

DE LA MORFOLOGÍA A LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS CARCINOMAS MAMARIOS IMPACTO EN LAS DECISIONES TERAPÉUTICAS

Helenice Gobbi

En los últimos años hemos practicado la patología basada en informaciones obtenidas con simples microscopios. A partir de estos datos, logramos una serie de conocimientos que nos permitieron clasificar a los tumores mamarios en sus diferentes tipos, de acuerdo a la apariencia morfológica.

Esta clasificación basada en la morfología es tan importante, que fue incluida por el Colegio Americano de Patólogos en su Conferencia de Consenso de 1999 (Cuadro 1). Dentro de la Categoría 1, cuando define el tipo histológico, la clasificación histológica es una de las características más importantes para la evaluación del pronóstico.

También el Consenso de Saint Gallen del

2005 incluyó el tipo histológico entre los factores de pronóstico más importantes en la determinación de la evolución de un cáncer de mama.

El primer paso es definir si es un carcinoma in situ o un carcinoma invasor. En base a estas simples informaciones podemos tomar decisiones terapéuticas como el tipo de cirugía; el tipo histológico junto al tamaño del tumor define la extensión de la cirugía. También define el abordaje axilar: ganglio centinela o vaciamiento axilar.

Después de definir si el carcinoma es in situ o invasor, pasamos a una próxima etapa que es determinar si es un carcinoma ductal sin otra especificación, o si es un tipo especial de cáncer de mama. Ésta también es una información muy importante, pues hay características histológicas

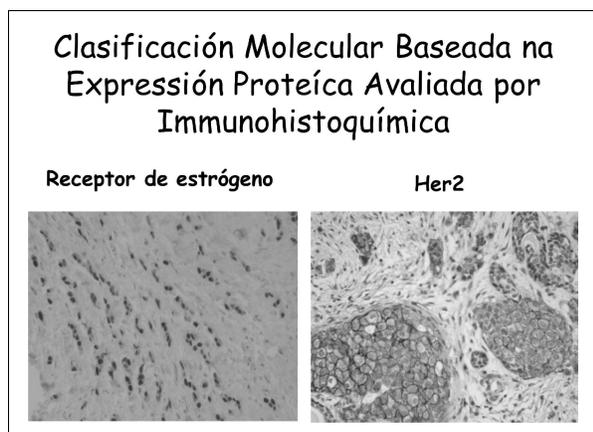
College of American Pathologists Consensus Statement 1999		
Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tamaño ✓ Linfonodos ✓ Tipo histológico (Clasificación hist.) ✓ Grado histológico ✓ Índice mitótico ✓ Receptores hormonais 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proliferação ✓ C-erbB-2 ✓ P53 ✓ EGFR ✓ Angiogênese 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Outros
Fitzgibbons et al. Arch Pathol Lab Med 2000		

Cuadro 1

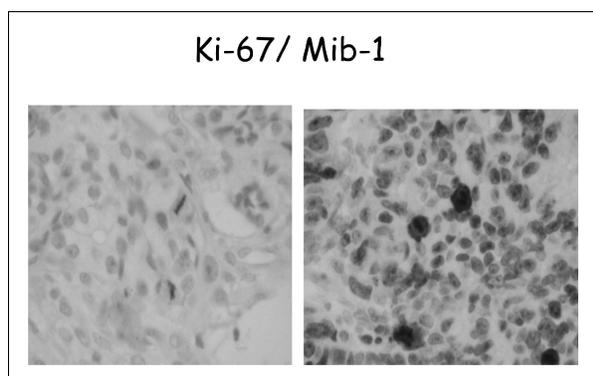
Classificación Prognóstica de los Carcinomas Mamarios	
<u>Prognóstico</u>	<u>Tipo de Carcinoma Mamario</u>
<u>Excelente</u>	Colóide, tubular, cribriforme, adenóide-quistico, túbulo-lobulillar
<u>Bom</u>	Lobular clásico, variante colóide
<u>Regular</u>	Variante Medular (atípico) e lobular
<u>Ruim</u>	Ductal SOE, apócrino e micropapilar
Elston & Ellis, 1998	

Cuadro 2

Médica patóloga, Maestra y Doctora en Patología.
Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil.



