

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE**

**Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche (DI.M.I)**

**Tesi di specializzazione in Oncologia Medica**



**Titolo della tesi**

**Validation of PREDICT tool version 2.2 in early-stage breast cancer  
(BC) patients enrolled in adjuvant trials by the Gruppo Italiano  
Mammella (GIM) and Mammella Intergruppo (MIG)**

Anno accademico 2022/2023

**Relatore:** Prof.ssa Lucia Del Mastro

**Correlatore:** Prof. Lambertini Matteo

**Candidato:** Roberto Borea

## Sommario

<b>1. Epidemiologia</b> .....	<b>3</b>
1.1 Fattori di rischio .....	3
<b>2. Diagnosi e Classificazione</b> .....	<b>5</b>
2.1 Diagnosi clinica e radiologica .....	5
2.2 Classificazione anatomopatologica .....	5
2.3 Classificazione TNM e grading .....	6
2.4 Classificazione Molecolare.....	9
2.5 Fattori prognostici e predittivi .....	10
<b>3. Trattamenti del carcinoma mammario</b> .....	<b>10</b>
3.1 Intervento chirurgico .....	10
3.2 Trattamento neoadiuvante .....	11
3.3 Trattamento Adiuvante .....	11
<b>4. PREDICT Breast Cancer</b> .....	<b>12</b>
4.1 Validazioni di PREDICT Breast Cancer.....	14
<b>5. Razionale dello studio</b> .....	<b>16</b>
<b>6. Obiettivi dello Studio</b> .....	<b>16</b>
<b>7. Materiali e Metodi</b> .....	<b>17</b>
7.1 Popolazione in studio.....	17
7.2 Estrazione dei Dati .....	18
7.3 Analisi Statistica .....	19
<b>8. Risultati dello studio</b> .....	<b>19</b>
8.1 Discrimination .....	19
8.2 Calibrazione .....	20
<b>9. Conclusioni</b> .....	<b>24</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>26</b>

## 1. Epidemiologia

Il tumore della mammella è la neoplasia più frequente nel sesso femminile, rappresentando il 30% di tutte le neoplasie che interessano le donne. A oggi circa 834.200 donne sono vive dopo la diagnosi di tumore alla mammella con una sopravvivenza netta del 88% a 5 anni dalla diagnosi. L'introduzione di nuove tecniche diagnostiche, come la tomosintesi digitale (BDT) e la Contrast-enhanced Spectral Mammography (CESM), ha permesso un miglioramento nel campo della diagnosi precoce. La BDT consente la ricostruzione di immagini 3D attraverso un numero limitato di proiezioni a raggi X, permettendo una visione dettagliata delle possibili anomalie. La CESM, sfrutta l'utilizzo di un mezzo di contrasto, generalmente a base di iodio, per visualizzare le lesioni più nitidamente rispetto alla mammografia standard. Queste nuove tecnologie hanno notevolmente aumentato la capacità di individuare tumori in fase precoce, aumentando, di conseguenza, le possibilità di cura per le donne affette da questa malattia.<sup>1</sup> Nel 6-7% dei casi il tumore alla mammella è diagnosticato nella fase metastatica ed oggi in Italia si stima che circa 37.000 donne vivano con un carcinoma della mammella metastatico. Grazie ai progressi diagnostico-terapeutici, alla disponibilità di nuovi farmaci antitumorali, alle migliori terapie di supporto e alla migliore integrazione delle terapie sistemiche con le terapie locali, l'Overall Survival (OS) di queste pazienti è notevolmente aumentata.<sup>2</sup>

### 1.1 Fattori di rischio

Il carcinoma della mammella è una malattia multifattoriale che riconosce diversi fattori di rischio, modificabili e non modificabili, che contribuiscono alla sua insorgenza. La sua incidenza, mortalità e tasso di sopravvivenza variano globalmente, il che potrebbe essere dovuto a diversi fattori come la struttura della popolazione, lo stile di vita, fattori genetici, ambiente ed accesso alle cure.<sup>3</sup> Il fattore di rischio che più di tutti aumenta il rischio di carcinogenesi è l'età, il cancro al seno viene diagnosticato più frequentemente nelle donne tra i 55 e i 64 anni con un'età media di 61 anni.<sup>4</sup> Altri fattori di rischio predisponenti allo sviluppo del tumore alla mammella sono:

Fattori riproduttivi: la correlazione tra fattori riproduttivi e tumore al seno è legata all'effetto della produzione ovarica di ormoni che inizia alla pubertà e continua attraverso i cicli mensili fino ad arrivare alla menopausa.<sup>4</sup> Un menarca precoce e una menopausa tardiva, cosiddetta finestra estrogenica, comportano un periodo più lungo di esposizione dell'epitelio mammario agli estrogeni, i quali sono associati, sia in

forma esogena che endogena, ad un aumentato rischio di sviluppo di carcinoma mammario.<sup>5</sup> Nel periodo post menopausale, quando i livelli di estrogeni dovrebbero essere più bassi, è stato dimostrato che la presenza di alti livelli di estradiolo nel sangue, è associato a un rischio circa doppio di sviluppare un cancro al seno rispetto a coloro che hanno livelli di questo ormone circolante basso.<sup>6</sup> Il meccanismo più probabile con cui l'estradiolo impatta sul rischio di sviluppo di questo tumore sarebbe a causa del ruolo che ha questo ormone sul controllare il tasso mitotico dell'epitelio mammario causando un'aumentata replicazione cellulare e di conseguenza una probabilità maggiore di insorgenza di mutazioni.<sup>6</sup> Molti studi hanno mostrato come l'allattamento, insieme alla multiparità, abbiano un effetto protettivo sul rischio di sviluppo del cancro al seno: allattare per almeno 6 mesi ha mostrato avere il maggior effetto nel diminuire il rischio, soprattutto, in donne che in seguito hanno sviluppato tumori recettori negativi.<sup>7</sup>

Fattori ormonali: il rischio di sviluppare un carcinoma mammario è più alto di circa 1.20 volte nelle donne che fanno uso di contraccettivi ormonali rispetto alle donne che non ne hanno mai fatto uso.<sup>8</sup>

Ereditarietà: con il termine "ereditario" ci si riferisce a quelle patologie oncologiche che insorgono a causa della presenza di varianti genetiche che conferiscono il rischio di sviluppare una neoplasia sensibilmente superiori a quelli della popolazione generale. Il tumore alla mammella ereditario conta circa il 5-10% di tutti i casi diagnosticati, la sua genesi risulta associata a particolari geni che nel 90% dei casi sono varianti patogenetiche dei geni (Breast CAncer gene) BRCA1 e BRCA2, ereditati in maniera autosomica dominante.<sup>9</sup> Il rischio di sviluppare un carcinoma mammario nelle donne portatrici di mutazione BRCA1 entro gli 80 anni è del 72% mentre per le portatrici di mutazione BRCA2 è del 69%.<sup>10</sup>

Fattori legati alla mammella: l'aumentata densità mammaria è associata a un aumentato rischio. Sembra che l'aumento della densità sia legato a un maggior numero di cellule mammarie che vengono esposte agli stimoli cancerogeni e di conseguenza si stima ci sia un incremento del rischio di 4-6 volte nelle donne con una densità mammaria del 75%.<sup>11</sup>

Stile di vita: è evidente che comportamenti nocivi alla salute possano essere associati allo sviluppo di varie neoplasie, tra cui, quella alla mammella. Il consumo di alcolici, l'abitudine al fumo di sigaretta, il peso corporeo e la ridotta attività fisica configurano come i principali protagonisti in un aumentato rischio.<sup>12</sup> L'obesità ed il sovrappeso

sembrano essere fattori di rischio sia nelle donne che non hanno mai avuto un tumore della mammella sia nelle donne che hanno già ricevuto una diagnosi. Dopo la menopausa, le donne che soffrono di obesità, ovvero con un BMI (Body Mass Index, indice di massa corporea) superiore a 30, o sono in sovrappeso, BMI compreso tra 25 e 29,9, hanno un rischio di sviluppare un cancro mammario maggiore del 50% rispetto alle donne normopeso con quindi un BMI tra 18,5 e 24,9. Questo avviene a causa non solo di una maggior biodisponibilità degli estrogeni endogeni ma anche per una maggior attività aromatasica del tessuto adiposo che, di conseguenza, aumenta ancora di più la concentrazione degli estrogeni circolanti.<sup>13</sup>

Radiazioni ionizzanti: il tessuto mammario è altamente sensibile alle radiazioni, si è stimato che le donne esposte alle radiazioni ionizzanti prima dei 20 anni abbiano un rischio più alto di sviluppare un carcinoma mammario.<sup>14</sup>

## 2. Diagnosi e Classificazione

### 2.1 Diagnosi clinica e radiologica

La diagnosi di tumore al seno è istopatologica, necessaria a valutare i fattori prognostici e predittivi della malattia. La stadiazione clinica inizia con l'esame obiettivo della mammella che prevede l'ispezione, la palpazione sia a livello mammario che linfonodale. L'esame obiettivo deve comprendere anche la valutazione degli altri distretti corporei per valutare comorbilità e possibili sedi di metastasi. Dopo l'esame obiettivo si prosegue con la mammografia bilaterale, capace di identificare la maggior parte dei noduli mammari e con l'ecografia utilizzata, sia sulle mammelle più dense, sia per analizzare il cavo ascellare e identificare linfadenomegalie, se presenti. In alcuni casi può essere utilizzata la tomosintesi, una tecnica simile alla mammografia, o la RM con mezzo di contrasto, in grado di analizzare meglio le neoplasie multifocali o multicentriche (25).

