*Revista Argentina de Mastología 2013; 32(117): 355-366*

# CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA MÁS ALLÁ DE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS

**Jorge S. Reis-Filho ***

Quiero discutir con ustedes la clasificación molecular del carcinoma de mama y cómo podemos ir más allá de los subtipos intrínsecos.

Quiero discutir la heterogeneidad del carcinoma de mama desde el punto de vista de los subtipos intrínsecos y de los nuevos subtipos. Después pasar a algunos resultados muy alentadores a través del análisis de secuencia de los carcinomas. Hay dos puntos a discutir, hablar de la heterogeneidad genética intertumoral, hablando de las constelaciones de las mutaciones entre los carcinomas y después de la heterogeneidad genética intratumoral relacionada; o sea, en el mismo cáncer de mama hay diferentes clones con diferentes mutaciones.

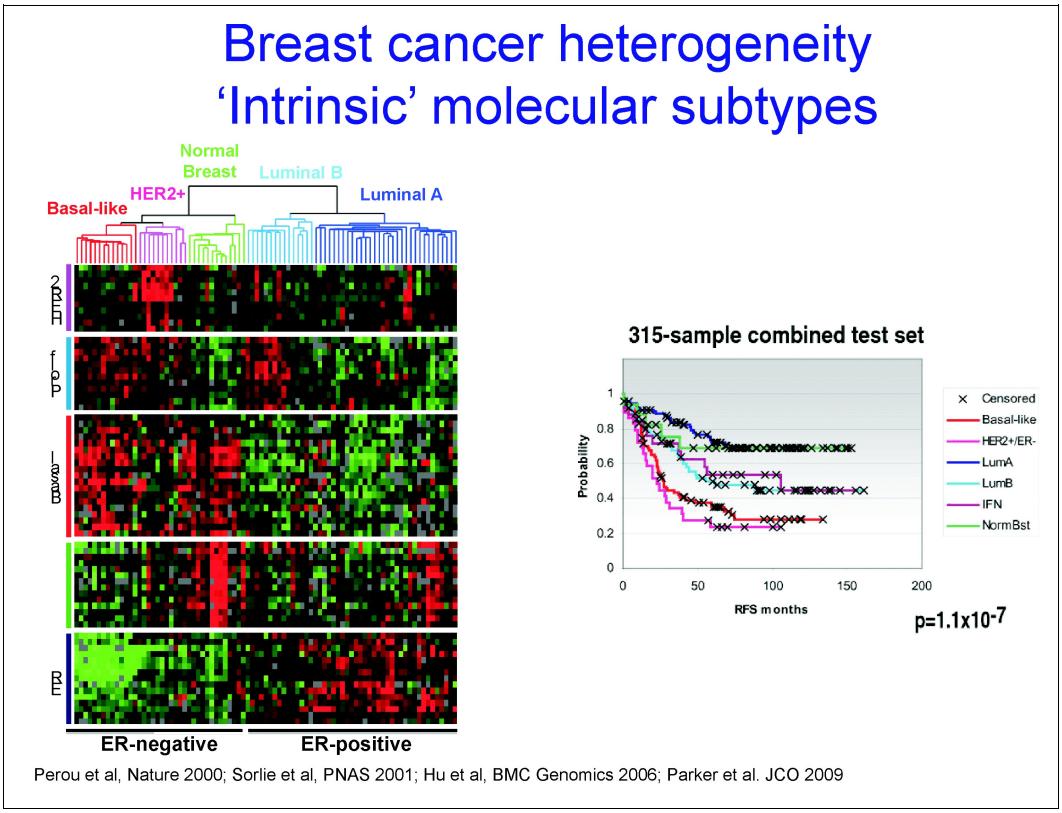
Creo que en el 2013 todos sabemos que el carcinoma de mama es una enfermedad heterogénea; y nosotros, como patólogos, lo hemos sabido por mucho tiempo. De hecho, hemos pasado las últimas décadas tratando de desarrollar parámetros para poder analizar esto y para ponernos de acuerdo acerca de la heterogeneidad de los carcinomas.

Una de las maneras era la forma de los grados histológicos aplicados a los carcinomas ductales, como a los lobulillares. El grado es una medida de diferenciación y se correlaciona con el pronóstico. Sumado a esto, también hemos reconocido la existencia de múltiples subtipos de carcinoma.

Tipos histológicos que no sólo tienen un rasgo morfológico distintivo, pero también tienen una diferencia de biología y un diferente comportamiento clínico. A pesar de que hemos tenido toda esta información por un largo tiempo, esto no ha tenido un impacto tan importante en el manejo de las pacientes, porque como patólogo cuando voy al subtipo, realmente no tenemos demasiada subtipificación. La heterogeneidad del carcinoma de mama apareció después de la publicación de los estudios de Parker y col. cuando empezó en el 2009 en la Universidad de Stanford. Lo que hizo fue algo muy simple, ahora en el 2013 diríamos que es algo anecdótico. Extrajo el ADN e hicieron ensayos de expresión genética e identificaron una lista de genes que variaban entre los tumores, después utilizaron estudios biométricos para analizar las células. Los tumores que tenían patrones similares se pusieron juntos y los que tenían distintos se separaron. Utilizando este abordaje simple llegaron a tres conclusiones fundamentales. Primero, como muestra el Cuadro 1, el perfil transcriptómico de los RE positivos y RE negativos son distintos, de tal modo que ahora comprendemos que son enfermedades distintas. Segundo, dentro del grupo RE positivo hay dos subtipos, luminal A y luminal B, que se pueden percibir como las dos partes del espectro y las diferencias entre el luminal A y el luminal B son simples. El luminal A se relaciona con el nivel de expresión de genes vinculados con la proliferación. Entonces, el luminal A tiene bajo nivel de proliferación y el luminal B alto nivel de proliferación. La tercera conclusión, que fue muy importante, era que en el grupo RE negativo hay muchos subtipos moleculares. En la clasificación inicial había tres, *normal like*, *basal like* y HER2 positivo.

