-6.
134. El-Ashry, D., et al., *Estrogen induction of TGF-alpha is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996. 59(3-4): p. 261-9.
135. Shang, Y. and M. Brown, *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs*. Science, 2002. 295(5564): p. 2465-8.

136. Saceda, M., et al., *Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. 66(3): p. 113-20.
137. Kronenberg HM, M.S., Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of Endocrinology*, 2007, Saunders Elsevier: Philadelphia.
138. Melmed S, P.K., Larsen PR, Kronenberg HM., *Williams Textbook of Endocrinology*, 2011, Saunders Elsevier: Philadelphia.
139. Richards, J.S. and S.A. Pangas, *The ovary: basic biology and clinical implications*. J Clin Invest, 2010. 120(4): p. 963-72.
140. Homburg, R., *The Mechanism of Ovulation* 2014.
141. Fauser BC, V.H.A., *Manipulation of human ovarian function: Physiological concepts and clinical consequences*. Endocr Rev 1997. 18: p. 71-106.
142. Raju, G.A., et al., *Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation*. J Hum Reprod Sci, 2013. 6(4): p. 227-34.
143. Simoni, M., et al., *Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response*. Hum Reprod Update, 2008. 14(5): p. 459-84.
144. Simoni, M., et al., *Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with maldescended testes and male infertility*. Pharmacogenet Genomics, 2008. 18(3): p. 193-200.
145. Alviggi, C., et al., *Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism*. Reprod Biomed Online, 2009. 18(1): p. 9-14.
146. *Follicle-stimulating hormone (FSH) blood test*, in *Medline Plus*, <https://medlineplus.gov/ency/article/003710.htm>.
147. Etienne, M.C., et al., *Tamoxifen metabolism: pharmacokinetic and in vitro study*. Br J Cancer, 1989. 60(1): p. 30-5.
148. Desta Z, W.B., Soukhova NV, Flockhart DA, *Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6*. Pharmacol. Exp. Ther, 2004. 310(3): p. 1062-1075.
149. Klein Daniel J, T.C.F., Desta Zeruesenay, Flockhart David A, Altman Russ B, Klein Teri E. *PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics*. Pharmacogenetics and genomics 2013; Available from: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA145011119#tabview=tab0&subtab=>.
150. Zanger, U.M., et al., *Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes*. Clin Pharmacol Ther, 2014. 95(3): p. 258-61.
151. Jin, Y., et al., *CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(1): p. 30-9.
152. Goetz, M.P., et al., *Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes*. J Clin Oncol, 2005. 23(36): p. 9312-8.
153. de Souza, J.A. and O.I. Olopade, *CYP2D6 genotyping and tamoxifen: an unfinished story in the quest for personalized medicine*. Semin Oncol, 2011. 38(2): p. 263-73.
154. Pratt, V.M., et al., *Characterization of 107 genomic DNA reference materials for CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, VKORC1, and UGT1A1: a GeT-RM and Association for Molecular Pathology collaborative project*. J Mol Diagn, 2010. 12(6): p. 835-46.

155. Madlensky, L., et al., *Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes*. Clin Pharmacol Ther, 2011. 89(5): p. 718-25.
156. Murdter, T.E., et al., *Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma*. Clin Pharmacol Ther, 2011. 89(5): p. 708-17.
157. Stearns, V., et al., *Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine*. J Natl Cancer Inst, 2003. 95(23): p. 1758-64.
158. *NOLVADEX: CLINICAL PHARMACOLOGY*. Available from: <http://www.rxlist.com/nolvadex-drug/clinical-pharmacology.htm>.
159. Shang, Y., et al., *Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription*. Cell, 2000. 103(6): p. 843-52.
160. Massarweh, S., et al., *Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function*. Cancer Res, 2008. 68(3): p. 826-33.
161. Osborne, C.K., et al., *Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. 95(5): p. 353-61.
162. Taylor, I.W., et al., *Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells*. Cancer Res, 1983. 43(9): p. 4007-10.
163. Blackwell, K.L., et al., *Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models*. Clin Cancer Res, 2000. 6(11): p. 4359-64.
164. Sverrisdottir, A., et al., *Bone mineral density among premenopausal women with early breast cancer in a randomized trial of adjuvant endocrine therapy*. J Clin Oncol, 2004. 22(18): p. 3694-9.
165. Mouridsen, H., 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. 19(10): p. 2596-606.
166. Mouridsen, H., et al., *Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group*. J Clin Oncol, 2003. 21(11): p. 2101-9.
167. Bonnetterre, J., et al., *Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study*. J Clin Oncol, 2000. 18(22): p. 3748-57.
168. Nabholz, J.M., et al., *Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial*. Arimidex Study Group. J Clin Oncol, 2000. 18(22): p. 3758-67.
169. Paridaens, R.J., et al., *Phase III study comparing exemestane with tamoxifen as first-line hormonal treatment of metastatic breast cancer in postmenopausal women: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Breast Cancer Cooperative Group*. J Clin Oncol, 2008. 26(30): p. 4883-90.
170. Howell, A., et al., *Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated*