### 2.2 Classificazione anatomopatologica

L'analisi istopatologica del tessuto prelevato grazie alle biopsie effettuate sulle nodulazioni sospette ci permette di avere la classificazione patologica definitiva e le informazioni sulla biologia del tumore come l'espressione dei recettori ormonali per estrogeno (ER), progesterone (PgR), l'espressione di HER2 (Human Epidermal growth Factor Receptor 2), il livello di espressione dell'antigene Ki-67 (proteina

nucleare strettamente associata alla proliferazione cellulare), il grado tumorale, ed altri fattori che negli ultimi anni stanno assumendo rilevanza clinica come la presenza di Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs). La classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) divide i tipi di tumore invasivi basandosi sulle caratteristiche morfologiche. Il principale gruppo delle neoplasie mammarie è dei tumori epiteliali, divisi grossolanamente in carcinomi non di istotipo speciale (detti NST, Non Special Type), che rappresentano la forma più comune di carcinoma della mammella, e il gruppo dei carcinomi di istotipo speciale, che costituisce il 25% di tutti i carcinomi di nuova insorgenza. La sottotipizzazione dei carcinomi ha una valenza prognostica: i carcinomi a istotipo speciale hanno una migliore sopravvivenza rispetto ai carcinomi NST. Il carcinoma NST, una volta chiamato duttale infiltrante, costituisce il 75% di tutti i carcinomi mammari e rappresenta una diagnosi di esclusione, in quanto viene definita una neoplasia epiteliale maligna che non presenta i criteri tipici di un istotipo speciale. Questo tipo di carcinoma può presentare una eterogeneità morfologica elevata a causa dei vari pattern di crescita che può avere e nel 75% dei casi è positiva per ER, il 15% risulta HER2 positivo mentre i casi rimanenti hanno fenotipo triplo negativo.<sup>15</sup>

### 2.3 Classificazione TNM e grading

La classificazione secondo il sistema TNM è utilizzata per valutare il tumore e si basa sull'utilizzo di 3 caratteristiche, ovvero, T che esprime l'estensione del tumore primitivo, N che corrisponde all'interessamento dei linfonodi locoregionali e M la presenza di metastasi. Questa classificazione può essere clinica, basata sull'esame obiettivo e sui dati radiologici, oppure patologica, basata sui dati ottenuti dopo un intervento chirurgico (*Figura 1 e 2*). L'attuale classificazione TNM si basa sull'ottava edizione delle linee guida dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) entrata in vigore dal 2017 ed è basata sulla estensione anatomica del carcinoma mammario (T, N e M) ed una classificazione prognostica (prognostic stage group) che include oltre alle variabili anatomiche anche il grado tumorale, lo stato dei recettori ormonali e lo stato di HER2. Inoltre, nei tumori ER+/HER2- è previsto, in caso di utilizzo di signature prognostica con risultato a basso rischio, il cambio di stadio verso uno a migliore prognosi.<sup>16</sup> Una volta identificate le caratteristiche tumorali, queste vengono utilizzate per classificare in stadi che hanno una valenza terapeutica e prognostica (*Figura 3*).

<b>CLASSIFICAZIONE CLINICA AJCC 2017</b>	
<b>T = TUMORE PRIMITIVO</b>	
TX	tumore primitivo non definibile
T0	non evidenza del tumore primitivo
Tis	carcinoma in situ Tis (DCIS) carcinoma duttale in situ Tis (Paget) malattia di Paget del capezzolo non associata con carcinoma invasivo e/o in situ nel parenchima mammario sottostante
T1	tumore della dimensione massima fino a 2 cm T1 mi microinvasione della dimensione massima di 0,1 cm T1a tumore dalla dimensione compresa tra 0,1 cm e 0,5 cm T1b tumore dalla dimensione compresa tra 0,6 cm e 1,0 cm T1c tumore dalla dimensione compresa tra 1,1 cm e 2,0 cm
T2	tumore superiore a 2,0 cm ma non superiore a 5,0 cm nella dimensione massima
T3	tumore superiore a 5,0 cm nella dimensione massima
T4	qualsiasi dimensione con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute (ulcerazione o noduli cutanei) T4a estensione alla parete toracica esclusa la sola aderenza/invasione del m. pettorale T4b Ulcerazione della cute e/o noduli cutanei satelliti ipsilaterali e/o edema della cute (inclusa cute a buccia d'arancia) che non presenta i criteri per definire il carcinoma infiammatorio T4c presenza contemporanea delle caratteristiche di T4a e T4b T4d carcinoma infiammatorio

<b>CLASSIFICAZIONE CLINICA AJCC 2017</b>	
<b>N = LINFONODI REGIONALI</b>	
Nx	linfonodi regionali non valutabili
N0	linfonodi regionali liberi da metastasi
N1	linfonodi ascellari omolaterali del I o II livello metastatici e mobili
N2	linfonodi ascellari omolaterali del I o II livello metastatici e clinicamente fissi tra di loro o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili in assenza di metastasi clinicamente evidenti nei linfonodi ascellari N2a linfonodi ascellari omolaterali metastatici e fissi tra di loro o ad altre strutture N2b metastasi linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili e in assenza di metastasi clinicamente evidenti nei linfonodi ascellari
N3	metastasi ai linfonodi sottoclaveari omolaterali o ai linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili in presenza di metastasi nei linfonodi ascellari livello I-II clinicamente evidenti; o metastasi in uno o più linfonodi sovraclaveari omolaterali con o senza coinvolgimento dei linfonodi ascellari o mammari interni N3a metastasi nei linfonodi sottoclaveari omolaterali N3b metastasi nei linfonodi mammari interni e ascellari N3c metastasi nei linfonodi sovraclaveari

<b>CLASSIFICAZIONE CLINICA AJCC 2017</b>	
<b>M = METASTASI A DISTANZA</b>	
MX	metastasi a distanza non accertabili
MO	non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza cM0(i+) non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza, ma depositi di cellule tumorali evidenziati mediante biologia molecolare o microscopicamente nel sangue, midollo osseo o in altri tessuti diversi dai linfonodi regionali, di dimensioni non superiori a 0,2 mm in una paziente senza segni o sintomi di metastasi
M1	metastasi a distanza evidenziate mediante classici esami clinico e radiologico e/o istologicamente dimostrate di dimensioni superiori a 0,2 mm

Figura 1 - Classificazione TNM clinica, AJCC 2017

**CLASIFICAZIONE PATOLOGICA AJCC 2017 (ottava edizione)**

**pT = TUMORE PRIMITIVO**

**TX** Il parametro T è definito con gli stessi criteri della classificazione clinica

**pN = LINFONODI REGIONALI**

<b>pNx</b>	linfonodi regionali non possono essere definiti (es: perché precedentemente rimossi)
<b>pN0</b>	assenza di metastasi ai linfonodi regionali o presenza di sole cellule tumorali isolate (ITC) <sup>8</sup> Se il dato è basato sulla biopsia del linfonodo sentinella senza la dissezione ascellare va aggiunto (sn). <b>pN0 (i-)</b> assenza di metastasi nei linfonodi all'istologia <b>pN0 (i+)</b> presenza di cellule maligne (ITC) nei linfonodi regionali non superiori a 0,2 mm <b>pN0 (mol+)</b> non metastasi nei linfonodi regionali istologicamente accertate, RT-PCR negativa <b>pN0 (mol+)</b> RT-PCR positiva ma non metastasi nei linfonodi all'istologia o all'immunoistochimica
<b>pN1</b>	micrometastasi; o metastasi in 1-3 linfonodi ascellari e/o metastasi nei linfonodi mammari interni omolaterali rilevate con biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili: <b>pN1 mi</b> micrometastasi superiori a 0,2 mm e/o più di 200 cellule, ma non più grandi di 2 mm <b>pN1a</b> metastasi in 1-3 linfonodi ascellari, includendo almeno una metastasi delle dimensioni massime superiori a 2 mm <b>pN1b</b> metastasi nei linfonodi mammari interni ITC escluse <b>pN1c</b> Combinazione di pN1a e pN1b
<b>pN2</b>	metastasi in 4-9 linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari <b>pN2a</b> metastasi in 4-9 linfonodi ascellari, con almeno una localizzazione tumorale delle dimensioni massime superiori a 2 mm <b>pN2b</b> metastasi clinicamente rilevabili nei linfonodi mammari interni in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari
<b>pN3</b>	metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi sottoclavicolari (livello III ascellare) omolaterali o metastasi clinicamente rilevabili nei linfonodi mammari interni omolaterali in presenza di metastasi in uno o più linfonodi ascellari positivi livello I-II; o metastasi in più di 3 linfonodi ascellari e nei linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche o macroscopiche evidenziate con biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili; o metastasi nei linfonodi sovraclaveari omolaterali <b>pN3a</b> pN3a metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali (almeno uno delle dimensioni massime superiori a 2 mm); o metastasi nei linfonodi sottoclavicolari (linfonodi ascellari III livello) <b>pN3b</b> metastasi clinicamente rilevabili nei linfonodi mammari interni omolaterali in presenza di metastasi in uno o più linfonodi ascellari; o metastasi in più di tre linfonodi ascellari e nei linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche o macroscopiche rilevate attraverso biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili <b>pN3c</b> metastasi nei linfonodi sovraclaveari omolaterali

**M = METASTASI A DISTANZA**

**pM** Il parametro T è definito con gli stessi criteri della classificazione clinica

*Figura 2 - Classificazione patologica TNM, AJCC 2017*

CLASIFICAZIONE IN STADI 2017			
Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio I A	T1	N0	M0
Stadio IB	T0	N1 mi	M0
	T1	N1 mi	M0
Stadio II A	T0	N1 ml	M0
	T1	N1 mi	M0
	T2	N0	M0
Stadio II B	T2	N1	M0
	T3	N0	
Stadio III A	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1	
	T3	N2	
Stadio III B	T4	N0	M0
	T4	N1	
	T4	N2	
Stadio III C	Ogni T	N3	M0

**NOTE**

- Se una paziente si presenta con M1 prima di una terapia sistemica neoadiuvante, lo stadio è considerato IV e rimane IV indipendentemente dalla risposta alla terapia neoadiuvante.
- La designazione di stadio può cambiare se esami diagnostici per immagine rivelano la presenza di metastasi a distanza, a condizione che siano stati eseguiti entro quattro mesi dalla diagnosi in assenza di progressione di malattia e che la paziente non abbia ricevuto terapia neoadiuvante.
- Nessun gruppo di stadio è assegnato nel caso di ottenimento di una risposta completa patologica dopo terapia neoadiuvante (ad esempio ypT0N0 cM0).
- M0 comprende M0(i+).