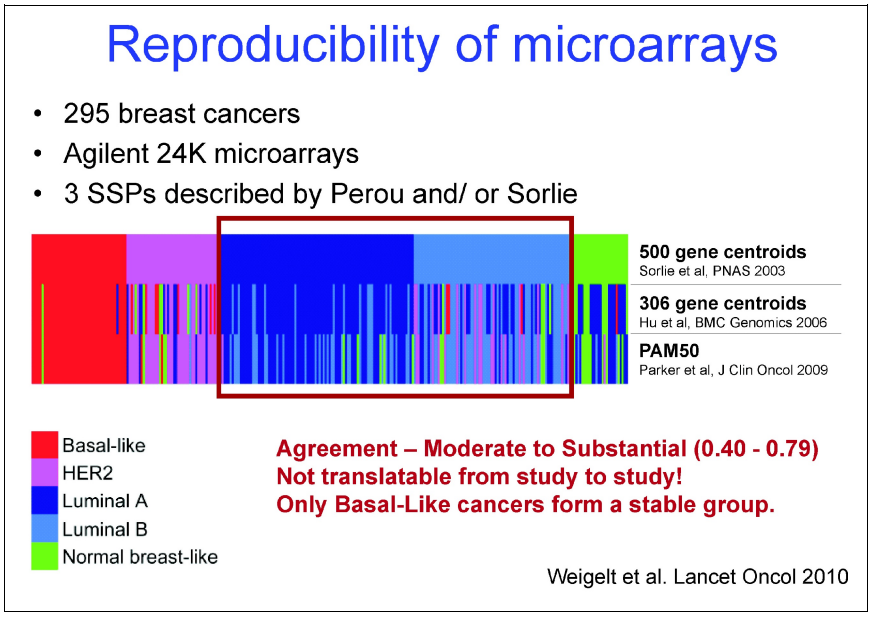
Ahora, hay muchas variaciones; por ejemplo, hay algunas que tienen más células estro-

* Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.




**Cuadro 1**

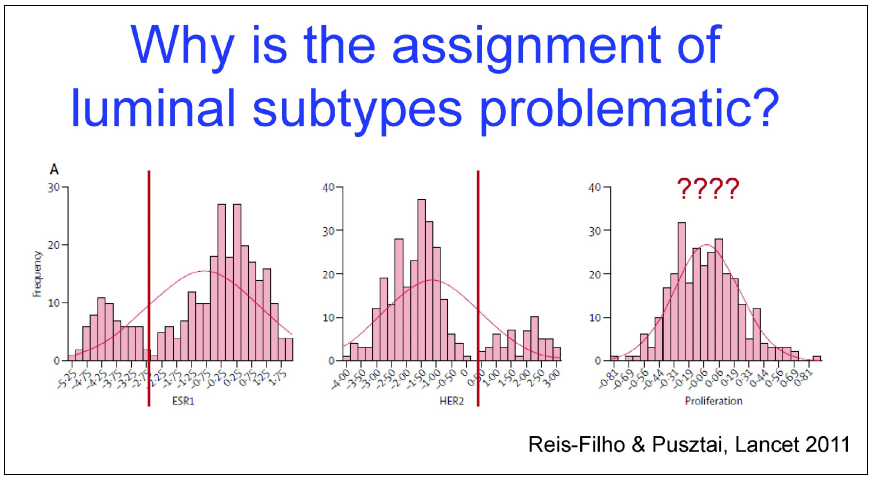
males y hay muchos subtipos que están apareciendo en el grupo RE negativo. Este sistema de clasificación ha sido aceptado por cirujanos, por oncólogos y otros. Siguiendo esta observación inicial muchos han investigado las características clínicas y moleculares de estos subtipos. Ahora nos hemos dado cuenta que los luminal A son del tipo *basal like* y son bastantes distintos; tienen distintos factores de riesgo, presentación clínica, rasgos patológicos, respuesta a la terapia, y también resultados. Es por ello, que no es sorprendente que los términos luminal A, luminal B, tipo basal o HER2, sean incorporados a nuestro léxico y hemos tratado de implementar esta clasificación en la práctica clínica. Sin embargo, hay un problema, con el correr del tiempo en la clasificación molecular han publicado diferentes métodos de *microarrays* para clasificar a las pacientes individuales para cada uno de estos subtipos. Hace algunos años alguien de mi grupo, Weigelt, decidió comparar los distintos métodos de *microarrays* para clasificar los tumores individuales. Todos ellos publicados por los que proponían la clasificación molecular. Los resultados están publicados y los quiero compartir con ustedes. El Cuadro 2 resume 18 meses de trabajo, que muestra 295 pacientes. En las tres barras horizontales las pacientes están organizadas del mismo modo. En la primera barra las pacientes fueron clasificadas en el subtipo molecular utilizando los primeros métodos que analizaban 500 genes. La segunda barra, un método que analizaba 306 genes. Y la tercera de 50 genes, la versión PAM50, que fue útil para desarrollar la PAM50 que va a estar disponible comercialmente. Podemos sacar como conclusiones que la concordancia entre los diferentes métodos es modesta, no es muy alta. El único subtipo que