Cuadro 3



Cuadro 4

específicas que confieren un pronóstico especial a subgrupos de tumores mamarios.

En 1998 Elston y Ellis propusieron una clasificación de pronóstico de los carcinomas de mama en base al tipo histológico, dándole un pronóstico excelente a los carcinomas coloide y tubular; buen pronóstico al carcinoma lobulillar clásico variante coloide; pronóstico regular a las variantes medular (atípico y lobulillar); y mal pronóstico al ductal avanzado, apocrino, y micropapilar (Cuadro 2).

Pero esta información no es suficiente para predecir la evolución, especialmente dentro del subgrupo de carcinomas ductales invasores. Observamos que tumores con morfología semejante, pueden presentar un comportamiento y una

Implicaciones Terapéuticas

RE + / RP +: Tamoxifen e Doxorubicina

HER2: Trastuzumab e Antraciclinas

Ki-67/MIB-1 (alta marcação):
quimioterapia neoadjuvante

Sotiriou et al. N Engl J Med, 2009

Cuadro 5

respuesta terapéutica distinta. Esto muestra que estos tumores probablemente presentan una heterogeneidad molecular que no se puede equiparar morfológicamente, siendo esto un desafío para los patólogos.

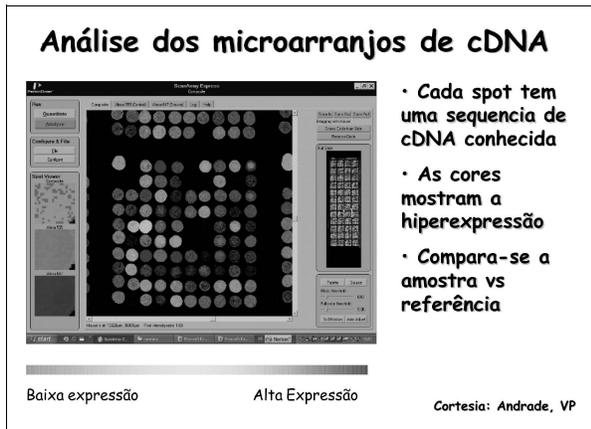
La etapa siguiente de nuestro conocimiento fue la variación de las características moleculares basadas en la expresión proteica avalada por inmunohistoquímica, que nos permite, por ejemplo, clasificar tumores con receptores hormonales positivos, o HER-2 positivo; o aún avalar la fracción de proliferación celular a través de la expresión de Ki-67 o Mib-1; o sea tumores con bajo índice proliferativo o alto índice proliferativo con gran expresión de Ki-67 (Cuadros 3 y 4).

Con estos tres marcadores podemos ahora dirigir el tratamiento de los cánceres de mama, como lo muestra el Cuadro 5.

Nuestro conocimiento continúa avanzando; en los últimos años, especialmente con las nuevas técnicas de biología molecular, pasamos a trabajar con nuevos métodos, que nos permitieron estudiar los *microarrays* de DNA, utilizando una técnica que nos permite analizar centenas de genes en subgrupos de tumores (Cuadro 6).

A partir de técnicas de microdissección y los *microarrays* de DNA, fue posible determinar qué genes estaban con expresión baja o alta, en diferentes grupos de tumores mamarios.

A partir de los trabajos de Perou y Sorlie pa-



Cuadro 6

samos a estudiar, con esta metodología, centenas de genes en 115 tumores mamarios; así como a correlacionar el perfil de la expresión génica con distintos subtipos y diferentes cursos clínicos (Cuadro 7).