- with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial.* J Clin Oncol, 2004. 22(9): p. 1605-13.
171. Buchanan, R.B., et al., *A randomized comparison of tamoxifen with surgical oophorectomy in premenopausal patients with advanced breast cancer.* J Clin Oncol, 1986. 4(9): p. 1326-30.
 172. Ingle, J.N., et al., *Randomized trial of tamoxifen alone or combined with aminoglutethimide and hydrocortisone in women with metastatic breast cancer.* J Clin Oncol, 1986. 4(6): p. 958-64.
 173. Sawka, C.A., et al., *A randomized crossover trial of tamoxifen versus ovarian ablation for metastatic breast cancer in premenopausal women: a report of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) trial MA.1.* Breast Cancer Res Treat, 1997. 44(3): p. 211-5.
 174. Crump, M., et al., *An individual patient-based meta-analysis of tamoxifen versus ovarian ablation as first line endocrine therapy for premenopausal women with metastatic breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 1997. 44(3): p. 201-10.
 175. Bachelot, T., et al., *Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study.* J Clin Oncol, 2012. 30(22): p. 2718-24.
 176. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study.* J Natl Cancer Inst, 1998. 90(18): p. 1371-88.
 177. Nabholz, J.M., et al., *Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group.* J Clin Oncol, 2000. 18: p. 3758-67.
 178. Fisher, B., et al., *Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors.* J Natl Cancer Inst, 1996. 88(21): p. 1529-42.
 179. Berstein, L., *Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk.* J Natl Cancer Inst, 1999(19): p. 9.
 180. Davies, C., 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): p. 805-16.
 181. Gray, R., *aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer.* . Journal of Clinical Oncology, 2013. 31(Supplement): p. ASCO MEETING ABSTRACTS ,5.
 182. Fisher, B., et al., *Findings from recent National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies in stage I breast cancer.* J Natl Cancer Inst Monogr, 2001(30): p. 62-6.
 183. Fisher, B., et al., *Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14.* J Natl Cancer Inst, 1994. 86(7): p. 527-37.
 184. Margolese, R.G., et al., *Anastrozole versus tamoxifen in postmenopausal women with ductal carcinoma in situ undergoing lumpectomy plus*

- radiotherapy (NSABP B-35): a randomised, double-blind, phase 3 clinical trial.* Lancet, 2016. 387(10021): p. 849-56.
185. Osborne, C.K., *Tamoxifen in the treatment of breast cancer.* N Engl J Med, 1998. 339(22): p. 1609-18.
 186. EBCTCG, *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.* Lancet, 2005. 365(9472): p. 1687-717.
 187. Fisher, B., et al., *Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: national surgical adjuvant breast and bowel project B-24 randomised controlled trial.* the lancet, 1999. 353: p. 1993-2000.
 188. Ribeiro, G. and R. Swindell, *Adjuvant tamoxifen for male breast cancer (MBC).* Br J Cancer, 1992. 65(2): p. 252-4.
 189. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel project P-1 study.* J Natl Cancer Inst, 1998. 90: p. 1371-88.
 190. Goss, P.E., et al., *Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women.* N Engl J Med, 2011. 364(25): p. 2381-91.
 191. Smith, I.E. and M. Dowsett, *Aromatase inhibitors in breast cancer.* N Engl J Med, 2003. 348(24): p. 2431-42.
 192. Utsumi, T., et al., *Presence of alternatively spliced transcripts of aromatase gene in human breast cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81(6): p. 2344-9.
 193. Ma, X., et al., *Association between CYP19 polymorphisms and breast cancer risk: results from 10,592 cases and 11,720 controls.* Breast Cancer Res Treat, 2010. 122(2): p. 495-501.
 194. Colomer, R., et al., *A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma.* Clin Cancer Res, 2008. 14(3): p. 811-6.
 195. Wang, L., et al., *Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors.* Cancer Res, 2010. 70(1): p. 319-28.
 196. Napoli, N., et al., *Genetic polymorphism at Val80 (rs700518) of the CYP19A1 gene is associated with aromatase inhibitor associated bone loss in women with ER + breast cancer.* Bone, 2013. 55(2): p. 309-14.
 197. Fontein, D.B., et al., *Germline variants in the CYP19A1 gene are related to specific adverse events in aromatase inhibitor users: a substudy of Dutch patients in the TEAM trial.* Breast Cancer Res Treat, 2014. 144(3): p. 599-606.
 198. Su, B., et al., *Growth factor signaling enhances aromatase activity of breast cancer cells via post-transcriptional mechanisms.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. 123(3-5): p. 101-8.
 199. Evans, T.R., et al., *Phase I and endocrine study of exemestane (FCE 24304), a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women.* Cancer Res, 1992. 52(21): p. 5933-9.
 200. Ariazi, E.A., et al., *Exemestane's 17-hydroxylated metabolite exerts biological effects as an androgen.* Mol Cancer Ther, 2007. 6(11): p. 2817-27.
 201. Buzdar, A.U., *Pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors.* Clin Cancer Res, 2003. 9(1 Pt 2): p. 468S-72S.
 202. Yates, R.A., et al., *Arimidex (ZD1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers.* Br J Cancer, 1996. 73(4): p. 543-8.

203. Johannessen, D.C., et al., *Endocrine and clinical effects of exemestane (PNU 155971), a novel steroidal aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients: a phase I study*. Clin Cancer Res, 1997. 3(7): p. 1101-8.
204. Bajetta, E., et al., *Double-blind, randomised, multicentre endocrine trial comparing two letrozole doses, in postmenopausal breast cancer patients*. Eur J Cancer, 1999. 35(2): p. 208-13.
205. Bisagni, G., et al., *Letrozole, a new oral non-steroidal aromatase inhibitor in treating postmenopausal patients with advanced breast cancer. A pilot study*. Ann Oncol, 1996. 7(1): p. 99-102.
206. Smith, I.E., et al., *Adjuvant aromatase inhibitors for early breast cancer after chemotherapy-induced amenorrhoea: caution and suggested guidelines*. J Clin Oncol, 2006. 24(16): p. 2444-7.
207. Geisler, J., et al., *Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer*. Br J Cancer, 1996. 74(8): p. 1286-91.
208. Dowsett, M., et al., *In vivo measurement of aromatase inhibition by letrozole (CGS 20267) in postmenopausal patients with breast cancer*. Clin Cancer Res, 1995. 1(12): p. 1511-5.
209. Geisler, J., et al., *In vivo inhibition of aromatization by exemestane, a novel irreversible aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 1998. 4(9): p. 2089-93.
210. Geisler, J., et al., *Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study*. J Clin Oncol, 2002. 20(3): p. 751-7.
211. MacNeill, F.A., et al., *The influence of aminoglutethimide and its analogue rogletimide on peripheral aromatisation in breast cancer*. Br J Cancer, 1992. 66(4): p. 692-7.
212. Geisler, J., et al., *Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels*. Clin Cancer Res, 2008. 14(19): p. 6330-5.
213. Dixon, J.M., et al., *Letrozole suppresses plasma estradiol and estrone sulphate more completely than anastrozole in postmenopausal women with breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. 26(10): p. 1671-6.
214. Bergh, J., et al., *FACT: an open-label randomized phase III study of fulvestrant and anastrozole in combination compared with anastrozole alone as first-line therapy for patients with receptor-positive postmenopausal breast cancer*. J Clin Oncol, 2012. 30(16): p. 1919-25.
215. Finn, R.S., 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): p. 25-35.
216. Mehta, R.S., et al., *Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2012. 367(5): p. 435-44.
217. Finn RS, M.M., Rugo HS et al. *PALOMA-2: Primary results from a phase III trial of palbociclib (P) with letrozole (L) compared with letrozole alone in postmenopausal women with ER+/HER2- advanced breast cancer (ABC)*. in 2016 ASCO Annual Meeting, Abstract 507. 2016. Chicago.