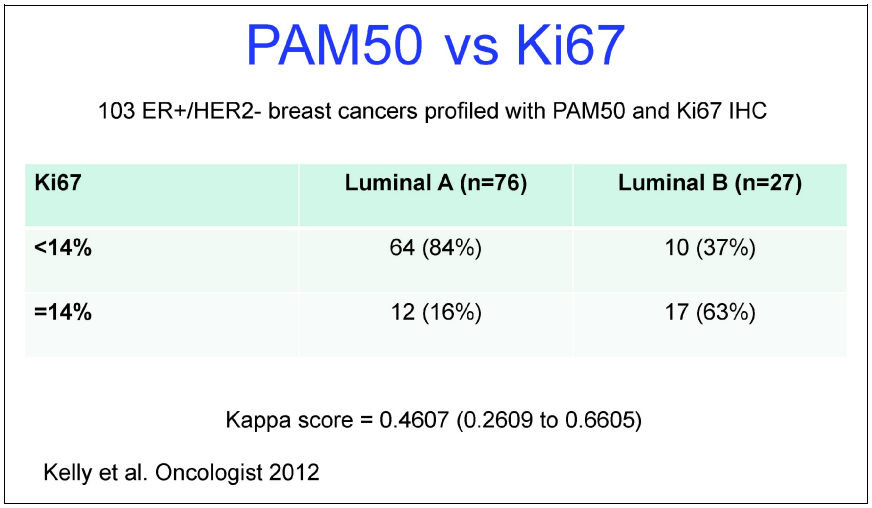

**Cuadro 2**

puede ser identificado sin importar el método utilizado, es el tipo basal. La subclasificación del resto de los subtipos, depende del tipo de método utilizado. En especial, en las pacientes que son luminal A o luminal B depende del método de microensayo utilizado.

¿Por qué la clasificación en luminal A y luminal B es tan desafiante con el microanálisis? Quiero compartir algunos detalles del perfil microgenético. Este sistema de clasificación se basa en tres componentes, los genes RE y relacionados a RE, el HER2 y la amplificación HER2/neu. Estos genes relacionados muestran un patrón de unión (Cuadro 3). Se muestran los HER2/neu positivos y negativos. Cuando tenemos una distribución bimodal de un biomarcador es trivial encontrar un punto de corte y no importa el método que se use, siempre se encuentra el punto




**Cuadro 3**



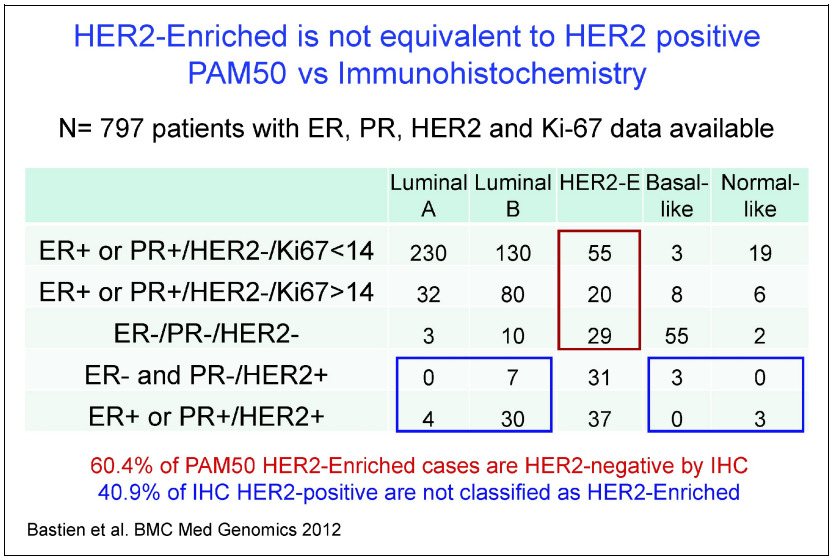

**Cuadro 4**

de corte. Pero entre luminal A y luminal B está determinado por la cantidad del gen relacionado con la proliferación y esto tiene una distribución normal. Cuando se tiene una distribución normal, los puntos de corte no existen.

Lo que ocurre es que los distintos métodos utilizados para diferenciar luminal A y luminal B, ponen los puntos de corte en diferentes partes de esta distribución y esa es la razón por la cual en los 13 años desde que se publicaron el luminal A y el luminal B, no tenemos una definición aceptable para estos tumores. Además, hay un grave problema, porque el perfil de expresión microgenética no se puede aplicar a las muestras incluidas en parafina. Hay dos grupos que decidieron hacer sus propios marcadores subrogantes. El primer grupo fue publicado por Carey y su grupo definió luminal A en aquellos que eran RE positivo y/o RP positivo, HER2 negativo y luminal B los que eran RE positivo y/o RP positivo, HER2 positivo. Esta es una definición muy pragmática, pero no se correlaciona con el perfil microgenético.

En el 2011 el St. Gallen International Expert Consensus, agregó otro biomarcador para el identificador del luminal A y lo definieron como aquellos que eran RE positivo y/o RP positivo, HER2 negativo y Ki67 menor de 14%; mientras que los luminal B eran los Ki67 mayor o igual al 14% o aquellos HER2 positivos (Cuadro 4). Recientemente otro grupo desarrolló el ensayo PAM50, que ahora es un test comercial y se puede aplicar al ADN de los tejidos incluidos en parafina. Es muy prometedor, pero tiene que tener mayor validación. Finalmente, el último año, el grupo de Prat tuvo otra definición para el luminal A, RE positivo, RP positivo, HER2/neu negativo, Ki67 más del 14%, RP mayor de 20%. El problema es que todas estas definiciones están disponibles y nosotros las usamos de manera intercambiable. Sin embargo, la evidencia sugiere que no son intercambiables.