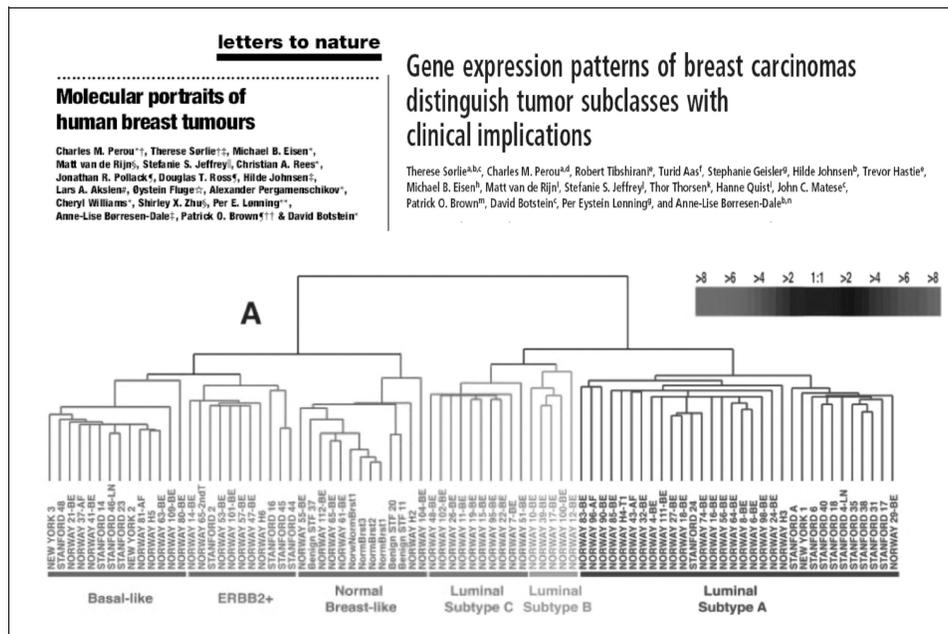
Los trabajos de Perou y Sorlie fueron pioneros en proponer los patrones de expresión génica de carcinomas mamarios, para distinguir subclases tumorales y sus implicancias clínicas

(Cuadro 8).

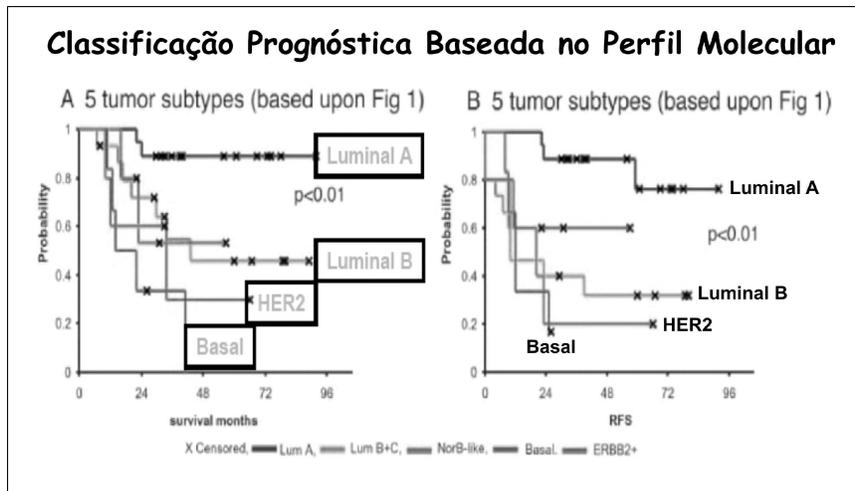
Se pudieron identificar inicialmente cinco subgrupos principales de cáncer de mama. De esta manera pasamos de la clasificación morfológica a la clasificación molecular, en base al perfil de expresión génica de los cánceres mamarios. La gran importancia de esta nueva clasificación es que hay una correlación entre los perfiles moleculares y la evolución clínica de los pacientes, tanto en la sobrevida libre de enfermedad como en la sobrevida global.

Observamos que los tumores llamados luminal, y que expresan receptores hormonales, tienen un pronóstico mejor. En cuanto al primer grupo (Cuadro 9), o sea tumores luminal, ocurren en casi el 70% de los carcinomas mamarios, son más frecuentes en mujeres blancas que en afro descendientes; y en el subgrupo luminal A vemos que tienen RE positivos y citoqueratinas positivas de bajo peso molecular, especialmente citoqueratina 8/18, entre otros marcadores. Pocos casos presentan mutación de TP53.