218. Howell A, C.J., Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hochtin-Boes G, Houghton I, Locker GY, Tobias JS, ATAC Trialists' Group, *Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer*. *The Lancet*, 2005. 365: p. 60-62.
219. Mouridsen, H., et al., *Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer*. *N Engl J Med*, 2009. 361(8): p. 766-76.
220. Lonning, P.E., et al., *Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(22): p. 5126-37.
221. Goss, P.E., et al., *Exemestane versus anastrozole in postmenopausal women with early breast cancer: NCIC CTG MA.27--a randomized controlled phase III trial*. *J Clin Oncol*, 2013. 31(11): p. 1398-404.
222. Bundred, N.J., *The effects of aromatase inhibitors on lipids and thrombosis*. *Br J Cancer*, 2005. 93 Suppl 1: p. S23-7.
223. *Assessment Report pursuant to Article 30 of Directive 2001/83/EC, as amended Arimidex*, 2011, European Medicine Agency.
224. *FDA extended approval for letrozol*. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-letrozole>. 2013.
225. *FDA approval for Aromasin (exemestane)*. 2005.
226. Cohen MH, J.J., Justice R, Pazdur R., *Approval Summary: Letrozole (Femara Tablets) for Adjuvant and Extended Adjuvant Postmenopausal Breast Cancer Treatment: Conversion of Accelerated to Full Approval*. *The Oncologist*, 2011. 16: p. 1762–1770
227. Tulandi, T., et al., *Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate*. *Fertil Steril*, 2006. 85(6): p. 1761-5.
228. Munoz, E., et al., *Ovarian stimulation in patients with breast cancer*. *Ecancermedicalsecience*, 2015. 9: p. 504.
229. Lerrant, Y., et al., *Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary*. *Endocrinology*, 1995. 136(7): p. 2803-8.
230. Williams, G., *Orchidectomy versus long-acting D-Trp-6-LHRH in advanced prostatic cancer*. *Lancet*, 1986. 1(8473): p. 157.
231. Harvey, H.A., et al., *Medical castration produced by the GnRH analogue leuprolide to treat metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1985. 3(8): p. 1068-72.
232. Haas, N.E.B., *Clinical pharmacology and regulatory consequences of GnRH analogues in prostate cancer*. *Eur J Clin Pharmacol* 2014. 70: p. 791–798.
233. Tunn, U.W., et al., *Comparison of LH-RH analogue 1-month depot and 3-month depot by their hormone levels and pharmacokinetic profile in patients with advanced prostate cancer*. *Urol Int*, 1998. 60 Suppl 1: p. 9-16; discussion 16-7.
234. Abouelfadel, Z.C., ED, *Leuprorelin depot injection: patient considerations in the management of prostatic cancer*. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2008. 4(2): p. 513-526.
235. Sanitarios, A.E.d.M.y.P., *Buserelina. Ficha técnica*, 2000.
236. Sanitarios, A.E.d.M.y.P., *Triptorelina: Ficha técnica*, 2015.

237. M., F., *Comparison of the suppressive capacity of different depot Gonadotropin-Releasing Hormone analogues in women.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1993. 77(1): p. 4.
238. Reichel, R.P. and K.W. Schweppe, *Goserelin (Zoladex) depot in the treatment of endometriosis.* Zoladex Endometriosis Study Group. Fertil Steril, 1992. 57(6): p. 1197-202.
239. Cheung T, W.-k.L.K.e.a., *A crossover study of triptorelin and leuprorelin acetate.* Fertility and Sterility 2000. 74 (2): p. 299-305
240. van de Ven, J., et al., *Differential effect of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on estrogen levels and sulfatase activity in uterine leiomyoma and myometrium.* Fertil Steril, 2002. 77(6): p. 1227-32.
241. Filicori, M., et al., *Subcutaneous administration of a depot gonadotropin-releasing hormone agonist induces profound reproductive axis suppression in women.* Fertil Steril, 1998. 69(3): p. 443-9.
242. Schmid, P., et al., *Leuprorelin acetate every-3-months depot versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant treatment in premenopausal patients with node-positive breast cancer: the TABLE study.* J Clin Oncol, 2007. 25(18): p. 2509-15.
243. Masuda, N., et al., *Monthly versus 3-monthly goserelin acetate treatment in pre-menopausal patients with estrogen receptor-positive early breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2011. 126(2): p. 443-51.
244. Donnez, J., et al., *Equivalence of the 3-month and 28-day formulations of triptorelin with regard to achievement and maintenance of medical castration in women with endometriosis.* Fertil Steril, 2004. 81(2): p. 297-304.
245. Aydiner, A., et al., *Two different formulations with equivalent effect? Comparison of serum estradiol suppression with monthly goserelin and trimonthly leuprolide in breast cancer patients.* Med Oncol, 2013. 30(1): p. 354.
246. Boccardo, F., et al., *Ovarian ablation versus goserelin with or without tamoxifen in pre-perimenopausal patients with advanced breast cancer: results of a multicentric Italian study.* Ann Oncol, 1994. 5(4): p. 337-42.
247. Taylor, C.W., et al., *Multicenter randomized clinical trial of goserelin versus surgical ovariectomy in premenopausal patients with receptor-positive metastatic breast cancer: an intergroup study.* J Clin Oncol, 1998. 16(3): p. 994-9.
248. Kaufmann, M., et al., *Goserelin, a depot gonadotrophin-releasing hormone agonist in the treatment of premenopausal patients with metastatic breast cancer.* German Zoladex Trial Group. J Clin Oncol, 1989. 7(8): p. 1113-9.
249. Klijn, J.G. and F.H. de Jong, *Treatment with a luteinising-hormone-releasing-hormone analogue (buserelin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer.* Lancet, 1982. 1(8283): p. 1213-6.
250. Klijn, J.G., et al., *Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials.* J Clin Oncol, 2001. 19(2): p. 343-53.
251. Klijn, J.G., et al., *Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: a randomized study.* J Natl Cancer Inst, 2000. 92(11): p. 903-11.