De hecho, un estudio del grupo de Kelly cotejó cabeza a cabeza, el PAM50 con la definición de St. Gallen. Tuvieron 103 carcinomas RE positivo, HER2/neu negativos. Estudiaron con un perfil de PAM50, Ki67. Cuando compararon la clasificación PAM50 con el método de St. Gallen del Ki67, tuvieron algunos problemas. La mayoría de los tumores luminal A tenían más del 14%, mientras que los otros tenían menos del 14%. La realidad es que la diferencia entre ambos métodos tenía un *score* de kappa de 0,46 y más de un tercio de los tumores luminal B tenían Ki67 menor al 14% y en los luminal A pasaba lo contrario. Las dos clasificaciones no son

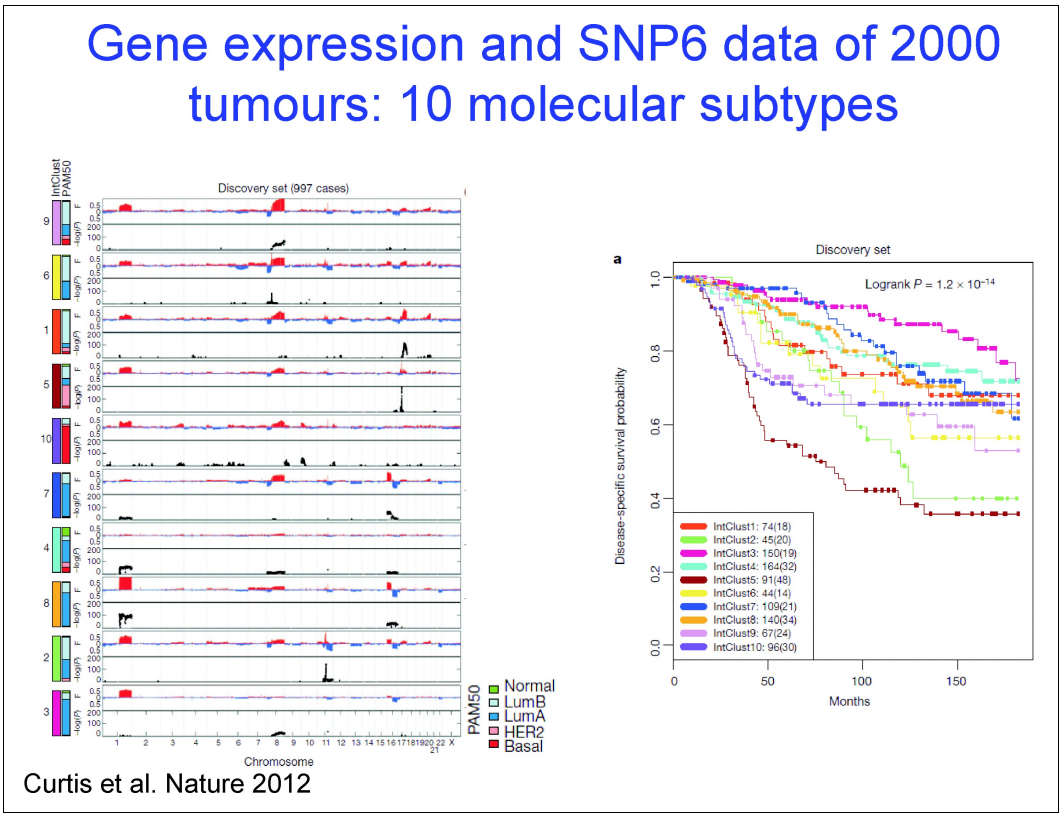



**Cuadro 5**

equivalentes. El otro problema con este sistema de clasificación es que el grupo enriquecido con HER2/neu no es equivalente a lo que nosotros llamamos HER2 positivo, de acuerdo a las guías de ASCO. De hecho, en este estudio publicado por el grupo que está comercializando el ensayo con PAM50, tiene 797 pacientes y hacen el test. En el grupo de HER2 enriquecido de los que el 60% de los tumores definidos por PAM50 como HER2 enriquecidos eran HER2 negativos por Fish y el 41% de los tumores clasificados como HER2 positivo por inmunohistoquímica y Fish, no se clasificaron como HER2 enriquecidos; este es un problema enorme. ¿Qué hacemos?, si un caso es HER2 negativo por Fish e inmunohistoquímica y después viene con HER2 enriquecido por PAM50. ¿Qué le damos a la paciente, herceptín u otros agentes? No tenemos datos. De la misma manera si un tumor es HER2 positivo y después viene con un diagnóstico de luminal A por PAM50. ¿Qué hacemos?, ¿le negamos un cierto agente terapéutico? Son cuestiones para las que no tenemos evidencias y que tenemos que resolver antes de usarlos (Cuadro 5).

En conclusión para esta parte, ¿qué ofrece la clasificación molecular? Desde el punto de vista conceptual ha sido un gran cambio, porque ahora reconocemos la heterogeneidad del cáncer de mama. Estos resultados nos han conducido a que los RE positivos y negativos son tan distintos que la única similitud que tienen es que se originan en el mismo sitio microanatómico y órgano; aparte de eso, son enfermedades completamente distintas. En cuanto a la utilidad clínica, por otro lado, su valor es más limitado de la clasificación molecular. Por definición luminal A *vs.* B, es un poco floja y los HER2 enriquecidos no quiere decir que es igual a HER2 positivo, de acuerdo con la ASCO. La estandarización de las definiciones; PAM50 quizás nos dé la estandarización que necesitamos, pero se requieren estudios adicionales.