Con respecto a los tumores luminal B, son



Cuadro 7



Cuadro 8

Luminal

67% dos carcinomas mamários
Branças > Afro descendentes

RE

A: RE + CK 8/18 + LIV-1, fator 3 alfa de transcrição nuclear, HNF3A, XBP1 e GATA3.

- 13% mutação no TP53

B: RE + CK8/18 + GCH, LAPTM4, NSEP1 e CCNE1

- 67% mutación en el TP53
- > expresión de el Ki67 y PCNA
- alto grado
- HER2+

CK 8/18

Perou et al. Nature, 2000

Cuadro 9

tumores que tienen RE positivos y citoqueratinas positivas de bajo peso molecular, y expresan HER-2. La diferencia es que un 67% presenta mutación de TP53, hay mayor expresión proliferativa de Ki67 y PCNA, son de alto grado y HER-2 positivo. En consecuencia, dentro mismo

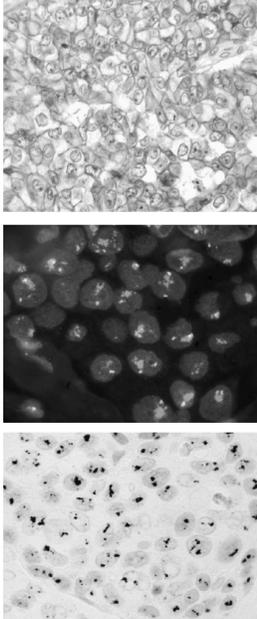
del grupo de los tumores luminal, tenemos dos subgrupos distintos.

El grupo siguiente es el HER-2 positivo, con tumores que se caracterizan por ser de alto grado, en la mayoría de los casos con ganglios positivos (Cuadro 10); el 80% de los casos presen-

HER2+

- 15 a 30% de los carcinomas mamarios
- Alto grado / ganglios +
- 80% mutación en el TP53
- Alta expresión de Ki67 y PCNA

Barberis et al. Am J Clin Pathol. 2008



Cuadro 10

Basal

- Expressam CK 5/17, CK 14, anexin 8, CX3CL1 y TRIM 29
- 8 a 20% dos carcinomas mamarios
- **Maioria é triplo negativo: RE-, RP-, HER2 -**
- Mulheres jovens, afro-descendentes
- Mutaciones en el BRCA1
- Maioria é ductal SOE de alto grado
- Tipos especiais: medular, metaplásico y adenóide cístico
- Metástases viscerais (cérebro e pulmões)

Livasy et al. Modern Pathology, 2006

Cuadro 11

ta mutación de TP53 y alta expresión de Ki67 y PCNA. Este grupo corresponde a un bajo porcentaje de los carcinomas mamarios, cerca del 15%, avalados por inmunohistoquímica.

El tercer grupo de carcinomas mamarios, caracterizados por la expresión génica, son los tumores basales (Cuadro 11). Se caracterizan por presentar marcadores que normalmente se expresan en las células mioepiteliales o células ba-

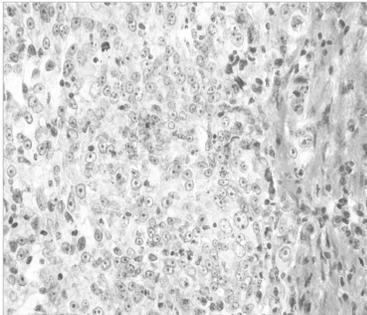
sales de los conductos mamarios; expresan citoqueratinas 5/17, y corresponden a un porcentaje más bajo de tumores (8% a 20% de los carcinomas mamarios); y como se ha demostrado, la mayoría de estos tumores son triple negativos; afectan más a mujeres jóvenes, afro descendientes; y presentan con frecuencia mutaciones del BRCA 1.

Las metástasis más frecuentes son viscerales (cerebro y pulmones) y son menos frecuentes las metástasis axilares. En general, son tumores de crecimiento bien delimitado, expansivo, con grandes zonas centrales acelulares. Tienen también un patrón de crecimiento sincicial, y presentan un aspecto de necrosis geográfica.