252. Ingle, J.N., et al., *Randomized trial of bilateral oophorectomy versus tamoxifen in premenopausal women with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 1986. 4(2): p. 178-85.
253. Skarin G, N.S., Wide L, *Pulsatile subcutaneous low-dose gonadotropin releasing hormone treatment of anovulatory infertility*. Fertil Steril, 1983. 40: p. 454.
254. Markusis V, G.M., Tolis G, *Therapeutic use of gonadotropin releasing hormone agonists in polycystic syndrome*. Ann NY Acad Sci, 1993. 687: p. 242-249.
255. Januzzo, M.G.e.a., *Estrogen suppression of 8-week treatment with exemestane combined with triptorelin versus triptorelin alone in healthy premenopausal women*. Breast Cancer Res Treat, 2008. 113: p. 491-49
256. Moore, H.C., et al., *Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy*. N Engl J Med, 2015. 372(10): p. 923-32.
257. Del Mastro, L., et al., *Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial*. JAMA, 2011. 306(3): p. 269-76.
258. Robertson, J.F., et al., *Combined endocrine effects of LHRH agonist (Zoladex) and tamoxifen (Nolvadex) therapy in premenopausal women with breast cancer*. Br J Surg, 1989. 76(12): p. 1262-5.
259. Forward, D.P., et al., *Clinical and endocrine data for goserelin plus anastrozole as second-line endocrine therapy for premenopausal advanced breast cancer*. Br J Cancer, 2004. 90(3): p. 590-4.
260. Carlson, R.W., et al., *Phase II trial of anastrozole plus goserelin in the treatment of hormone receptor-positive, metastatic carcinoma of the breast in premenopausal women*. J Clin Oncol, 2010. 28(25): p. 3917-21.
261. Celio, L., et al., *Premenopausal breast cancer patients treated with a gonadotropin-releasing hormone analog alone or in combination with an aromatase inhibitor: a comparative endocrine study*. Anticancer Res, 1999. 19(3B): p. 2261-8.
262. Dowsett, M., R.C. Stein, and R.C. Coombes, *Aromatization inhibition alone or in combination with GnRH agonists for the treatment of premenopausal breast cancer patients*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. 43(1-3): p. 155-9.
263. Park, I.H., et al., *Phase II parallel group study showing comparable efficacy between premenopausal metastatic breast cancer patients treated with letrozole plus goserelin and postmenopausal patients treated with letrozole alone as first-line hormone therapy*. J Clin Oncol, 2010. 28(16): p. 2705-11.
264. Cheung, K.L., et al., *Suppression of ovarian function in combination with an aromatase inhibitor as treatment for advanced breast cancer in premenopausal women*. Eur J Cancer, 2010. 46(16): p. 2936-42.
265. Rossi, E., et al., *Endocrine effects of adjuvant letrozole + triptorelin compared with tamoxifen + triptorelin in premenopausal patients with early breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. 26(2): p. 264-70.
266. Masuda, N., et al., *Neoadjuvant anastrozole versus tamoxifen in patients receiving goserelin for premenopausal breast cancer (STAGE): a double-blind, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. 13(4): p. 345-52.
267. Walshe, J.M., N. Denduluri, and S.M. Swain, *Amenorrhoea in premenopausal women after adjuvant chemotherapy for breast cancer*. J Clin Oncol, 2006. 24(36): p. 5769-79.

268. Goodwin, P.J., et al., *Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis*. J Clin Oncol, 1999. 17(8): p. 2365-70.
269. Petrek, J.A., et al., *Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study*. J Clin Oncol, 2006. 24(7): p. 1045-51.
270. Bines, J., D.M. Oleske, and M.A. Cobleigh, *Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer*. J Clin Oncol, 1996. 14(5): p. 1718-29.
271. Vanhuysse, M., C. Fournier, and J. Bonnetterre, *Chemotherapy-induced amenorrhea: influence on disease-free survival and overall survival in receptor-positive premenopausal early breast cancer patients*. Ann Oncol, 2005. 16(8): p. 1283-8.
272. Goldhirsch, A., R.D. Gelber, and M. Castiglione, *The magnitude of endocrine effects of adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer patients. The International Breast Cancer Study Group*. Ann Oncol, 1990. 1(3): p. 183-8.
273. Hortobagyi, G.N., et al., *Immediate and long-term toxicity of adjuvant chemotherapy regimens containing doxorubicin in trials at M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute*. NCI Monogr, 1986(1): p. 105-9.
274. Nabholz, J.M., et al., *Taxane-based three-drug combination in metastatic and adjuvant treatment of breast cancer*. Semin Oncol, 1998. 25(5 Suppl 12): p. 27-31.
275. Martin, M., et al., *Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. 352(22): p. 2302-13.
276. Levine, M.N., et al., *Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 1998. 16(8): p. 2651-8.
277. Berliere, M., et al., *Incidence of reversible amenorrhea in women with breast cancer undergoing adjuvant anthracycline-based chemotherapy with or without docetaxel*. BMC Cancer, 2008. 8: p. 56.
278. Swain, S.M., et al., *Amenorrhea in premenopausal women on the doxorubicin-and-cyclophosphamide-followed-by-docetaxel arm of NSABP B-30 trial*. Breast Cancer Res Treat, 2009. 113(2): p. 315-20.
279. Swain, S.M., et al., *Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer*. N Engl J Med. 362(22): p. 2053-65.
280. *Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. Lancet, 1998. 351(9114): p. 1451-67.
281. Colleoni, M., et al., *Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for premenopausal women with lymph node-positive breast cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 13-93*. J Clin Oncol, 2006. 24(9): p. 1332-41.
282. Swain, S.M., J.H. Jeong, and N. Wolmark, *Amenorrhea from breast cancer therapy--not a matter of dose*. N Engl J Med, 2010. 363(23): p. 2268-70.
283. Henry, N.L., et al., *Predictors of recovery of ovarian function during aromatase inhibitor therapy*. Ann Oncol, 2013. 24(8): p. 2011-6.
284. Guerrero, A., et al., *Incidence and predictors of ovarian function recovery (OFR) in breast cancer (BC) patients with chemotherapy-induced amenorrhea (CIA) who switched from tamoxifen to exemestane*. Ann Oncol, 2013. 24(3): p. 674-9.