Aunque estamos proponiendo esta clasificación, el año pasado el grupo de Curtis analizó los datos de 2.000 tumores y se estudió la expresión genética para ver el número de copias. Usando métodos bioinformáticos muy elegantes demostraron objetivamente que el número más parsimonioso de subtipos moleculares de cáncer no es cinco, sino diez (Cuadro 6). Hay diez subtipos que se correlacionan con la evolución y el pronóstico. Siempre está esa paradoja de iden-

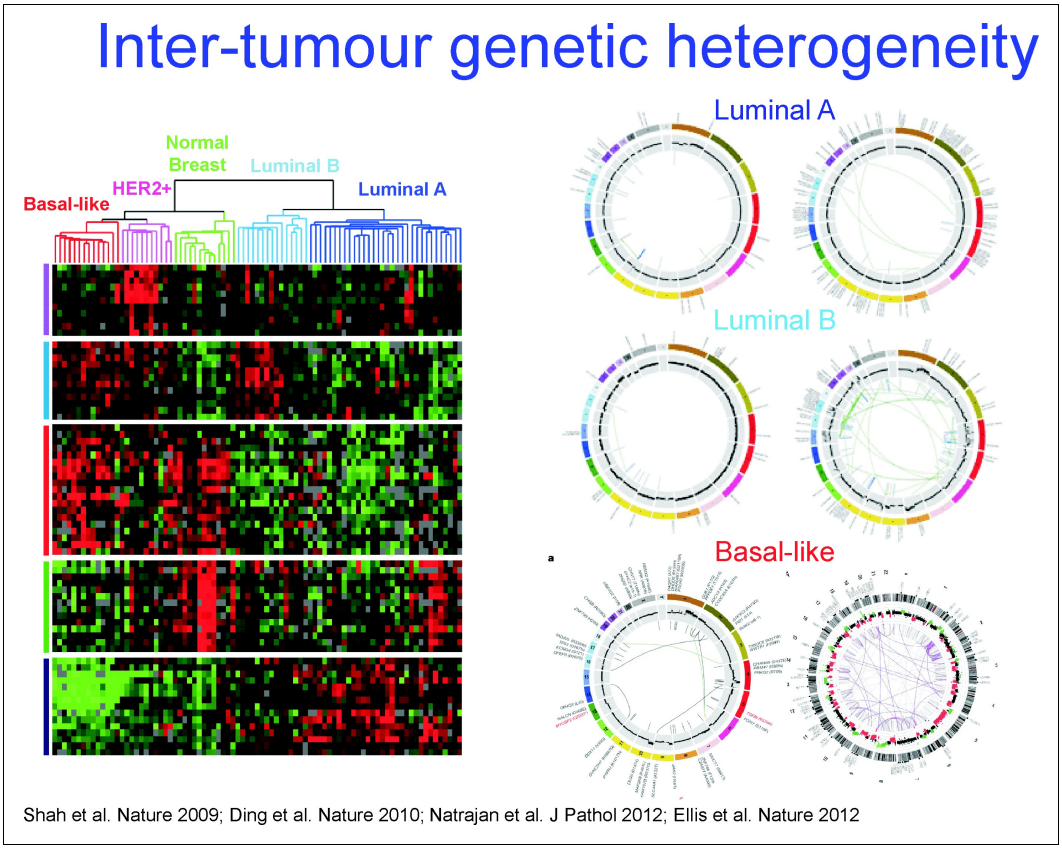



**Cuadro 6**

tificar algo que realmente es interesante, tratar de implementarlo, y en el curso de implementar una nueva clasificación aparece otro nuevo adelanto. Entonces, hay que quedar en sintonía, porque creo que no va a haber sólo cinco subtipos, sino que tendremos mucha más heterogeneidad en el futuro.

Yendo a la segunda parte que se refiere a la heterogeneidad intertumoral, la diversidad de acuerdo a su repertorio genético; este concepto sólo así planteado por el desarrollo de nuevas tecnologías; la secuenciación de nueva generación que nos permite definir el repertorio en 19 horas. Una de las cuestiones clave de la clasificación molecular, en el supuesto que los tumores de cada subtipo iban a ser más homogéneos con los otros que si los comparamos en general a todos.

El Cuadro 7 muestra resultados que ponen en duda esas nociones. Aquí tenemos 6 casos, dos cánceres clasificados por PAM50 como luminal A, dos como luminal B, dos como basal. Se pueden apreciar los trazados. Cada tumor fue sometido a secuenciación genómica y son la representación de su genoma. Se pueden apreciar los cromosomas alrededor del círculo, en la parte externa del círculo tenemos las mutaciones, en el medio el número de copias y en la parte interna el rearreglo inter e intratumoral. Al observar el luminal A de la izquierda, éste tiene pocas mutaciones, sólo dos rearreglos intercromosómicos y pocos cambios de número de copias. Por otro lado, el de la derecha, también clasificado como luminal A, tiene muchas mutaciones más y múltiples rearreglos cromosómicos; pero ambos se clasifican como luminal A. En los