Son tumores de alto grado histológico, generalmente grado 3, con alto índice mitótico; y dentro de los tumores con características basales, cerca del 6% son carcinomas medulares. Pero si consideramos la frecuencia de los carcinomas medulares, vemos que el 95% es de tipo basal (Cuadro 12). También en los carcinomas metaplásicos, la mayoría es de fenotipo basal.

Carcinoma medular

- 6% dos tumores basais
- 95% dos ca medulares são basais



Cuadro 12

Hay también implicancias terapéuticas específicas para este tipo de tumores: son tumores de alto grado; no tienen un tratamiento específico debido a que son triple negativos para los tres marcadores que más conocemos, RE, RP y HER-2. Por lo tanto, la quimioterapia y la radioterapia son las únicas alternativas disponibles.

Una característica importante es que los tumores basales muestran tasas elevadas de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con an-

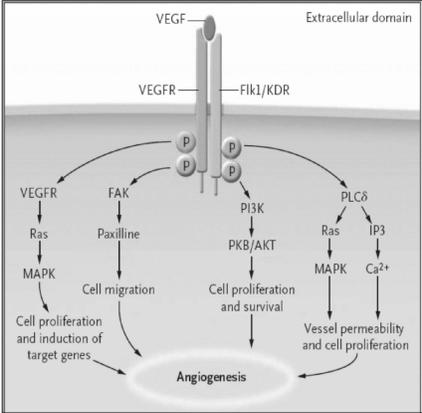
traciclina, con respuesta patológica completa, aunque tienen peor pronóstico. También presentan una respuesta baja a los derivados de taxanos.

Sin embargo, tenemos blancos terapéuticos (Cuadro 13) que podemos usar como alternativa de tratamiento para las pacientes con tumores basales. Una de las propuestas de estudios más comunes actualmente para este grupo es el C-kit: inhibidores de receptor de tirosinoquinasa tipo III (imatinib); los inhibidores de la angiogénesis como avastina; y también los inhibidores de EGFR (HER-1). Estos son los posibles tratamientos más promisorios para este tipo de tumores. En nuestra experiencia, tenemos hoy cerca de 200 casos de tipo basal, en nuestra serie 36,4% de los casos expresaron EGFR; por lo tanto sería un blanco terapéutico potencial para este tratamiento.

Dentro de los inhibidores de EGFR (Cuadro 14), sabemos que reducen la expresión de cten; y hay algunos anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de EGFR, principalmente el cetuximab (endovenoso). Tam-

Alvos terapéuticos

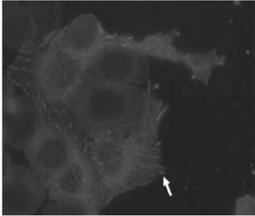
- c-kit: inhibidores do receptor tirosina-quinase tipo III (imatinib)
- VEGF: inibição da angiogénesis (avastina)
- EGFR (HER1): inhibidores



Cuadro 13

Inibidores do EGFR

- Reduzem a expressão do cten
- Anticorpos monoclonais contra o domínio extra-celular do EGFR: cetuximab (EV)
- Inibidores da atividade tirosina-quinase do receptor: gefitinib, erlotinib e lapatinib (VO)



KATZ et al, 2007

Cuadro 14

bién están los inhibidores de la actividad de la tirosinoquinasa, como gefitinib, erlotinib y lapatinib (vía oral).