285. Krekow, L.K., et al., *Incidence and Predictive Factors for Recovery of Ovarian Function in Amenorrhic Women in Their 40s Treated With Letrozole*. J Clin Oncol, 2016. 34(14): p. 1594-600.
286. Albert S Braverman†, H.S., Aron Tendler, Nilesh Patel, Sujatha Rao, Mahmoud El-Tamer, Boriana Kamenova & Jeremy Weedon *Serum estradiol above the postmenopausal level after chemotherapy-induced amenorrhea in breast cancer patients*. Future Medicine, 2006. 3,, 609-612 DOI: DOI 10.2217/14750708.3.5.609
287. Anderson, R.A. and D.A. Cameron, *Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. 96(5): p. 1336-43.
288. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. 365(9472): p. 1687-717.
289. Cuzick, J., et al., *Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial*. Lancet Oncol, 2010. 11(12): p. 1135-41.
290. Regan, M.M., et al., *Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up*. Lancet Oncol, 2011. 12(12): p. 1101-8.
291. Dowsett, M., et al., *Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen*. J Clin Oncol, 2010. 28(3): p. 509-18.
292. Jones E, S.C., Hasenburtg A, et al. . *Results of the First Planned Analysis Of the TEAM (Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multinational) Prospective Randomized Phase III Trial In Hormone Sensitive Postmenopausal Early Breast Cancer*. San Antonio Breast Cancer Symposium 2008, abstract n.15. in San Antonio Breast Cancer Symposium 2008. San Antonio.
293. van de Velde, C.J., et al., *Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial*. Lancet, 2011. 377(9762): p. 321-31.
294. O'Shaughnessy, J., *A decade of letrozole: FACE*. Breast Cancer Res Treat, 2007. 105 Suppl 1: p. 67-74.
295. Bliss, J.M., et al., *Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study*. J Clin Oncol, 2012. 30(7): p. 709-17.
296. Kaufmann, M., et al., *Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study*. J Clin Oncol, 2007. 25(19): p. 2664-70.
297. Dubsy, P.C., et al., *Tamoxifen and anastrozole as a sequencing strategy: a randomized controlled trial in postmenopausal patients with endocrine-responsive early breast cancer from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group*. J Clin Oncol, 2012. 30(7): p. 722-8.
298. Jakesz, R., et al., *Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial*. Lancet, 2005. 366(9484): p. 455-62.

299. Boccardo, F., et al., *Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial.* *Ann Oncol*, 2006. 17 Suppl 7: p. vii10-4.
300. Jonat, W., et al., *Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis.* *Lancet Oncol*, 2006. 7(12): p. 991-6.
301. Boccardo, F., et al., *Switching to an aromatase inhibitor provides mortality benefit in early breast carcinoma: pooled analysis of 2 consecutive trials.* *Cancer*, 2007. 109(6): p. 1060-7.
302. Jin, H., et al., *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): p. 718-21.
303. Mamounas, E.P., et al., *Benefit from exemestane as extended adjuvant therapy after 5 years of adjuvant tamoxifen: intention-to-treat analysis of the National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Project B-33 trial.* *J Clin Oncol*, 2008. 26(12): p. 1965-71.
304. Jakesz, R., et al., *Extended adjuvant therapy with anastrozole among postmenopausal breast cancer patients: results from the randomized Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 6a.* *J Natl Cancer Inst*, 2007. 99(24): p. 1845-53.
305. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00248170?sect=X43dc870156#othr>.
306. Boccardo, F., et al., *Clinical efficacy and endocrine activity of vorozole in postmenopausal breast cancer patients. Results of a multicentric phase II study.* *Ann Oncol*, 1997. 8(8): p. 745-50.
307. Aad, G., et al., *Measurement of Z boson production in Pb-Pb collisions at $\sqrt{s(NN)}=2.76$ TeV with the ATLAS detector.* *Phys Rev Lett*, 2013. 110(2): p. 022301.
308. Gray RG, R.D., Handley K, et al, *Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6953 women with early breast cancer.* *J Clin Oncol*, 2013. 31(18 Supp 5).
309. Burstein, H.J., et al., *Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update.* *J Clin Oncol*, 2014. 32(21): p. 2255-69.
310. Winer, E.P., et al., *American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004.* *J Clin Oncol*, 2005. 23(3): p. 619-29.
311. Goldhirsch, A., et al., *Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009.* *Ann Oncol*, 2009. 20(8): p. 1319-29.
312. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.* *Ann Oncol*, 2011. 22(8): p. 1736-47.
313. Metzger Filho, O., et al., *Relative Effectiveness of Letrozole Compared With Tamoxifen for Patients With Lobular Carcinoma in the BIG 1-98 Trial.* *J Clin Oncol*, 2015. 33(25): p. 2772-9.
314. Burstein, H.J., et al., *Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology*