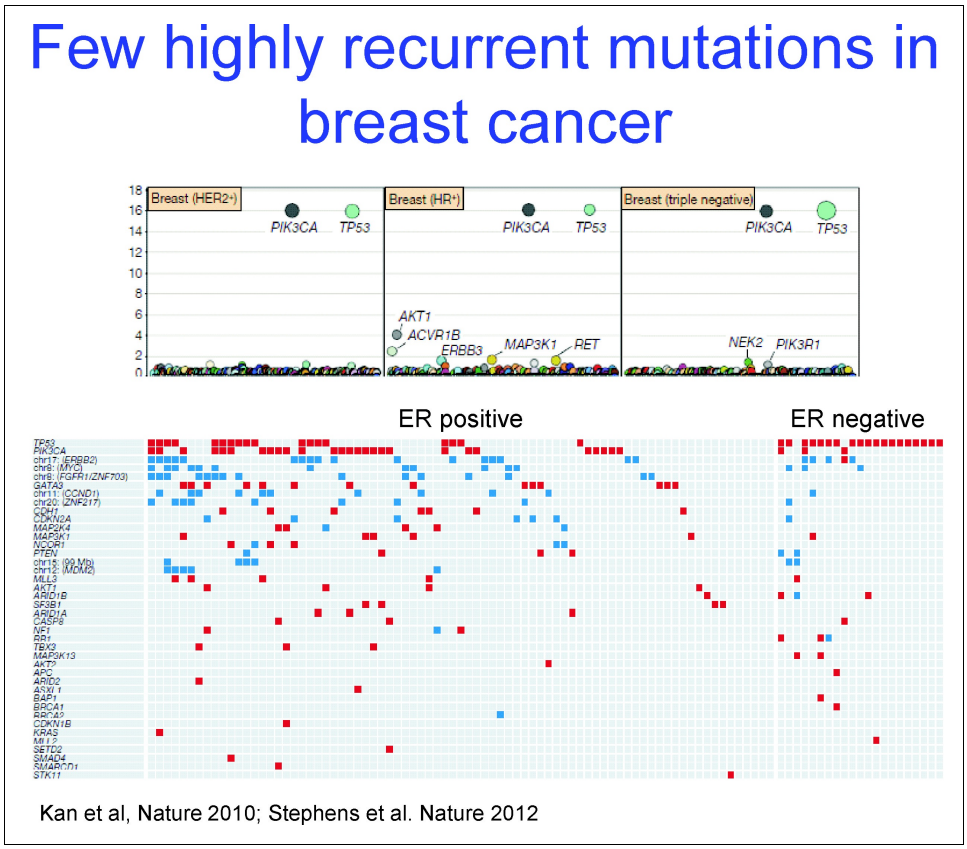



**Cuadro 7**

luminal B se repite la misma historia. En el de la izquierda se observan pocas mutaciones, pocos rearreglos del número de copias; mientras que en el de la derecha, también luminal B, con muchas mutaciones, cambio de número de copias, rearreglos y toda una pléyade de rearreglos intercromosómicos. En cuanto a los tipos *basal like*, estos cánceres tienen un genoma muy complejo, increíblemente complejo en cuanto a todos los parámetros. Sin embargo, al comparar estos dos cánceres tipo basal, pese a que tienen muchas mutaciones, el único gen común mutado entre los dos era p53.

Entonces, éste es otro concepto, que aunque los cánceres de mama tienen muchas mutaciones, en realidad hay muy pocas mutaciones altamente recurrentes. El Cuadro 8 ilustra sobre un estudio hecho por un grupo analizando 1.500 genes, los dividieron en HER2 positivos, RH positivos y triple negativos. Realmente, un método muy moderno para definir qué genes son conductores o altamente recurrentes en su mutación. Los que aparecieron fueron TP53 y PIK3CA. Sabemos que ambos serían importantes, pero fueron los únicos dos que demostraron ser altamente recurrentes como mutaciones conductoras.

Tuve el placer de trabajar en conjunto con un instituto, donde secuenciaron en muchos tumores todos los genes de codificación. El Cuadro 9 muestra los resultados. Cada columna es un gen y las filas los tumores. Los dos genes que fueron nuevamente mutados son el TP53 y PIK3CA; después había un par más, pero los únicos dos que se mutaban son los mencionados. Hicimos experimentos y nos planteamos



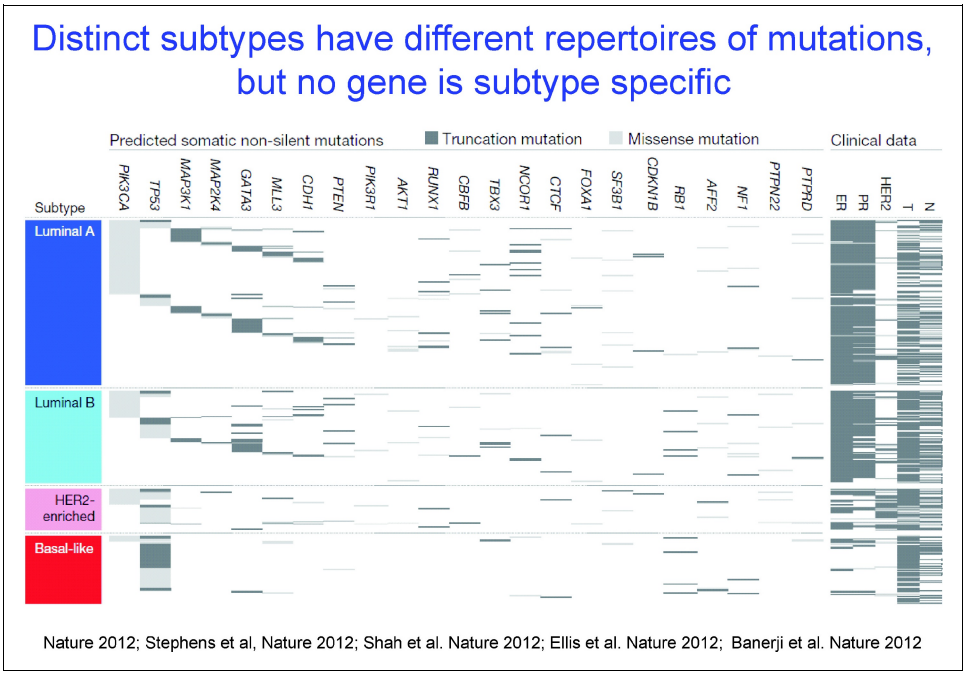

**Cuadro 8**

qué pasa si miramos el repertorio de mutaciones de 101 tumores para ver si hay dos que tengan la mutación exactamente en el mismo gen. Temo decir que no hubo dos que tuvieran exactamente la misma mutación en el repertorio; entonces, cada cáncer es distinto, pero no todo está mal. En realidad, ahora que tenemos más de 700 tumores hechos con este análisis, emergen patrones. De acuerdo con los tipos, la constelación de las mutaciones de los tumores globales parece tener correlación con los subtipos. Pero lamento decir que tenemos un problema. No hay ninguna mutación actualmente recurrente que defina de por sí un subtipo molecular, aunque con las p53 muchas veces se forma cáncer luminal A y B, también se encuentra en otros tumores de tipo basal. Las p53 son muy prevalentes en los basales, pero también se encuentran en los luminal B y hasta en los luminal A.