Figura 3- Stadiazione del carcinoma mammario. AJCC 2017

Il grado istologico di una neoplasia (grading), definisce quanto una lesione sia differenziata e costituisce pertanto un parametro fondamentale da valutare in ogni carcinoma mammario di nuova diagnosi. Il grading non solo è un fattore prognostico importante ma è anche un fattore predittivo perché correla con la risposta alle terapie mediche.<sup>17</sup> Il sistema di grading istologico è stato proposto da Elston ed Ellis e si basa sulla valutazione di 3 parametri: percentuale di formazioni di strutture tubulari; Numero di mitosi per mm; ed il Pleomorfismo nucleare. Ad ognuno di questi parametri viene associato un punteggio che varia da 1 a 3 e la somma dei tre punteggi determina uno score sulla quale si definisce il grado istologico.

## 2.4 Classificazione Molecolare

Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e pazienti con tumori apparentemente simili per caratteristiche clinico-patologiche possono presentare un decorso clinico diverso. In base alle caratteristiche molecolari possiamo avere un comportamento biologico, una risposta alla terapia e una prognosi diversa. La classificazione molecolare, tramite analisi immunohistochimica, si basa sul grado di espressione dei recettori ormonali (ER e PgR), sulla positività o meno a HER2 e sul grado di proliferazione Ki-67. L'analisi di questi valori ha portato alla individuazione di 4 sottogruppi: Luminale A; Luminale B; HER2 positivi; e Neoplasie "Basal like" o triple negative.<sup>18</sup>

## 2.5 Fattori prognostici e predittivi

I fattori prognostici sono strettamente correlati alla sopravvivenza del paziente mentre i fattori predittivi sono correlati all'efficacia del trattamento antitumorale che verrà messo in atto. I fattori prognostici che vengono considerati più importanti sono la dimensione del tumore; l'interessamento dei linfonodi ascellari; il grado istologico; l'attività proliferativa (Ki-67); il tipo istologico; lo stato di HER2 e dei recettori ormonali; la presenza dei TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes); l'età ed il profilo molecolare. I fattori predittivi sono lo stato di HER2 e dei recettori ormonali; l'espressione di PD-L1; e le mutazioni di BRCA.

## 3. Trattamenti del carcinoma mammario

### 3.1 Intervento chirurgico

Per il trattamento chirurgico del carcinoma alla mammella esistono due possibilità: la chirurgia radicale e la chirurgia conservativa. La scelta del tipo di intervento dipende principalmente dalla localizzazione e dimensione del tumore, dalla dimensione della mammella, dalle caratteristiche radiologiche del tumore e dalle preferenze della paziente. Gli interventi chirurgici hanno l'obiettivo di essere radicali, quindi, di asportare tutto la neoplasia lasciando dei margini liberi da malattia, mantenendo un buon risultato estetico.<sup>19</sup> La chirurgia conservativa, insieme alla biopsia del linfonodo sentinella, associati alla irradiazione completa della mammella sono la tecnica di prima scelta per le donne con carcinoma invasivo di stadio I-II.<sup>20</sup> Nelle pazienti in cui non è possibile eseguire una chirurgia conservativa, lo standard è rappresentato dalla mastectomia semplice bilaterale, dalla mastectomia skin-sparing e dalla mastectomia nipple sparing a seconda dei casi. Il cut-off per scegliere se optare per una chirurgia conservativa o radicale è la dimensione del tumore e l'interessamento linfonodale: per neoplasie < di 2 cm e biologia indolente viene proposta la chirurgia conservativa, per le donne con neoplasia > di 2 cm, localizzazione ascellare importante e/o biologia aggressiva (carcinomi tripli negativi e HER2+) è indicato un trattamento neoadiuvante (prima della chirurgia) e in seguito un intervento radicale o conservativo a seconda dei casi.<sup>20</sup> Alla chirurgia sulla mammella deve essere associata l'analisi dei linfonodi locoregionali tramite biopsia o escissione del linfonodo sentinella. La dissezione ascellare, ovvero, l'eliminazione di almeno 10 linfonodi ascellari è consigliata negli stadi più avanzati di malattia (T4, marcata localizzazione al linfonodo sentinella e in presenza di linfonodi ascellari clinicamente e patologicamente confermati) e nel caso

di carcinoma infiammatorio.<sup>21</sup> Un ruolo importante nella gestione clinica delle pazienti oncologiche è svolto dal Disease Multidisciplinary Team o Disease Management Team (DMT). Specialisti di diversi settori (oncologi, radiologi, radioterapisti e chirurghi) si incontrano settimanalmente per scegliere le alternative terapeutiche migliori delle pazienti in esame.<sup>22</sup>

### 3.2 Trattamento neoadiuvante

La terapia neoadiuvante ci permette di osservare la sensibilità di una neoplasia ad un determinato trattamento sistemico, la sua somministrazione deve essere valutata sulla previsione di beneficio e sul rischio di recidiva della neoplasia oltre che all'età della paziente e alle sue possibili comorbidità. Inoltre, il trattamento neoadiuvante serve perché in alcuni casi migliora la prognosi delle pazienti affette da tumore della mammella.<sup>23</sup> La risposta completa è considerato un importante fattore prognostico nei tumori HER2 positivi e nelle pazienti affette da TNBC e si definisce come una totale assenza di malattia residua a livello della mammella ed a livello linfonodale in seguito a trattamento neoadiuvante.<sup>23</sup>

### 3.3 Trattamento Adiuvante

Il trattamento adiuvante è la terapia sistemica che viene iniziata dopo il trattamento chirurgico e il suo ruolo è ampiamente consolidato nel ridurre il rischio di recidiva e della mortalità, dovrebbe essere iniziato dalle 3-6 settimane dopo la chirurgia.<sup>20</sup> Le principali terapie utilizzate come adiuvanti sono:

- Polichemioterapia
- Terapia endocrina
- Terapia con farmaci biologici
- Immunoterapia
- Radioterapia

Per decidere quale terapia adiuvante utilizzare bisogna valutare: fattori prognostici e predittivi di risposta a specifici trattamenti, quali lo stato dei recettori ormonali e la sovraespressione di HER2, i benefici attesi dal trattamento, il recurrence score (Oncotype DX), comorbidità, effetti collaterali e preferenze della paziente.<sup>24</sup> In particolare, il test Oncotype DX è un test genomico indicato nelle donne con nuova diagnosi di cancro al seno in stadio precoce (I, II e IIIa), con recettori ormonali

positivi, HER2 negativo e presenza di metastasi linfonodali in massimo 3 linfonodi. Il test analizza 21 geni accuratamente selezionati su un campione di tessuto neoplastico; questa valutazione permette di stabilire la probabilità di recidiva della malattia e la risposta alla chemioterapia. Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza del test Oncotype DX soprattutto per capire quali pazienti avranno beneficio o meno dall'inizio di un trattamento chemioterapico.<sup>25</sup> Oncotype DX è l'unico test genomico che è stato validato attraverso studi prospettici randomizzati (TAILORx e RxPonder) e che ha, quindi, una maggior evidenza scientifica per il suo utilizzo in pratica clinica<sup>26</sup>, tuttavia, esistono altri test genomici oltre a Oncotype DX:

- MammaPrint: analizza un gruppo di 70 geni critici e indica una stima del rischio di metastatizzazione;
- Prosigna (PAM50): valuta l'espressione di un gruppo di 50 geni implicati nella progressione del tumore alla mammella;
- Breast Cancer Index: analizza 7 geni, tra cui 5 coinvolti nel ciclo cellulare, per valutare il rischio di recidiva e/o non risposta alle terapie ormonali;
- Endopredict: analizza 12 geni (8 target e 4 di controllo) per valutare il rischio di recidiva.<sup>1</sup>

#### 4. PREDICT Breast Cancer

Una valutazione prognostica accurata è essenziale per la scelta della miglior terapia adiuvante, online esistono diversi tools predittivi che possono essere utilizzati al fine di scegliere il miglior trattamento possibile. PREDICT Breast Cancer è uno strumento prognostico online, disponibile dal 2010, in grado di calcolare come i diversi trattamenti possano impattare sul tasso di sopravvivenza dopo la chirurgia e fornisce un aiuto sia alle pazienti che ai loro medici nella miglior scelta terapeutica basata sulle caratteristiche della paziente.<sup>27,28</sup> La prima versione di questo strumento è stata creata sulle informazioni cliniche di 5.694 donne diagnosticate e già trattate con la chirurgia in Inghilterra dal 1999 al 2003, contenute nel Eastern Cancer Registration and Information Centre (ECRIC). Le donne sono state poi seguite fino al 31/12/2007, con un follow up medio di 5.6 anni fino a un massimo di 8 anni.<sup>29</sup>

Le informazioni ottenute dal registro ECRIC e inclusi nella prima versione di PREDICT Breast Cancer (PREDICT v1.0) includevano:

- Età alla diagnosi;

- Numero di linfonodi in cui era stata fatta biopsia e numero di linfonodi con localizzazione di malattia;
- Dimensione della neoplasia: categorizzata inizialmente < 10 mm, tra i 10 e i 19 mm, tra i 20 e i 29 mm, tra i 30 e i 49 mm e > di 50 mm.
- Grado istologico: I, II, III;
- Stato dei recettori estrogenici: positivi o negativi;
- Modalità di rilevazione del cancro: tramite screening o sintomatico;
- Informazioni sulla terapia locale già eseguita: escissione larga locale, mastectomia, radioterapia;
- Tipo di terapia adiuvante sistemica: chemioterapia, endocrino terapia o entrambe.