- Clinical Practice Guideline Update on Ovarian Suppression. J Clin Oncol, 2016. 34(14): p. 1689-701.*
315. Coates, A.S., et al., *-Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann Oncol, 2015. 26(8): p. 1533-46.*
 316. Goss, P.E., et al., *Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. N Engl J Med, 2016.*
 317. Al-Mubarak, M., et al., *Extended adjuvant tamoxifen for early breast cancer: a meta-analysis. PLoS One, 2014. 9(2): p. e88238.*
 318. Cuzick, J., et al., *Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. Lancet, 2007. 369(9574): p. 1711-23.*
 319. Castiglione-Gertsch, M., et al., *Adjuvant chemotherapy followed by goserelin versus either modality alone for premenopausal lymph node-negative breast cancer: a randomized trial. J Natl Cancer Inst, 2003. 95(24): p. 1833-46.*
 320. Davidson, N.E., et al., *Chemoendocrine therapy for premenopausal women with axillary lymph node-positive, steroid hormone receptor-positive breast cancer: results from INT 0101 (E5188). J Clin Oncol, 2005. 23(25): p. 5973-82.*
 321. Arriagada, R., et al., *Randomized trial of adjuvant ovarian suppression in 926 premenopausal patients with early breast cancer treated with adjuvant chemotherapy. Ann Oncol, 2005. 16(3): p. 389-96.*
 322. Kaufmann, M., et al., *A randomised trial of goserelin versus control after adjuvant, risk-adapted chemotherapy in premenopausal patients with primary breast cancer - GABG-IV B-93. Eur J Cancer, 2007. 43(16): p. 2351-8.*
 323. Baum, M., et al., *Adjuvant goserelin in pre-menopausal patients with early breast cancer: Results from the ZIPP study. Eur J Cancer, 2006. 42(7): p. 895-904.*
 324. *Ovarian ablation or suppression in premenopausal early breast cancer: results from the international adjuvant breast cancer ovarian ablation or suppression randomized trial. J Natl Cancer Inst, 2007. 99(7): p. 516-25.*
 325. Roche, H., et al., *Complete hormonal blockade versus epirubicin-based chemotherapy in premenopausal, one to three node-positive, and hormone-receptor positive, early breast cancer patients: 7-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 06 randomised trial. Ann Oncol, 2006. 17(8): p. 1221-7.*
 326. Badros, A., et al., *Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. J Clin Oncol, 2006. 24(6): p. 945-52.*
 327. Francis, P.A., et al., *Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. N Engl J Med, 2015. 372(5): p. 436-46.*
 328. Ribi, K., et al., *Adjuvant Tamoxifen Plus Ovarian Function Suppression Versus Tamoxifen Alone in Premenopausal Women With Early Breast Cancer: Patient-Reported Outcomes in the Suppression of Ovarian Function Trial. J Clin Oncol, 2016. 34(14): p. 1601-10.*
 329. Pagani, O., et al., *Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. N Engl J Med, 2014. 371(2): p. 107-18.*
 330. Gnant, M., et al., *Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial. Lancet Oncol. 12(7): p. 631-641.*

331. Bernhard J, L.W., Ribic K et al. *Patient-reported endocrine symptoms, sexual functioning and quality of life (QoL) in the IBCSG TEXT and SOFT trials: adjuvant treatment with exemestane (E) plus ovarian function suppression (OFS) versus tamoxifen (T) plus OFS in premenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer.* in American Society of Clinical Oncology. 2014 Chicago.
332. Folkerd, E.J., P.E. Lonning, and M. Dowsett, *Interpreting plasma estrogen levels in breast cancer: caution needed.* J Clin Oncol, 2014. 32(14): p. 1396-400.
333. Tai, S.S. and M.J. Welch, *Development and evaluation of a reference measurement procedure for the determination of estradiol-17beta in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Anal Chem, 2005. 77(19): p. 6359-63.
334. Lee, J.S., et al., *Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(10): p. 3791-7.
335. Briciu, R.D., A. Kot-Wasik, and J. Namiesnik, *Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments.* J Chromatogr Sci, 2009. 47(2): p. 127-39.
336. Santen, R.J., et al., *Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy.* Steroids, 2007. 72(8): p. 666-71.
337. Kushnir, M.M., A.L. Rockwood, and J. Bergquist, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology.* Mass Spectrom Rev, 2010. 29(3): p. 480-502.
338. Carvalho, V.M., *The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. 883-884: p. 50-8.
339. Groom, G.V. and K. Griffiths, *Effect of the anti-oestrogen tamoxifen on plasma levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, oestradiol and progesterone in normal pre-menopausal women.* J Endocrinol, 1976. 70(3): p. 421-8.
340. Jordan, V.C., et al., *Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent.* J Natl Cancer Inst, 1991. 83(20): p. 1488-91.
341. Mourits, M.J., et al., *Beware of amenorrhea during tamoxifen: it may be a wolf in sheep's clothing.* J Clin Oncol, 2007. 25(24): p. 3787-8; author reply 3788-9.
342. Yamazaki, R., et al., *Tamoxifen-induced ovarian hyperstimulation during premenopausal hormonal therapy for breast cancer in Japanese women.* Springerplus, 2015. 4: p. 425.
343. Ravdin, P.M., et al., *Endocrine status of premenopausal node-positive breast cancer patients following adjuvant chemotherapy and long-term tamoxifen.* Cancer Res, 1988. 48(4): p. 1026-9.
344. Lønning PE, G.J., Johannessen DC, et al, *Plasma estrogen suppression with aromatase inhibitors evaluated by a novel, sensitive assay for estronesulphate.* J Steroid Biochem Mol Biol 1997. 61(255-260).
345. Santen S.N, F.P.D.a.S.R.J., *In situ estrogen production via the estrone sulfatasa pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway.* J Clin Endoc Metab, 1984. 59: p. 29-33.
346. Pasquallini JR, G.C., Nguyen BL and Vella C, *Importance of estrogen sulfates in breast cancer.* J Steroid Bioch. 1989. 34: p. 155-163.