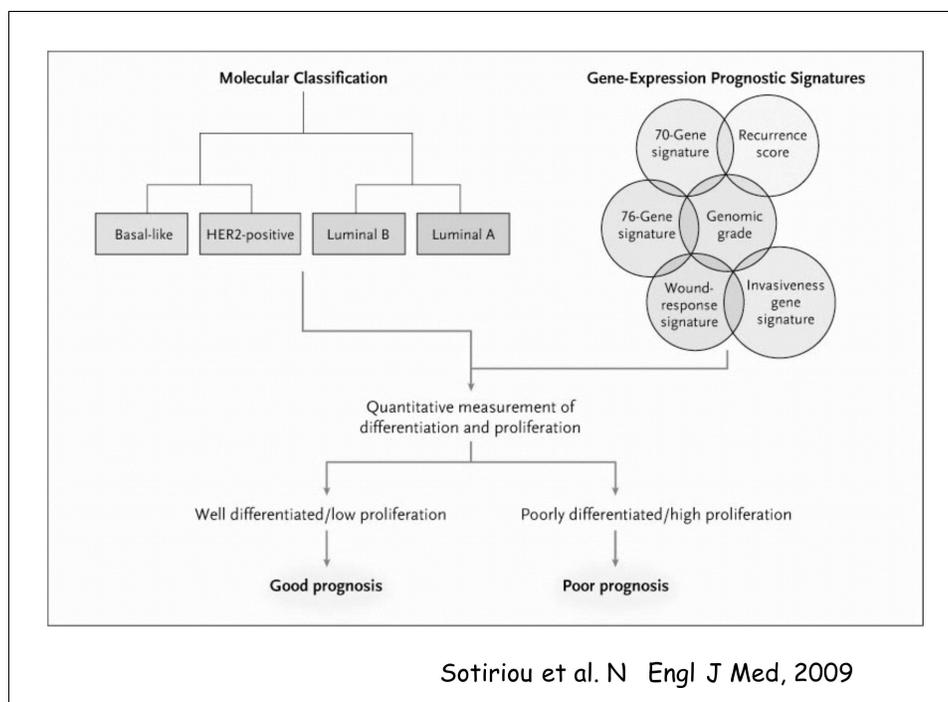
Las implicancias terapéuticas de estos tumores clasificados a través de la técnica de biología molecular, confirman que los tumores de tipo luminal son sensibles al tratamiento con tamoxife-

no y doxorrubicina; el grupo HER-2 positivo se trata con tratuzumab y antraciclinas. En el grupo basal necesitamos más estudios para confirmar el tratamiento con platino e inhibidores de PARP y los inhibidores de tumores con EGFR positivo, como cetuximab, gefitinib y lapatinib.

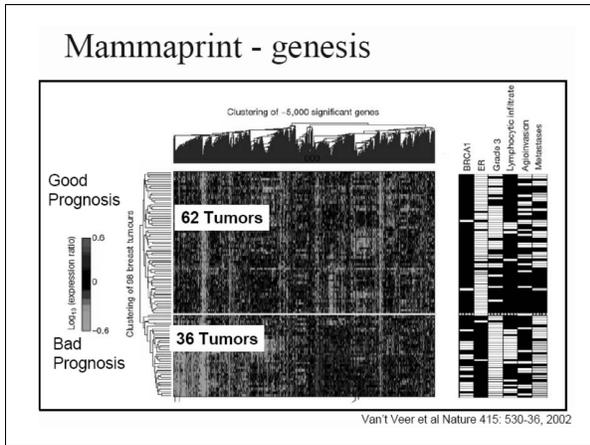
¿Qué pasa con los tumores con ganglios negativos y RE positivos (el grupo especial con RE positivos) que no va a responder a los tratamientos habituales? En ese caso 20% a 30% de las pacientes van a presentar recurrencia. Son necesarios nuevos test.

El mayor desafío para los oncólogos, mastólogos y patólogos son las pacientes con las mismas características morfológicas en cuanto a tamaño, tipo histológico y grado; pueden tener distinta evolución. Por ejemplo, un carcinoma ductal invasor, grado 2, de 2 cm, ganglios negativos, RE/RP positivos, HER-2 negativo, en esos casos del 20% al 30% presentará recidiva.