Il tipo di chemioterapia utilizzata non era conosciuto ma tutte le donne nel registro ECRIC avevano utilizzato farmaci di prima o seconda generazione.<sup>29</sup> Nell'ottobre 2011 venne sviluppato una estensione del modello (PREDICT v1.1) per includere lo stato di HER2/ERRB2. Le stime sull'effetto prognostico dello stato di HER2 si basano su un'analisi di 10.179 casi raccolti dal Breast Cancer Association Consortium (BCAC) ed ha evidenziato come l'inclusione di HER2 nel modello migliori le stime della mortalità cancro relata, soprattutto nelle pazienti HER2 positive.<sup>27</sup> Nella versione 1.2 di PREDICT Breast Cancer è stato aggiunto lo stato di KI-67. L'effetto prognostico di KI-67 venne ottenuto da dati che mostravano come tumori con recettori estrogenici positivi che esprimevano KI-67, erano associati a una sopravvivenza inferiore del 30%. L'aggiunta dello stato di KI-67 al PREDICT ha portato a un miglioramento statisticamente significativo delle prestazioni di questo modello per le pazienti ER positive.<sup>30</sup> Negli anni il modello PREDICT è stato riadattato (PREDICT v2.0) poiché aveva dimostrato di sottostimare la mortalità nelle donne con diagnosi al di sotto dei 40 anni, in particolare in quelle pazienti con malattia ER positiva.<sup>31</sup> In questa versione vennero modificati anche i valori selezionabili per le categorie "dimensione del tumore" e "stato dei linfonodi" che comportavano variazioni "a gradino" nelle stime di rischio quando si passava da una categoria all'altra. Donne con dimensioni differenti di neoplasia ma con le altre caratteristiche uguali avevano la stessa mortalità. Per tenere conto dell'età alla diagnosi e per appianare la funzione di sopravvivenza per le dimensioni del tumore e lo stato dei linfonodi, PREDICT è stato riadattato estendendo la data di follow up fino al 31 dicembre 2012, sempre usando i dati della coorte originale, comprendendo in questa maniera 3,787 donne con follow up a 10 anni.<sup>31</sup>

Questa versione di PREDICT tendeva a sovrastimare il numero di decessi per cancro mammario del 10% (447 osservati su 492 previsti), in maniera ancora più evidente per le lesioni di grandi dimensioni e di grado più alto. Nella versione PREDICT v2.1 è stata aggiunta la possibilità di selezionare lo stato di menopausa, sono stati aggiunti i bifosfonati come opzione terapeutica ed è stata aggiunta l'opzione di calcolare la percentuale di sopravvivenza a 15 anni. La riduzione proporzionale del tasso di mortalità con l'aggiunta dei bifosfonati è stata tratta dall' Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.<sup>27</sup> Nell'ultima versione di PREDICT ovvero la versione 2.2, è stata aggiunta la valutazione dell'estensione della terapia ormonale. Le prove sull'effetto della terapia provengono dagli studi ATLAS e ATTom, nel primo studio oltre 12.000 pazienti sono state randomizzate a seguire 5 o 10 anni di tamoxifene, nel secondo studio 6.900 donne sono state randomizzate a interrompere il tamoxifene o continuare fino al decimo anno. Una metanalisi ponderata sulla varianza inversa dei due studi fornisce una riduzione del rischio relativo di 0,26 (95% C.I. 0.12-0.37).<sup>32-34</sup> Gli sviluppatori di PREDICT hanno ipotizzato che il beneficio relativo di un'ulteriore terapia ormonale di 5 anni sia lo stesso in tutti i sottogruppi, basandosi anche sullo studio ATLAS.

#### 4.1 Validazioni di PREDICT Breast Cancer

Per comprendere se la coorte utilizzata per la creazione di PREDICT fosse rappresentativa, il modello online è stato testato su diverse popolazioni di pazienti con carcinoma mammario. Inizialmente il tool è stato testato su donne giovani, con età < 50 anni, provenienti da una coorte di pazienti Olandesi trattate tra il 1990 e il 2000.<sup>35</sup> Secondo questo studio, PREDICT sottostima la mortalità attribuita a "tutte le cause" fino al 6,6%, nelle pazienti < di 40 anni. In particolare, il tool sottostima la mortalità per le pazienti giovani con buona prognosi mentre la sovrastima nelle donne con caratteristiche prognostiche sfavorevoli. PREDICT tende a sovrastimare anche la mortalità specifica per il cancro alla mammella indiscriminatamente nei diversi sottogruppi.<sup>35</sup> Tuttavia, la popolazione in studio non è rappresentativa di alcuni sottogruppi tumorali, in particolare, delle neoplasie ER positive, influenzando la generalizzabilità dei risultati.<sup>35</sup> Analogamente, l'accuratezza di PREDICT è stata testata nelle pazienti anziane, età > di 65 anni, su una larga coorte Turca formata da pazienti con carcinoma mammario positivo ai recettori ormonali, HER2 negativo, in stadio precoce (pT1-T2, pN0-N1mic, M0) e che fossero state sottoposte ad Oncotype

DX. Questo studio ha rivelato che PREDICT tende a sovrastimare la sopravvivenza nelle pazienti a basso rischio e a sottostimarla nelle pazienti ad alto rischio.<sup>36</sup> In un altro studio, basato sui dati della coorte FOCUS (Female Breast Cancer in the Elderly), che include tutte le pazienti con tumore al seno di età pari o superiore a 65 anni nei Paesi Bassi, tra il 1997 e il 2004, è stato dimostrato che PREDICT può accuratamente predire la sopravvivenza a 5 anni in questo sottogruppo di pazienti, tuttavia, sovrastima la sopravvivenza a 10 anni e non predice accuratamente la sopravvivenza per le pazienti > 85 anni sia a 5 che 10 anni.<sup>37</sup> Nel 2023, PREDICT 2.2 è stato testato su pazienti portatrici di mutazione BRCA1/2 con tumore ER negativo, provenienti dal “Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2” (CIMBA) e dal “Breast Cancer Association Consortium” (BCAC) dimostrando che il modello tende a sovrastimare la mortalità in questo tipo di pazienti sia a 5 che a 10 anni, in ogni caso, la differenza tra le morti stimate e osservate sembra migliorare nell’analisi a 15 anni di follow up.<sup>38</sup> Tuttavia, si è dimostrato che nonostante il modello PREDICT sia in grado di stimare la sopravvivenza media nelle pazienti con tumore ER positivo e portatrici di BRCA1/2 con buona accuratezza, PREDICT tende a non discriminare in maniera affidabile i gruppi a basso ed alto rischio. In particolare, è stata valutato come l’impatto prognostico del grado tumorale sia la causa principale del perché l’OS attesa sia significativamente diversa da quella predetta dal modello PREDICT.<sup>38</sup> Infine, è stata valutata l’affidabilità di PREDICT nelle donne con tumore al seno precoce, HER2 positivo, trattate attualmente con chemioterapia e terapie target anti-HER2. I dati sono stati estratti dallo studio ALLTO, un trial clinico di fase III che ha valutato il trattamento adiuvante combinato di lapatinib e trastuzumab contro trastuzumab in monoterapia. Lo studio ha arruolato 2794 pazienti e dopo un follow up medio di 6 anni, PREDICT ha sottostimato fortemente l’OS delle pazienti in tutti i sottogruppi, con le maggiori differenze assolute per le pazienti con malattia HR-, coinvolgimento linfonodale (1-3 linfonodi positivi) e tumore di grandi dimensioni, Questo, ha sollevato diversi interrogativi sull’affidabilità di PREDICT nel fornire stime prognostiche precise nelle donne con carcinoma mammario HER2 positivi.<sup>39</sup> PREDICT è stato testato in una popolazione asiatica di 1213 pazienti provenienti dalla banca dati sul cancro al seno del Kyushu University Hospital a Fukoka. Sono state selezionate tutte le pazienti a cui era stato diagnosticato un cancro al seno unilaterale, non metastatico e non invasivo, che erano state sottoposte a un intervento chirurgico (mastectomia o chirurgia conservativa) tra il 2001 e il 2013. Sono state escluse dallo studio pazienti

con età <di 25 anni e > di 80 perché PREDICT permette l'inserimento solo di età comprese in questo intervallo. Questo studio dimostra che PREDICT v2.2 è in grado di valutare accuratamente la OS a 5 e 10 anni dell'intera popolazione in esame e nei diversi sottogruppi, tranne che per il sottogruppo di pazienti con età  $\geq$  di 65 anni, in cui la sopravvivenza è stata sottostimata del 6,7%.<sup>40</sup> Analogamente, PREDICT è stato testato in Olanda, su una popolazione di 2264 donne con età < di 40 anni, diagnosticate tra il 1989 e il 2000 con carcinoma invasivo senza metastasi linfonodali e seguite in follow up fino a 10 anni. Questo studio ha dimostrato che il modello online ha sottostimato la mortalità a 10 anni per cause non legate al tumore al seno, in tutte le donne dello studio, in particolare nelle donne con tumore ER positivo.<sup>41</sup>

## 5. Razionale dello studio

Lo strumento prognostico PREDICT fornisce un aiuto importante ai medici nella scelta del possibile trattamento per il carcinoma mammario, tuttavia, è necessario verificare che i risultati ottenuti dalla popolazione di partenza siano generalizzabili anche alle altre popolazioni. In questo studio abbiamo deciso di testare l'accuratezza di PREDICT su una coorte di pazienti italiani proveniente da trial clinici randomizzati: MIG1, MIG5, GIM2, GIM3 e GIM6, e verificare che la coorte su cui è stato creato il PREDICT sia rappresentativa anche della popolazione italiana.