347. Lonning, P.E., et al., *Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. 52(5): p. 491-6.
348. Dowsett M, M.M., Griggs DJ and Jeffcoate SL., *Validation and use of centrifugal-ultrafiltration-dialysis in the measurement of percent free estradiol in serum.* J Steroid Bioch, 1984. 21: p. 343-345.
349. Rossi, E., et al., *Endocrine effects of adjuvant letrozole compared with tamoxifen in hormone-responsive postmenopausal patients with early breast cancer: the HOBOE trial.* J Clin Oncol, 2009. 27(19): p. 3192-7.
350. Folkerd, E.J., et al., *Suppression of plasma estrogen levels by letrozole and anastrozole is related to body mass index in patients with breast cancer.* J Clin Oncol, 2012. 30(24): p. 2977-80.
351. Sestak, I., et al., *Effect of body mass index on recurrences in tamoxifen and anastrozole treated women: an exploratory analysis from the ATAC trial.* J Clin Oncol, 2010. 28(21): p. 3411-5.
352. Pfeiler, G., et al., *Impact of body mass index on the efficacy of endocrine therapy in premenopausal patients with breast cancer: an analysis of the prospective ABCSG-12 trial.* J Clin Oncol, 2011. 29(19): p. 2653-9.
353. Ewertz, M., et al., *Obesity and risk of recurrence or death after adjuvant endocrine therapy with letrozole or tamoxifen in the breast international group 1-98 trial.* J Clin Oncol, 2012. 30(32): p. 3967-75.
354. Blamey, R.W., et al., *Goserelin depot in the treatment of premenopausal advanced breast cancer.* Eur J Cancer, 1992. 28A(4-5): p. 810-4.
355. Jannuzzo, M.G., et al., *Estrogen suppression in premenopausal women following 8 weeks of treatment with exemestane and triptorelin versus triptorelin alone.* Breast Cancer Res Treat, 2009. 113(3): p. 491-9.
356. Walker, K.J., et al., *Endocrine effects of combination antioestrogen and LH-RH agonist therapy in premenopausal patients with advanced breast cancer.* Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(4): p. 651-4.
357. Torrisi, R., et al., *Antitumour and biological effects of letrozole and GnRH analogue as primary therapy in premenopausal women with ER and PgR positive locally advanced operable breast cancer.* Br J Cancer, 2007. 97(6): p. 802-8.
358. Dowsett, M., et al., *Vorzole results in greater oestrogen suppression than formestane in postmenopausal women and when added to goserelin in premenopausal women with advanced breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 1999. 56(1): p. 25-34.
359. Soysal, S., et al., *The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial.* Hum Reprod, 2004. 19(1): p. 160-7.
360. Filicori, M., et al., *Comparison of the suppressive capacity of different depot gonadotropin-releasing hormone analogs in women.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. 77(1): p. 130-3.
361. Phillips, K.A., et al., *Cognitive function in postmenopausal breast cancer patients one year after completing adjuvant endocrine therapy with letrozole and/or tamoxifen in the BIG 1-98 trial.* Breast Cancer Res Treat, 2011. 126(1): p. 221-6.
362. Phillips, K.A., et al., *Adjuvant ovarian function suppression and cognitive function in women with breast cancer.* Br J Cancer, 2016. 114(9): p. 956-64.

363. Meritxell Bellet, K.P.G., Prudence A. Francis, Istvan Lang, Eva Ciruelos, Ana Lluch, Miguel Angel Climent, Gustavo Catalan, Roser Ferrer Costa, Roberto Catalan, Agnita Rajasekaran, Josefa Morales, Josep Vazquez, Gini F. Fleming, Karen N. Price, Meredith M. Regan, *Estrogen levels in premenopausal (prem) patients (pts) with hormone-receptor positive (HR+) early breast cancer (BC) receiving adjuvant triptorelin (Trip) plus exemestane (E) or tamoxifen (T) in the SOFT trial: SOFT-EST substudy.* . 2014 ASCO Annual Meeting Abstract No: 585
364. Goss, P.E., et al., *Effects of steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors on markers of bone turnover in healthy postmenopausal women.* Breast Cancer Res, 2007. 9(4): p. R52.
365. Rose C, V.O., Pluzanska A, et al. An open randomised trial of second-line endocrine therapy in advanced breast cancer: comparison of the aromatase inhibitors letrozole and anastrozole. Eur J Cancer 39: 2318-2327, 2003, *An open randomised trial of second-line endocrine therapy in advanced breast cancer: comparison of the aromatase inhibitors letrozole and anastrozole.* . Eur J Cancer 200339: p. 2318-2327
366. Campos, S.M., et al., *A comparative study of exemestane versus anastrozole in patients with postmenopausal breast cancer with visceral metastases.* Clin Breast Cancer, 2009. 9(1): p. 39-44.
367. Ellis, M.J., Suman, V. J., Hoog, J.,. Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: Clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype - ACOSOG Z1031. Journal of Clinical Oncology, 29(17), 2342-2349, *Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: Clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype - ACOSOG Z1031.* J Clin Oncol, 2011. 29(17): p. 2342-2349
368. Gnant, M., et al., *Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial.* Lancet Oncol, 2011. 12(7): p. 631-41.
369. Georg Pfeiler, R.K., Lidija Filipcic, Richard Greil, Herbert Stoger, Christian F. Singer, Michael Knauer, Guenther G. Steger, Michael Seifert, Peter Christian Dubsy, Florian Fitzal, Marija Balic, Vesna Bjelic-Radisic, Brigitte Mlineritsch, Christian Marth, Michael Gnant. *Follicle stimulating hormone (FSH) as a surrogate parameter for the effectiveness of endocrine therapy with or without zoledronic acid in premenopausal patients with breast cancer: An analysis of the prospective ABCSG-12 trial.* in 2014 ASCO Annual Meeting 2014. Chicago: J Clin Oncol.
370. Ortmann, O., et al., *Which factors should be taken into account in perimenopausal women with early breast cancer who may become eligible for an aromatase inhibitor? Recommendations of an expert panel.* Cancer Treat Rev, 2011. 37(2): p. 97-104.
371. Goodwin, P.J., et al., *Adjuvant treatment and onset of menopause predict weight gain after breast cancer diagnosis.* J Clin Oncol, 1999. 17(1): p. 120-9.