Hay una excelente revisión publicada en



Cuadro 15



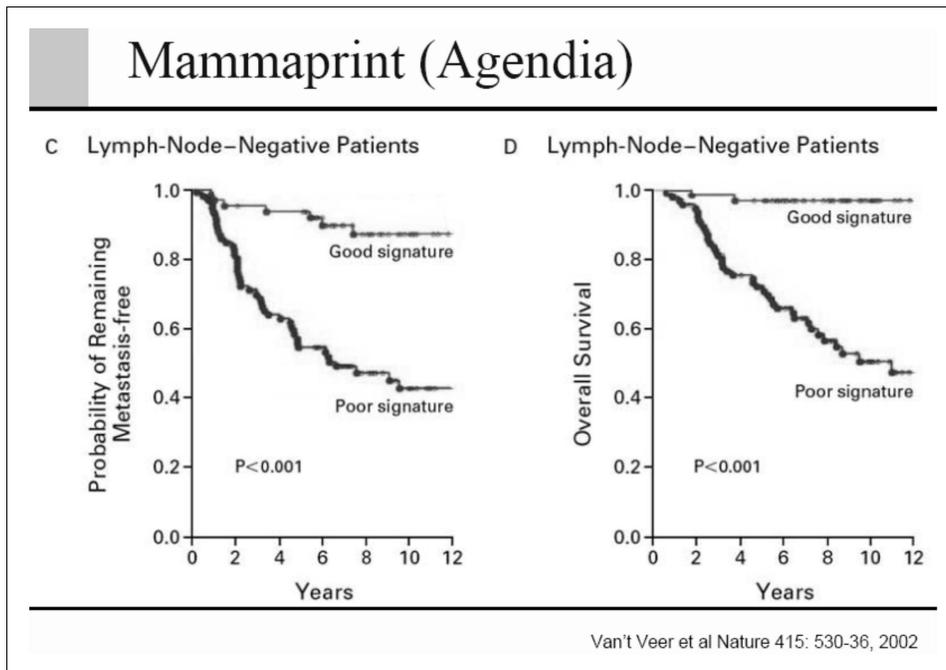
Cuadro 16

2009 en el New England Journal of Medicine por Sotiriou, donde se hizo una revisión de las características moleculares y clínicas de los casos estudiados hasta el momento; y donde se observó la importancia de dividir los tumores en dos grandes grupos, el de HER-2 negativo y el de HER-2 positivo (Cuadro 15).

De este estudio surgió que a partir de la cla-

sificación molecular, se agregan nuevos test utilizando otras metodologías (Cuadro 16) que son los test de expresión génica, y permiten clasificar los tumores nuevamente en dos grandes grupos: de buen pronóstico o de peor pronóstico. El problema de estos test es que son muy variados; y en una revisión reciente también se mostró que hay apenas dos genes en común en estos test. Por ejemplo, en una característica como el tamaño del tumor, están involucrados muchísimos genes.

¿Cuáles son los más importantes? Uno de los primeros test europeos fue el Mammaprint, creado por un grupo holandés, que analizó inicialmente 98 tumores, 62 de buen pronóstico y 36 de mal pronóstico. Este test avaló las pacientes con ganglios negativos, y fue acompañado a través de un estudio retrospectivo con material congelado, analizó 70 genes (Cuadro 17), y a través del perfil de expresión génica fue posible identificar al grupo de buen pronóstico, así como al de mal pronóstico, tanto en la sobrevi-



Cuadro 17

ONCOTYPE Dx™ : Score de Recorrência

Desenvolvimento:

- 250 genes
- 447 pacientes axila +/axila -;
- ER+/ER-
- Tratamento heterogêneo

Cuadro 18

da libre de enfermedad como en la sobrevida global.

El MammaPrint™ es un test disponible comercialmente; analiza la expresión de 70 genes seleccionados; se relaciona con la edad, el grado tumoral y los RE positivos. Y las desventajas son que necesita tejido fresco y su costo es muy elevado.

Los norteamericanos desarrollaron un primer test, el Oncotype DX, que es el primero que acreditó la FDA. Este test se basó en un estudio de 250 genes, que no fueron analizados en tejido fresco, pero sí en material en parafina. En

el desarrollo del test se analizaron 250 genes y 447 tumores de pacientes axila positiva y axila negativa, en dos grupos: RE positivos y RE negativos; y estas pacientes tuvieron tratamiento heterogéneo.

Hubo un trabajo inicial publicado en el New England Journal of Medicine por Soonmyunk Paik y col. El Oncotype DX analiza 21 genes y provee un score de recurrencia en base al cual es posible, según los fabricantes, predecir la evolución clínica de las pacientes y la respuesta al tratamiento (Cuadro 18).