## 6. Obiettivi dello Studio

L'obiettivo primario di questo studio è valutare l'accuratezza prognostica del modello PREDICT v.2.2 a 5 ed a 10 anni in pazienti con carcinoma mammario in stadio precoce sottoposte a chemioterapia in una coorte italiana di pazienti provenienti da cinque diversi trial clinici randomizzati. Gli obiettivi secondari includono la valutazione delle prestazioni prognostiche del modello nei vari sottotipi di carcinoma mammario (Luminale A/B, HER2-positivo e triplo negativo), categorie di indice di massa corporea (sottopeso, normopeso, sovrappeso, obeso) e gruppi di età ( $\leq$ 40 anni, 41–64 anni, e  $\geq$ 65 anni).

## 7. Materiali e Metodi

### 7.1 Popolazione in studio

I dati utilizzati in questo studio sono stati ottenuti dalle pazienti arruolate in cinque trial clinici randomizzati, MIG1, MIG5, GIM2 GIM3 e GIM6, dal 1992 al 2012. MIG1 è uno studio italiano di fase III randomizzato e multicentrico in cui sono state arruolate, tra il 1992 e il 1997, 1214 pazienti con carcinoma mammario, metastasi linfonodali o con linfonodi negativi ma ad alto rischio di metastatizzazione. Queste pazienti sono state randomizzate a ricevere sei cicli di terapia adiuvante con FEC (fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide) somministrati ogni tre o due settimane (dose-dense), dimostrando che la somministrazione in regime dose-dense sia più efficace nelle donne con cancro alla mammella precoce ad alto rischio, soprattutto a lungo termine.<sup>42</sup> MIG5 è uno studio di fase III, randomizzato e multicentrico in cui sono state arruolate 1055 pazienti con carcinoma mammario precoce e linfonodi positivi. Queste pazienti sono state randomizzate, tra il 1996 e il 2001, a ricevere sei cicli di FEC oppure quattro cicli di EP (epirubicina e paclitaxel). Lo studio non ha dimostrato una superiorità del trattamento con EP rispetto a FEC, inoltre le pazienti in terapia con FEC hanno avuto maggiori effetti collaterali quali, nausea, vomito e leucopenia.<sup>43</sup> GIM2 è uno studio randomizzato di fase III in cui sono state arruolate pazienti con cancro mammario precoce di età compresa tra i 18 e i 70 anni, con tumore operabile e linfonodi metastatici. Tra il 2003 e il 2006, 2091 pazienti sono state randomizzate all'interno di uno dei seguenti bracci di studio: quattro cicli di EC (epirubicina e ciclofosfamide) intravenosi a intervallo standard (ogni tre settimane), seguiti da quattro cicli di paclitaxel ogni tre settimane (gruppo q3EC-P); quattro cicli di FEC intravenosi ogni tre settimane, seguiti da quattro cicli di paclitaxel intravenosi ogni tre settimane (gruppo q3FEC-P); stessi farmaci e dosi del gruppo q3EC-P ma in regime dose-dense, ovvero ogni due settimane (gruppo q2EC-P); stessi farmaci e dosi del gruppo q3FEC-P ma in regime dose-dense, ogni due settimane (gruppo q2FEC-P). Dopo un follow up mediano di 15 anni lo studio ha dimostrato che: il tempo medio libero da malattia non era differente tra i gruppi FEC-P e EC-P ma il tempo medio libero da malattia era significativamente più alto nei gruppi in regime dose-dense piuttosto che nei gruppi in regime standard. Gli effetti collaterali più severi sono avvenuti nei gruppi che usavano il farmaco fluorouracile, di conseguenza lo studio dimostra che un regime chemioterapico adiuvante ottimale dovrebbe essere in regime dose-dense e non includere fluorouracile.<sup>44</sup> GIM3 è uno studio di fase III, in aperto, randomizzato e

multicentrico su sei diversi trattamenti adiuvanti nelle donne in post menopausa con carcinoma mammario precoce con HR-positivi. Tra il 2007 e il 2012, sono state randomizzate 3697 pazienti in egual misura a anastrozolo per via orale, exemestane per via orale, compresse di letrozolo in prima linea per 5 anni (strategia di prima linea), o tamoxifene per via orale per 2 anni seguito da uno dei tre inibitori di aromatasi per 3 anni (strategia switch). Dopo un follow up medio di 60 mesi, lo studio ha dimostrato che 5 anni di trattamento con inibitori di aromatasi non erano superiori a 2 anni di trattamento con tamoxifene seguiti da 3 anni di inibitori di aromatasi, nessuno dei tre inibitori di aromatasi era superiore agli altri in termini di efficacia. Quindi, le preferenze della paziente, la tollerabilità e i vincoli economici dovrebbero essere considerati nella decisione del trattamento.<sup>45</sup> GIM6 è uno studio di fase III, randomizzato, in cui tra il 2003 e il 2008 sono state arruolate 281 pazienti in premenopausa, di età compresa tra i 18 e i 45 anni con carcinoma mammario precoce HR-positivo, di stadio compreso tra I e III. Queste donne sono state randomizzate a ricevere la sola chemioterapia o chemioterapia combinata con triptorelina, ovvero, un farmaco agonista dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRHa). Questo studio ha dimostrato la sicurezza nell'utilizzo di GnRHa insieme alla chemioterapia per preservare la funzione ovarica nelle donne con tumore alla mammella HR-positivo in premenopausa.<sup>46</sup>

Sono state incluse nel presente studio, donne con carcinoma mammario invasivo unilaterale diagnosticato tra il 1992 e il 2012 che avessero minimo cinque anni di follow up. I criteri di esclusione dallo studio presente hanno incluso pazienti con carcinoma mammario al IV stadio, pazienti che non hanno subito una chirurgia definitiva, pazienti che hanno ricevuto terapia neo-adiuvante precedentemente alla chirurgia (sia terapia endocrina che chemioterapia), pazienti di sesso maschile e quelle pazienti di cui mancavano i dati essenziali richiesti dal modello online PREDICT o di cui mancavano i dati di follow up.

## 7.2 Estrazione dei Dati

La valutazione dello score PREDICT per ogni paziente è stata calcolata da un ricercatore in cieco rispetto agli esiti dei pazienti. Le caratteristiche dei pazienti e dei tumori, così come i trattamenti anticancro adiuvanti somministrati, sono stati inseriti nel programma PREDICT v.2.2 per calcolare l'OS a 5 e 10 anni. È stato utilizzato il

database più aggiornato dei trial MIG1, MIG5, GIM2, GIM3, GIM6, che corrisponde a un follow-up di almeno 5 anni per ogni paziente.

### 7.3 Analisi Statistica

Questa analisi è da considerarsi esplorativa, poiché non era prevista nel protocollo dello studio e la potenza statistica non era predefinita. L'utilità prognostica del modello PREDICT è stata valutata tramite i seguenti endpoint: (i) calibrazione, che rappresenta l'allineamento tra tassi di sopravvivenza previsti e osservati, e (ii) accuratezza, definita come la capacità del modello di distinguere tra individui che sopravvivono 5 o 10 anni e quelli che non sopravvivono. Per ogni paziente, il tempo di osservazione è stato definito dalla data di diagnosi fino all'evento. Gli eventi di OS sono stati considerati i decessi per qualsiasi causa. Per la calibrazione, le probabilità mediane di sopravvivenza a 5 e 10 anni stimate dal PREDICT sono state confrontate con i tassi di sopravvivenza a 5 e 10 anni osservati dalle curve di Kaplan-Meier. A causa dell'asimmetria nella distribuzione, la mediana è stata utilizzata come indicatore della tendenza centrale. L'accuratezza è stata valutata tramite l'area sotto la curva ROC (AUC) per l'OS a 5 e 10 anni, riflettendo la probabilità che un paziente con sopravvivenza a 5 o 10 anni abbia una previsione più alta di un paziente deceduto. Le analisi per sottogruppi hanno valutato la performance prognostica di PREDICT in base a tipo di trattamento anti-HER2, regime chemioterapico, età alla diagnosi, stato dei recettori ormonali, coinvolgimento nodale patologico e dimensione del tumore.

## 8. Risultati dello studio

### 8.1 Discrimination

Per l'intera coorte, l'area sotto la curva ROC (AUC) era del 73,7% (IC al 95%: 69,7–77,8) (*Figura 4*), indicando una capacità discriminatoria subottimale. Questa prestazione subottimale è stata osservata in tutti i sottogruppi, con AUC che variava dal 61,7% nei pazienti con  $\geq 4$  linfonodi positivi al 77,7% nei pazienti trattati esclusivamente con trastuzumab come terapia anti-HER2 (vedi Tabella 3). La precisione discriminatoria più bassa è stata osservata nei pazienti con elevato coinvolgimento linfonodale ( $\geq 4$  e 1-3 linfonodi positivi) (vedi Figg. Supplementari 1 e 2) e in coloro che ricevevano chemioterapia non basata su antracicline (AUC rispettivamente di 61,7%, 64,8% e 65,2%). Al contrario, la maggiore precisione

discriminatoria è stata riscontrata nei pazienti senza coinvolgimento linfonodale (Fig. Supplementare 3) e in quelli trattati esclusivamente con trastuzumab (AUC rispettivamente di 77,3% e 77,7%).