En conclusión, el cáncer de mama tiene genoma complejo. Hay pocos genes mutados recurrentemente en forma importante. Gran número de genes que raramente están mutados. No hay un denominador común para cada subtipo.

Alguno de los nuevos conceptos que emergen con respecto a la heterogeneidad genética intratumoral; lamento decir que esto emergió de avances tecnológicos que ocurrieron en los últimos años, porque la secuenciación de la próxima generación a nosotros nos permite determinar si un gen está mutado, y además, un gen y el porcentaje de células tumorales dentro del tumor que tiene la mutación.

La imagen que surge es que los tumores están compuestos de mosaicos de células, que



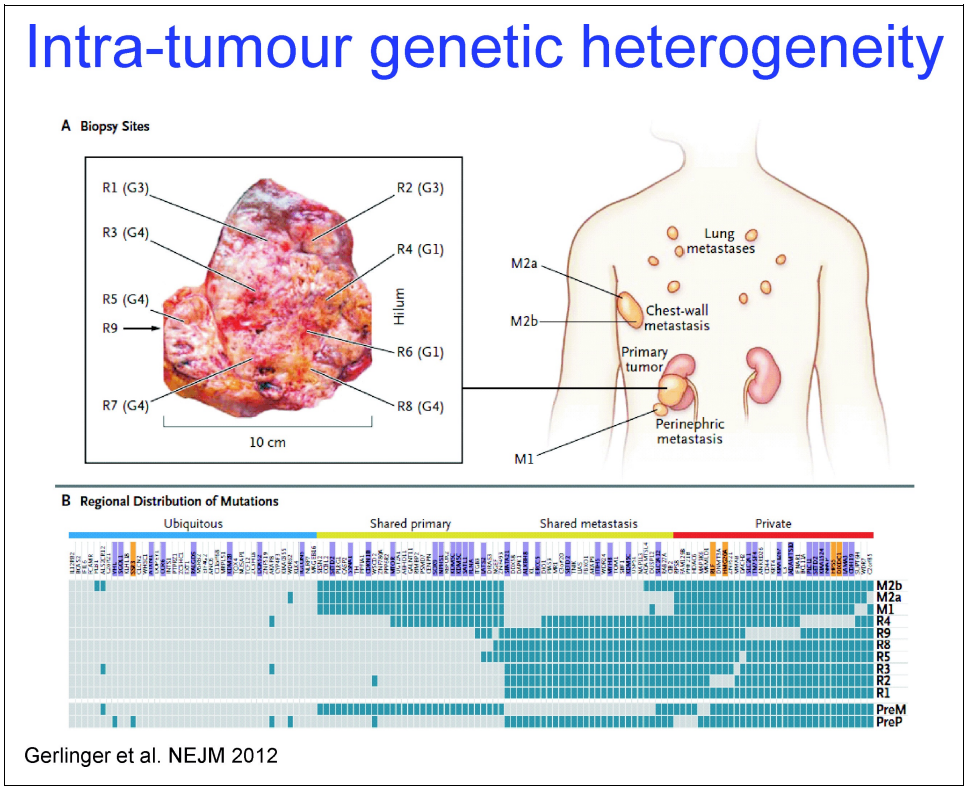

**Cuadro 9**

además de los eventos genéticos que están presentes en todos, hay clones que tienen mutaciones privadas propias, que pueden de por sí mediar alguno de los fenómenos biológicos, que nos han intrigado tantos años; es decir, la resistencia en la terapia y el desarrollo de metástasis.

El mejor ejemplo de la heterogeneidad intratumoral, no viene del cáncer de mama, sino del riñón, en el estudio publicado por un grupo. Lo que hizo ese grupo fue operar cáncer de riñón obteniendo diferentes sectores y también tres metástasis. Extrajeron el ADN de cada fragmento e hicieron secuenciación de todos los genes codificadores de proteínas. Los resultados están en la parte inferior (Cuadro 10). Cada columna es un gen y cada renglón es una muestra. (R: recepción; M: metástasis). En gris mutaciones y en azul genes silvestres. Se puede observar que algunas mutaciones estaban presentes en todas las muestras de la pieza de recepción de las metástasis, otras se restringían al primario, otras se restringían a las metástasis, y hay mutaciones que sólo estaban presentes en un fragmento, sea del primario o las metástasis. Estos resultados plantean desafíos intelectuales importantes. Primero, si una sola biopsia de un tumor es suficiente para determinar el repertorio de mutaciones de este cáncer. Segundo, cuando estamos desarrollando y variando biomarcadores, ¿qué muestras usamos?, del primario, de las metástasis o celdas circulantes y ADN del plasma. No tenemos respuestas a estas preguntas por ahora, pero el responderlas es fundamental para nuestra capacidad de poder usar medicina de precisión.

Los detractores del concepto de heterogeneidad intratumoral afirman que si bien hay mucha heterogeneidad, en realidad no importa, porque en las mutaciones que nos interesan, los conductores de la enfermedad son troncales y están presentes en el tronco del árbol; y por lo tanto, van a estar presentes en todas las células tumorales. Lamento tener que decir que difiero con este concepto.