En cuanto a sus características, es un test que usa PCR cuantitativo (no es *microarray*), predice la recurrencia a distancia, es útil para pacientes RE positivos y axila negativa. Entre las ventajas está que usa tacos de parafina, pero es muy costoso.

Volvemos a la revisión de Sotiriou del año 2009, donde se establece una comparación de los test disponibles (Cuadro 19); en esta revisión se analizan dos nuevos test, el Theros y el MapQuant DX, que surgieron más recientemente.

Table 1. Commercially Available Genomic Assays for the Prediction of Clinical Outcome in Patients with Breast Cancer.*

Variable	MammaPrint	Oncotype DX	Theros	MapQuant Dx
Provider	Agendia	Genomic Health	Biotheranostics	Ipsogen
Type of assay	70-Gene assay	21-Gene recurrence score	2-Gene ratio of HOXB13 to IL17R (H/I) and molecular-grade index	Genomic grade
Type of tissue sample	Fresh or frozen	Formalin-fixed, paraffin-embedded	Formalin-fixed, paraffin-embedded	Fresh or frozen
Technique	DNA microarrays	Q-RT-PCR	Q-RT-PCR	DNA microarrays
Centrally certified laboratory†	Yes	Yes	Yes	Yes
Indication	To aid in prognostic prediction in patients <61 yr of age with stage I or II, node-negative disease with a tumor size of ≤5 cm	To predict the risk of recurrence in patients with ER-positive, node-negative disease treated with tamoxifen; to identify patients with a low risk of recurrence who may not need adjuvant chemotherapy	To stratify ER-positive patients into groups with a predicted low risk or high risk of recurrence and a predicted good or poor response to endocrine therapy	To reclassify grade 2 tumors into low-risk grade 1 or high-risk grade 3 tumors, specifically for invasive, primary, ER-positive grade 2 tumors
Level of evidence (I–V)‡	III	II	III	III
FDA clearance	Yes	No	No	No
Availability	Europe and United States	Europe and United States	United States	Europe

Sotiriou et al. N Engl J Med 2009

Cuadro 19

Por ejemplo, Theros se basa en la relación de dos genes, no de 70 ni de 21, estableciendo una diferencia; y MapQuant se basa en el grado genómico. De todos ellos, el único aprobado por la FDA y para su uso clínico en Europa, es el MammaPrint.

Otra revisión fue la de Ross, publicada en *Advances in Anatomic Pathology* en 2009, que analizó los test disponibles, mostrando una gran variación en cuanto a test basados en *slides* como inmunohistoquímica y FISH; y no basados en *slides*, como RT-PCR y Microarray. En esta revisión se ve que los test genéticos, no agregan más información que las obtenidas para grado histológico, tipo histológico y la variación de los tres principales marcadores de predicción realizados con inmunohistoquímica.

Se realizaron algunos estudios para validar los test moleculares. Así en Europa se inició el EORTC Trial 10041 (BIG3-04)-MINDACT (*microarray* en enfermedad con ganglios negativos puede evitar la quimioterapia). La finalidad de este estudio es ver el impacto en las pacientes,

para reducir los efectos secundarios del tratamiento (cáncer secundario, toxicidad cardíaca, menopausia precoz, disminución de la función cognitiva) y el impacto en la sociedad, como la reducción de los costos del tratamiento. El estudio es prospectivo, *randomizado*; compara la firma genética (70 genes), aplica criterios clínico-patológicos clásicos; selecciona pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos para quimioterapia adyuvante.

Yendo a las consideraciones finales, podemos decir que los test de expresión génica son promisorios, pero necesitan validación pronóstica individualizada; y necesitan ser sustentados por estudios clínicos importantes. También tienen sus limitaciones; por ejemplo, algunos test necesitan material congelado; todos los test tienen costos altos y requieren profesionales muy bien entrenados. También necesitan estandarización y controles de calidad de los laboratorios, especialmente en la fase preanalítica de recolección del material, hasta la fase analítica de la realización de los test.