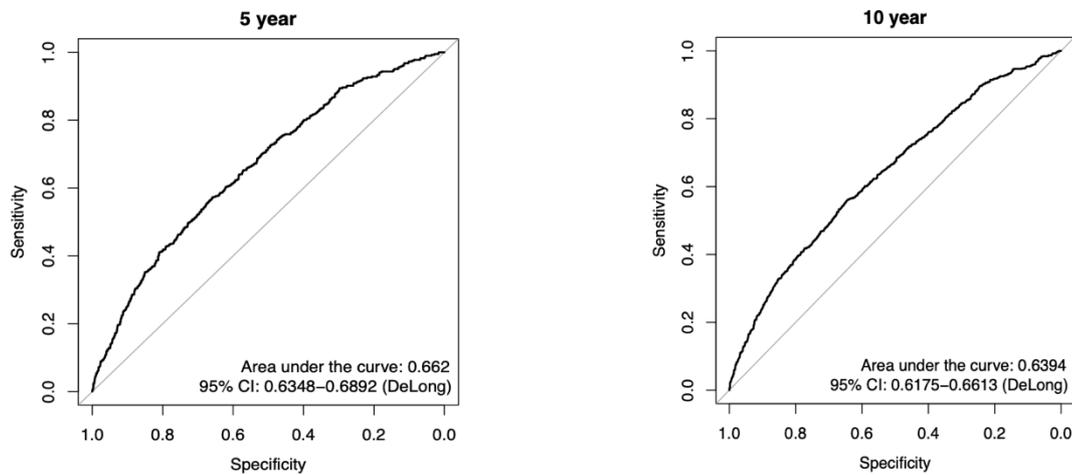


Figura 4. Accuratezza discriminatoria di PREDICT rappresentata dall'area sotto la curva ROC (Receiver-Operator Characteristic) al punto temporale di 5 e 10 anni nella popolazione complessiva.

ROC: curva caratteristica operativa del ricevitore, AUC: area sotto la curva.

## 8.2 Calibrazione

I tassi di OS a 5 anni previsti ed osservati erano rispettivamente dell'87,1% e del 92,2%, con un errore standard di 0,0044 e una differenza del 5,1% (Intervallo di Confidenza [IC] al 95%: 3,9–6,4), indicando una sottostima dell'OS da parte del modello PREDICT (Figura 6). Allo stesso modo, i tassi di OS a 10 anni previsti ed osservati erano rispettivamente del 72,3% e del 74,4%, con un errore standard di 0,0044 e una differenza del 2,1% (IC al 95%: 0,3–0,4), suggerendo una sottostima persistente (Figura 7). Questa sottostima si è riscontrata in tutti i sottogruppi, con performance peggiori per i pazienti con carcinoma ER-negativo, tumori di grandi dimensioni, età < 40aa, obesità ed HER2-positivo. Le figure 6 e 7 confrontano i decessi previsti e osservati nel periodo di follow-up, suddivisi per gruppo di età, BMI e sottotipo tumorale. Le peggiori performance predittive sono state osservate nelle donne diagnosticate con tumore prima dei 41 anni, in quelle con obesità (BMI > 30) e in quelle con tumori HER2-positivi.

In questo studio sono state incluse un totale di 6205 pazienti affette da tumore della mammella in fase precoce arruolate tra il 1992 ed il 2012 all'interno di cinque studi clinici randomizzati (Figura 5, Tabella 1). Di queste pazienti, il 15,17% (n=941)

deriva dallo studio MIG1, il 14.21% (n=882) è stato arruolato nello studio MIG5, il 26.16% (n=1623) proviene dallo studio GIM2, il 41.48% (n=2574) dallo studio GIM3 e infine il 2.98% (n=185) dallo studio GIM6. L'età media alla diagnosi di tumore alla mammella è di 57 anni (IQR (range interquantile) 48-65), considerando che il 65.17% (n=4044) delle pazienti inserite nello studio ha una età compresa tra 41-65 anni, mentre, il 25.30% (n=1570) ha un'età >65 anni e il 9.52% (n=591) ha un'età < di 40 anni. Circa l'80% (n=4982) delle donne arruolate presentano un carcinoma mammario di tipo duttale, che è il tipo istologico più diffuso nella popolazione, mentre, l'11.91% (n=739) un carcinoma di tipo lobulare, il 7% (n=439) presenta altri tipi istologici di carcinoma mammario e di circa 45 pazienti non è presente il tipo istologico. Le pazienti sono state poi valutate per sottotipo molecolare, osservando che la maggior parte delle donne, il 60.32% (n=3743) presenta un carcinoma mammario di tipo Luminale A/B, il 21.35% (n=1325) presenta un tumore con recettori ormonali positivi (HR+) e stato di HER2 non conosciuto, mentre, il 3.2% (n=200) delle pazienti ha un tumore triplo negativo (TNBC), che non presenta, quindi, né recettori ormonali né HER2. La maggior parte delle pazienti arruolate presenta un tumore in stadio T1, con una dimensione media di 18 mm (IQR 13-25 mm). Il 60.05% (n=3726) delle pazienti presenta un tumore in stadio T1, che comprende tumori di dimensione massima fino a 2 cm, il 35.15% (n=2181) delle pazienti ha un cancro in stadio T2, quindi, di dimensione massima compresa tra 2.1 e 5 cm, e infine il 4.14% (n=257) delle donne presenta un carcinoma in stadio T3/4, di cui, lo stadio T3 comprende carcinomi di dimensioni superiori a 5 cm, mentre, T4 comprende tumori di qualsiasi dimensione ma con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute (ulcerazione e noduli cutanei).

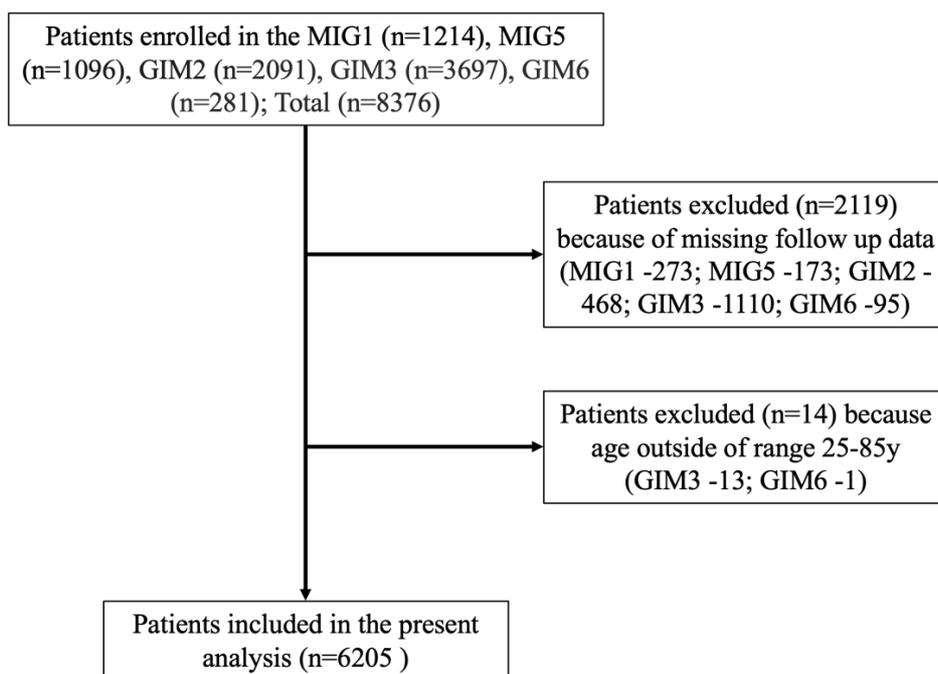


Figura 5. STROBE flow-chart. Rappresentazione dell'inclusione dei pazienti in studio

La maggior parte delle pazienti arruolate in questo studio sono considerate normopeso secondo la classificazione che si basa sul BMI, in particolare, il 40.69% (n=2525) delle pazienti presenta un BMI normale, compreso tra 18,5-24. Il 29.43% (n=1826) è considerato sovrappeso, con BMI compreso tra 25-29.9, mentre, il 18.2% (n=1131) ha un BMI obeso (>30) e solo l'1.5% (n=93) ha un BMI < 18.5, considerato sottopeso. Le pazienti arruolate in questo studio hanno subito per il 68.33% (n=4240) interventi di nodulectomia, mentre il 32.46% (n=1953) interventi di mastectomia, in seguito, si sono sottoposte a diversi trattamenti sia di tipo endocrino che chemioterapico. La chemioterapia utilizzata nella maggior parte dei casi, nel 42.84% (n=2658), è a base di antracicline e taxani, mentre, la chemioterapia a base di antracicline è stata somministrata nel 28.22% dei casi e quella a base di taxani nell'1.9% delle pazienti. Il 27.04% delle pazienti non si è sottoposta a chemioterapia. Nelle donne che presentavano carcinomi HR+ sono state utilizzate diverse terapie ormonali: il 31.91% (n=1980) ha utilizzato solo tamoxifene per via orale, nel 27.27% (n=1692) delle donne sono stati somministrati inibitori dell'aromatasi, invece, il 27.01% (n=1676) ha utilizzato prima tamoxifene e in seguito uno dei tre inibitori dell'aromatasi disponibili. Nel 13.81% (n=857) dei casi non è stata somministrata nessuna terapia ormonale. Infine, il 71.10% (n=4412) delle pazienti in studio sono in un'età post-menopausale, che in genere si verifica tra i 45 e i 55 anni, in cui avviene una drastica riduzione della produzione di estrogeni, mentre, il 28.65% (n=1778) sono in età pre-menopausale.

Dopo un follow up medio di 9,3 anni (IQR 5,9-14,8) sono state osservate 1083 morti. Su questi dati si è basata la validazione del tool prognostico PREDICT, così da poter osservare la sua performance nel valutare la OS delle pazienti in studio.