372. Partridge, A.H., et al., *Ovarian reserve in women who remain premenopausal after chemotherapy for early stage breast cancer*. *Fertil Steril*, 2010. 94(2): p. 638-44.
373. Sherman, B.M., et al., *Endocrine consequences of continuous antiestrogen therapy with tamoxifen in premenopausal women*. *J Clin Invest*, 1979. 64(2): p. 398-404.
374. information, F.p., <https://www.drugs.com/pro/tamoxifen.html>.
375. Hubalek, M., et al., *Does obesity interfere with anastrozole treatment? Positive association between body mass index and anastrozole plasma levels*. *Clin Breast Cancer*, 2014. 14(4): p. 291-6.
376. Lonning, P.E., B.P. Haynes, and M. Dowsett, *Relationship of body mass index with aromatisation and plasma and tissue oestrogen levels in postmenopausal breast cancer patients treated with aromatase inhibitors*. *Eur J Cancer*, 2014. 50(6): p. 1055-64.
377. Pfeiler, G., et al., *Impact of body mass index on estradiol depletion by aromatase inhibitors in postmenopausal women with early breast cancer*. *Br J Cancer*, 2013. 109(6): p. 1522-7.
378. Diorio, C., et al., *Aromatase inhibitors in obese breast cancer patients are not associated with increased plasma estradiol levels*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. 136(2): p. 573-9.
379. Ligibel, J.A. and E.P. Winer, *Aromatase inhibition in obese women: how much is enough?* *J Clin Oncol*, 2012. 30(24): p. 2940-2.
380. Buzdar AU, et al., *The efficacy of anastrozole is not dependent upon body mass index (BMI) in postmenopausal women with advanced breast cancer (BC)* *Proc Am Soc Clin Oncol* 21(abstr 219):55a. 2002.
381. Jonat, W., et al., *A randomised trial comparing two doses of the new selective aromatase inhibitor anastrozole (Arimidex) with megestrol acetate in postmenopausal patients with advanced breast cancer*. *Eur J Cancer*, 1996. 32A(3): p. 404-12.
382. Hongchao Pan, R.G.G. *Effect of obesity in premenopausal ER+ early breast cancer: EBCTCG data on 80,000 patients in 70 trials*. in *American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2014. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 503)
J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 503).
383. Dignam, J.J., et al., *Obesity, tamoxifen use, and outcomes in women with estrogen receptor-positive early-stage breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(19): p. 1467-76.
384. Pfeiler, G., et al., *Efficacy of tamoxifen +/- aminoglutethimide in normal weight and overweight postmenopausal patients with hormone receptor-positive breast cancer: an analysis of 1509 patients of the ABCSG-06 trial*. *Br J Cancer*, 2013. 108(7): p. 1408-14.
385. Bonnetterre, J., et al., *Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma*. *Cancer*, 2001. 92(9): p. 2247-58.
386. Seynaeve C, H.E., Hasenburg A, et al, *The impact of body mass index (BMI) on the efficacy of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal hormone sensitive breast cancer (BC) patients; exploratory analysis from the TEAM study*. Presented at: 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 8–12, 2010; San Antonio, TX. Abstract S2–3.

387. Pfeiler, G., et al., *Impact of Body Mass Index on the Efficacy of Endocrine Therapy in Premenopausal Patients With Breast Cancer: An Analysis of the Prospective ABCSG-12 Trial*. J Clin Oncol.
388. Chlebowski, R.T., J. Kim, and R. Haque, *Adherence to endocrine therapy in breast cancer adjuvant and prevention settings*. Cancer Prev Res (Phila), 2014. 7(4): p. 378-87.
389. Spinelli R, J.M., Pogessi I, et al, : *Pharmacokinetics (PK) of Aromasin (Exemestane, EXE) after single and repeated doses in healthy postmenopausal volunteers (HPV)*. Eur. J. Cancer 35 (Suppl 4): S295, 1999
- 1999.
390. Lunardi, G., et al., *Plasma estrone sulfate concentrations and genetic variation at the CYP19A1 locus in postmenopausal women with early breast cancer treated with letrozole*. Breast Cancer Res Treat, 2013. 137(1): p. 167-74.
391. Nagao, T., et al., *Serum estradiol should be monitored not only during the perimenopausal period but also the post-menopausal period at the time of aromatase inhibitor administration*. World J Surg Oncol, 2009. 7: p. 88.
392. Anderson, R.A. and D.A. Cameron, *Assessment of the effect of chemotherapy on ovarian function in women with breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. 25(12): p. 1630-1; author reply 1632.
393. Anders, C., et al., *A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer*. Cancer Invest, 2008. 26(3): p. 286-95.
394. Dieudonne, A.S., et al., *Undetectable antimullerian hormone levels and recovery of chemotherapy-induced ovarian failure in women with breast cancer on an oral aromatase inhibitor*. Menopause, 2011. 18(7): p. 821-4.
395. Dowsett, M., P.E. Lonning, and N.E. Davidson, *Incomplete Estrogen Suppression With Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists May Reduce Clinical Efficacy in Premenopausal Women With Early Breast Cancer*. J Clin Oncol, 2016. 34(14): p. 1580-3.
396. Klotz, L., et al., *The efficacy and safety of degarelix: a 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer*. BJU Int, 2008. 102(11): p. 1531-8.