N total	n	%	N total	n	%	N total	n	%	N total	n	%
<b>Trial</b>	6205	100	<b>BMI</b>	6205	100	<b>Tumor</b>	6205	100	<b>Nodal Status</b>	6205	100
MIG1	941	15,2	Underweight (<18,5)	93	1,5	Luminal	3743	60,3	pN0	2226	35,8
MIG5	882	14,2	MIG1	13	1,3	MIG1	141	15,0	pN1	2564	41,3
GIM2	1623	26,2	MIG5	19	2,1	MIG5	0	0,0	pN2	1060	17,1
MIG3	2574	41,5	GIM2	24	1,4	GIM2	59	3,6	pN3	353	5,7
GIM6	185	3,0	GIM3	21	0,8	GIM3	0	0,0	Missing	2	0,0
			GIM6	16	8,6	GIM6	0	0,0			
<b>Età</b>			Normal (18,5-24,9)	2525	40,6	HER2 +	647	10,4	<b>Menopausal Status</b>		
≤40	591	9,5	MIG1	524	55,7	MIG1	83	8,8	Premenopausal	1778	28,6
MIG1	117	12,4	MIG5	446	50,6	MIG5	0	0,0	Postmenopausal	4412	71,1
MIG5	95	10,8	GIM2	736	45,3	GIM2	350	21,6	Missing	15	0,2
GIM2	247	15,2	GIM3	691	26,8	GIM3	214	8,3			
GIM3	2	0,1	GIM6	128	69,2	GIM6	0	0,0	<b>Endocrine</b>		
GIM6	130	70,3	Overweight (25-29,9)	1826	29,4	TNBC	200	3,2	None	857	13,8
41-65	4044	65,2	MIG1	287	30,5	MIG1	374	39,7	Tam only	1980	31,9
MIG1	741	78,7	MIG5	256	29,0	MIG5	0	0,0	AI	1692	27,3
MIG5	663	75,2	GIM2	519	32,0	GIM2	1029	63,4	Tam --> AI	1676	27,0
GIM2	1213	74,7	GIM3	738	28,7	GIM3	2340	90,9	Missing	0	0,0
GIM3	1372	55,3	GIM6	26	14,1	GIM6	0	0,0			
GIM6	55	29,7	Obese (≥30)	1131	18,2	HR + / HER2	1325	21,3	<b>Surgery</b>		
≥65	1570	25,3	MIG1	111	11,8	MIG1	220	23,4	Lumpectomy	4240	68,3
MIG1	83	8,8	MIG5	142	16,1	MIG5	122	13,8	Mastectomy	1953	32,5
MIG5	124	14,1	GIM2	308	19,0	GIM2	6	0,4	Missing	13	0,2
GIM2	163	10,0	GIM3	558	21,7	GIM3	0	0,0			
GIM3	1200	46,6	GIM6	12	6,5	GIM6	39	21,1	<b>(Neo)Adjuvant CT</b>		
GIM6	0	0,0	Missing	630	10,1	Missing	290	4,7	Antra-based	1751	28,2
									Antra + Tax	2658	42,8
<b>Istologia</b>			<b>Tumor Size (T)</b>			<b>Grading</b>			Tax-based	118	1,9
Ductal	4982	81,0	pT1	3726	60,0	G1	639	10,3	Other	0	0,0
Lobular	739	11,9	pT2	2181	35,1	G2	3478	56,0	No chemo	1678	27,0
Other	439	7,1	pT3/4	257	4,1	G3	2088	33,6			
Missing	45	0,7	Missing	41	0,7	Missing	0	0,0			

Tabella 1. Caratteristiche pazienti in studio.

PREDICT ha assegnato una classe di rischio più alta alle pazienti che hanno avuto eventi precoci nel 62% dei casi (C-index 0,62, 95%, CI: 58-65). Complessivamente, la sopravvivenza a 5 anni è stata sottostimata del 5,1% (95%, CI: 3,9-6,4); la OS a 5 anni osservata era del 92,2% contro la OS predetta dallo score PREDICT di 87,1%. La sopravvivenza a 10 anni, invece, è stata sottostimata del 2,1% (95%, CI: 0,3-0,4); la OS osservata era del 74,4%, rispetto a quella predetta del 72,3%. La sottostima della sopravvivenza è stata consistente in tutti i sottogruppi, con una performance predittiva peggiore per quelle pazienti con carcinoma negativo per il recettore degli estrogeni, con una grande dimensione tumorale, nelle donne giovani, nelle pazienti obese o con malattia con recettore HER2 positivo.

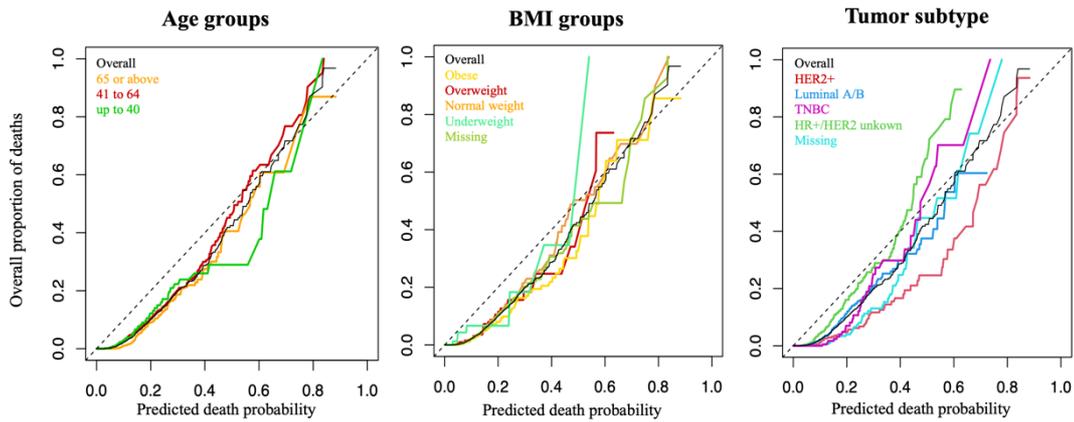


Figura 6. Comparazione morti predette e osservate a 5 anni in base ai diversi sottogruppi di pazienti

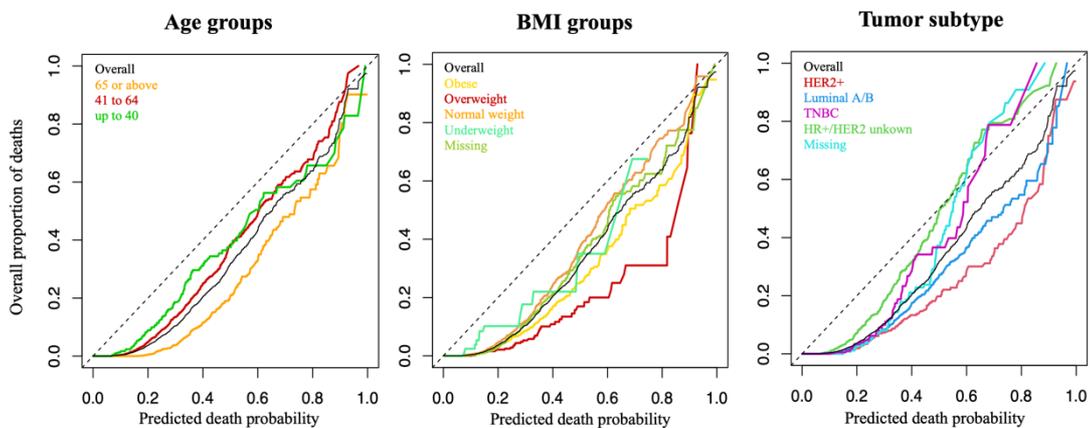


Figura 7. Comparazione morti predette e osservate a 10 anni in base ai diversi sottogruppi di pazienti

Nelle *Figure 6 e 7* sono mostrate le comparazioni tra le morti predette dal modello online PREDICT rispetto alle morti osservate durante il periodo di follow up, suddivise per gruppi: in base all'età, in base al BMI e in base al sottotipo tumorale. Nei grafici riportati è evidente come la performance peggiore di PREDICT sia stata rispettivamente, nel gruppo suddiviso per fasce di età, per le donne con diagnosi di carcinoma mammario prima di 41 anni, nel gruppo suddiviso in base alle fasce di peso corporeo, per le donne che soffrono di obesità (BMI>30) e, per il gruppo con suddivisione in base ai sottogruppi tumorali, per le donne con tumore HER2 positivo.

## 9. Conclusioni

PREDICT rappresenta, attualmente, l'unico strumento online gratuito e disponibile pubblicamente, sviluppato per stimare la prognosi nei pazienti affetti da carcinoma mammario precoce, basandosi su fattori clinico-patologici tradizionali e di facile accesso. Nella nostra analisi che ha incluso 5 trials italiani multicentrici randomizzati,

PREDICT ha sottostimato l'OS globale dei pazienti sia a 5 che a 10 anni; questo risultato è stato osservato in tutti i sottogruppi, con differenze assolute più marcate nelle pazienti giovani (< 40aa), nel gruppo suddiviso in base alle fasce di peso corporeo, per le donne che soffrono di obesità (BMI>30) e, per il gruppo con suddivisione in base ai sottogruppi tumorali, per le donne con tumore HER2 positivo. Le basse performance di questo strumento sollevano domande circa l'affidabilità di PREDICT nel fornire stime prognostiche per pazienti con carcinoma mammario in specifici gruppi di pazienti. Per spiegare la sottostima dell'OS, possiamo ipotizzare che la popolazione utilizzata per validare PREDICT non rifletta accuratamente la realtà di tutte le pazienti della pratica clinica. Nei trial di validazione sono state arruolate poche pazienti nelle fasce di età più estreme (giovani e vecchie), portando ad una minore affidabilità dell'outcome del tool in questi specifici sottogruppi di pazienti. Inoltre, lo stato HER2 è stato incorporato in PREDICT per la prima volta nell'ottobre 2011, basandosi sui dati del Breast Cancer Association Consortium (BCAC) su 10.179 casi non esposti a terapia anti-HER2. Successivamente, il modello aggiornato (PREDICT Plus) è stato validato su un dataset della British Columbia che includeva 203 pazienti con carcinoma mammario HER2-positivo, dimostrando una maggiore accuratezza nella stima della sopravvivenza rispetto ad altri strumenti prognostici come Adjuvant! Online. Negli anni recenti, i pazienti con carcinoma mammario precoce HER2-positivo hanno mostrato un miglioramento continuo della sopravvivenza, grazie a terapie locali e sistemiche sempre più efficaci. Tuttavia, questi cambiamenti potrebbero non essere riflessi in uno strumento prognostico sviluppato e validato oltre dieci anni fa. In particolare, nuovi farmaci come il pertuzumab e il T-DM1 sono disponibili per pazienti con progressione di malattia post-trattamento chirurgico, migliorando l'OS anche in ambito metastatico. Va considerato che parte della discordanza osservata tra OS prevista e OS osservata potrebbe essere attribuibile alle differenze tra la popolazione altamente selezionata di un trial clinico e quella reale, con una prognosi potenzialmente diversa. I trial clinici hanno un'elevata validità interna, ma potrebbero non rappresentare accuratamente la pratica reale, spesso più complessa. In linea con i nostri risultati, una validazione indipendente di PREDICT condotta su dati di pazienti reali ha mostrato una generale sovrastima della mortalità, anche se non specifica per malattia HER2-positiva. Anche il peso corporeo (valutato nel nostro caso con il Body Mass Index) deve essere preso in considerazione quando andiamo ad applicare il PREDICT alle pazienti nella pratica clinica. Dal nostro studio

evidenziamo come i pazienti classificate come obese (BMI > 30) avessero una prognosi migliore rispetto all'atteso. Questo lo possiamo spiegare perché verosimilmente negli anni è aumentata molto l'attenzione nei confronti di queste pazienti ed anche i programmi di supporto per correggere un'alimentazione scorretta oppure per incentivare ad uno stile di vita sano e regolare. Nei prossimi studi potrebbe essere utile andare a valutare la dinamicità del valore del BMI nel tempo in base all'esposizione al trattamento.

La previsione della prognosi è cruciale non solo nella malattia HR-positiva/HER2-negativa, dove può determinare l'uso della chemioterapia adiuvante, ma anche nella malattia HER2-positiva, influenzando la gestione della vita riproduttiva delle pazienti in premenopausa e le strategie terapeutiche (escalation o de-escalation). Il nostro studio presenta alcune limitazioni, tra cui il carattere esplorativo non pianificato. PREDICT non consente inoltre stime di efficacia della terapia anti-HER2 mirata e non considera comorbilità o performance status dei pazienti, limitando il confronto tra risultati osservati e predetti.

In conclusione, la nostra analisi ha mostrato che PREDICT sottostima la OS sia a 5 che a 10 anni. Nonostante ciò, PREDICT risulta, comunque, un ottimo alleato nella scelta del trattamento per le pazienti con carcinoma mammario. Gli oncologi devono essere consapevoli delle limitazioni del modello online nel fornire informazioni prognostiche nelle pazienti con carcinoma mammario in fase precoce, trattato con chemioterapia moderna e regimi endocrini. La scelta del miglior trattamento deve tenere conto anche delle possibili preferenze delle donne con tumore al seno in maniera tale da creare un trattamento il più possibile personalizzato sulle caratteristiche e preferenze delle pazienti.

## Bibliografia

1. Litton, J. K., Burstein, H. J. & Turner, N. C. Molecular Testing in Breast Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* e1–e7 (2019) doi:10.1200/EDBK\_237715.
2. AIOM. I NUMERI DEL CANCRO IN ITALIA 2023. *NUMERI CANCRO Ital.* 2023.

3. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets Ther.* **Volume 11**, 151–164 (2019).
4. Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. & Starosławska, E. Breast cancer risk factors. *Menopausal Rev.* **3**, 196–202 (2015).
5. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* **14**, 1009–1019 (2013).
6. Key, T. J. & Verkasalo, P. K. Endogenous hormones and the aetiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **1**, 18 (1999).
7. Admoun, C. & Mayrovitz, H. N. The Etiology of Breast Cancer. in *Breast Cancer* (eds. Department of Medical Education, Dr. Kiran C. Patel College of Allopathic Medicine, Nova Southeastern University, FL, USA & Mayrovitz, H. N.) 21–30 (Exon Publications, 2022). doi:10.36255/exon-publications-breast-cancer-etiology.
8. Mørch, L. S. *et al.* Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2228–2239 (2017).
9. Lee, A., Moon, B.-I. & Kim, T. H. *BRCA1/BRCA2* Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Ann. Lab. Med.* **40**, 114–121 (2020).
10. Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402 (2017).
11. Alexeeff, S. E. *et al.* Reproductive Factors and Mammographic Density: Associations Among 24,840 Women and Comparison of Studies Using Digitized Film-Screen Mammography and Full-Field Digital Mammography. *Am. J. Epidemiol.* **188**, 1144–1154 (2019).

12. Schwingshackl, L., Schwedhelm, C., Galbete, C. & Hoffmann, G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **9**, 1063 (2017).
13. Protani, M., Coory, M. & Martin, J. H. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 627–635 (2010).
14. Ronckers, C. M., Erdmann, C. A. & Land, C. E. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* **7**, 21 (2004).
15. Tan, P. H. *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology* **77**, 181–185 (2020).
16. 2020\_LG\_AIOM\_NeoplasieMammella.pdf.
17. Schnitt, S. J. & Collins, L. C. *Biopsy Interpretation of the Breast.* (Lippincott Williams & Wilkins, 2009).
18. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
19. Litière, S. *et al.* Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I–II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **13**, 412–419 (2012).
20. Cardoso, F. *et al.* Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **30**, 1194–1220 (2019).
21. 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.* **11**, 927–933 (2010).

22. Pillay, B. *et al.* The impact of multidisciplinary team meetings on patient assessment, management and outcomes in oncology settings: A systematic review of the literature. *Cancer Treat. Rev.* **42**, 56–72 (2016).
23. Korde, L. A. *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *J. Clin. Oncol.* **39**, 1485–1505 (2021).
24. Shien, T. & Iwata, H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **50**, 225–229 (2020).
25. Siow, Z. R., De Boer, R., Lindeman, G. & Mann, G. B. Spotlight on the utility of the Oncotype DX<sup>®</sup> breast cancer assay. *Int. J. Womens Health* **Volume 10**, 89–100 (2018).
26. Sparano, J. A. & Paik, S. Development of the 21-Gene Assay and Its Application in Clinical Practice and Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* **26**, 721–728 (2008).
27. Wishart, G. C. *et al.* PREDICT Plus: development and validation of a prognostic model for early breast cancer that includes HER2. *Br. J. Cancer* **107**, 800–807 (2012).
28. Wishart, G. C. *et al.* A population-based validation of the prognostic model PREDICT for early breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **37**, 411–417 (2011).
29. Wishart, G. C. *et al.* PREDICT: a new UK prognostic model that predicts survival following surgery for invasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R1 (2010).
30. Wishart, G. C. *et al.* Inclusion of KI67 significantly improves performance of the PREDICT prognostication and prediction model for early breast cancer. *BMC Cancer* **14**, 908 (2014).

31. Down, S. K., Lucas, O., Benson, J. R. & Wishart, G. C. Effect of PREDICT on chemotherapy/trastuzumab recommendations in HER2-positive patients with early-stage breast cancer. *Oncol. Lett.* **8**, 2757–2761 (2014).
32. Li, L. *et al.* Clinical outcomes comparison of 10 years versus 5 years of adjuvant endocrine therapy in patients with early breast cancer. *BMC Cancer* **18**, 977 (2018).
33. Bartlett, J. M. S. *et al.* Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the Adjuvant Tamoxifen—To Offer More? (aTTom) trial. *Ann. Oncol.* **30**, 1776–1783 (2019).
34. 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. *The Lancet* **381**, 805–816 (2013).
35. Engelhardt, E. G. *et al.* Accuracy of the online prognostication tools PREDICT and Adjuvant! for early-stage breast cancer patients younger than 50 years. *Eur. J. Cancer* **78**, 37–44 (2017).
36. Chandler, Y. *et al.* Simulation of Chemotherapy Effects in Older Breast Cancer Patients With High Recurrence Scores. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **112**, 574–581 (2020).
37. De Glas, N. A. *et al.* Validity of the online PREDICT tool in older patients with breast cancer: a population-based study. *Br. J. Cancer* **114**, 395–400 (2016).
38. Muranen, T. A. *et al.* PREDICT validity for prognosis of breast cancer patients with pathogenic BRCA1/2 variants. *Npj Breast Cancer* **9**, 37 (2023).
39. Agostinetti, E. *et al.* PREDICT underestimates survival of patients with HER2-positive early-stage breast cancer. *Npj Breast Cancer* **8**, 87 (2022).
40. Zaguirre, K. *et al.* Validity of the prognostication tool PREDICT version 2.2 in Japanese breast cancer patients. *Cancer Med.* **10**, 1605–1613 (2021).

41. Wang, Y. *et al.* External validation and clinical utility assessment of PREDICT breast cancer prognostic model in young, systemic treatment-naïve women with node-negative breast cancer. *Eur. J. Cancer* **195**, 113401 (2023).
42. Blondeaux, E. *et al.* Dose-dense adjuvant chemotherapy in early breast cancer patients: 15-year results of the Phase 3 Mammella InterGruppo (MIG)-1 study. *Br. J. Cancer* **122**, 1611–1617 (2020).
43. Del Mastro, L. *et al.* 5-Fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide versus epirubicin and paclitaxel in node-positive early breast cancer: a phase-III randomized GONO-MIG5 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **155**, 117–126 (2016).
44. Del Mastro, L. *et al.* Fluorouracil and dose-dense adjuvant chemotherapy in patients with early-stage breast cancer (GIM2): end-of-study results from a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **23**, 1571–1582 (2022).
45. De Placido, S. *et al.* Adjuvant anastrozole versus exemestane versus letrozole, upfront or after 2 years of tamoxifen, in endocrine-sensitive breast cancer (FATA-GIM3): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **19**, 474–485 (2018).
46. Lambertini, M. *et al.* Final analysis of the PROMISE-GIM6 phase III trial assessing GnRH agonist use during chemotherapy as a strategy to preserve ovarian function in premenopausal patients with early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **39**, 516–516 (2021).