Por ejemplo, HER2 positivo es uno de los conductores del cáncer de mama, es amplificado en el 15% de todos los cánceres. De acuerdo a




**Cuadro 10**

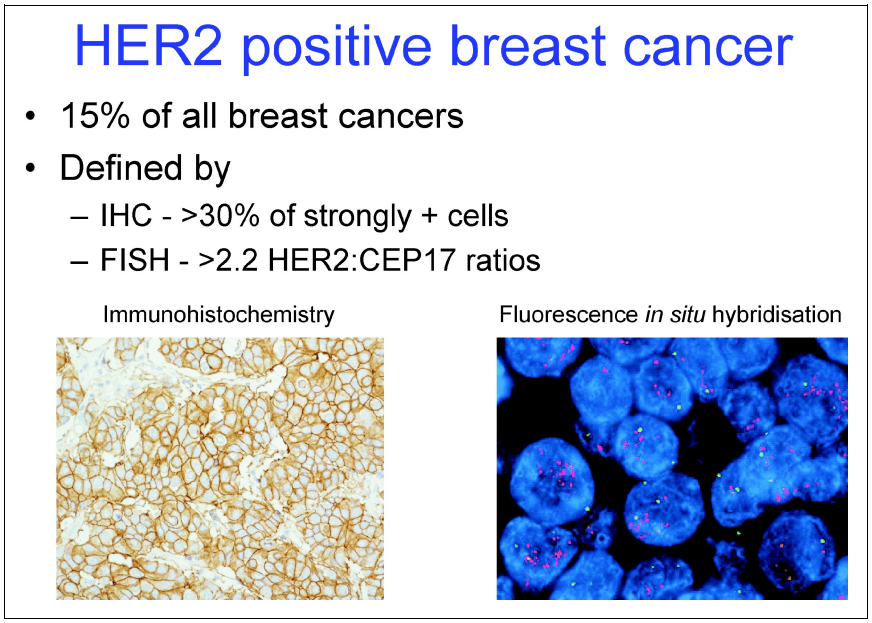
la guía de ASCO, se define como amplificado si hay más del 30% de células altamente positivas. En Fish la relación entre HER2 y CEP17 mayor de 2,2 (Cuadro 11).

Usamos esta definición de inmunohistoquímica y Fish en el 2% al 3% de tumores HER2 positivos con esta definición. En este patrón 50% de las células son positivas y tienen amplificación y el otro 50% es negativo y no tiene amplificación de HER2.

Junto con Salomon de París, hemos revisado 1.000 cánceres HER2 positivos e identificamos 41 tumores que mostraban exactamente ese patrón. En 12 tumores se pudo hacer la microdisección y extrajimos ADN de ambas partes, hicimos toda la secuenciación y validamos los resultados con estos métodos. Lo primero que planteamos fue, ¿habría algo equivalente a HER2 que también esté amplificado en el componente HER2 negativo de estos 12 tumores?

La respuesta es no, contundente. La única diferencia entre el HER2 negativo y positivo, los componentes de estos tumores heterogéneos, era la amplificación de HER2. Entonces, no encontramos algo que fuera recurrente que pudiera compensar por esa falta de amplificación de HER2.

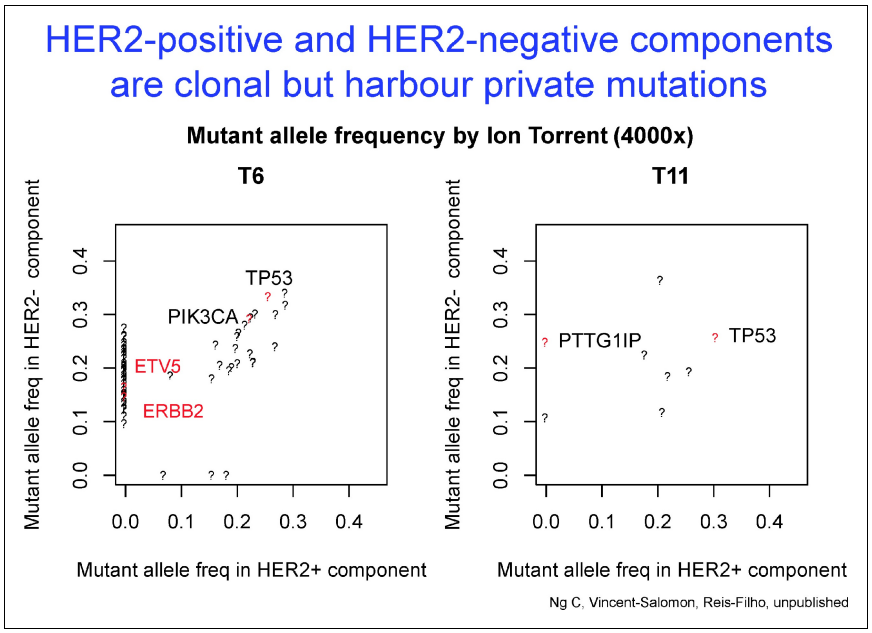
Pero al hacer la secuenciación de los tumores algo realmente importante emerge. El Cuadro 12 muestra los resultados de la secuenciación de dos de los 12 tumores, T6 y T11. Se observan mutaciones presentes en el tumor T6 y se graficaron las células que tienen una cierta mutación en el comportamiento HER2 positivo en el eje de las X y la frecuencia de las células que tienen una cierta mutación en el componente HER2 negativo en el eje de las Y. Como se puede observar hay mutaciones comunes entre los componentes positivo y negativo, incluyendo p53 y PIK3CA. Pero hay otros restringidos al




**Cuadro 11**

componente HER2 positivo y otras mutaciones restringidas al componente HER2 negativo, en uno de los genes que estaba mutado en el componente HER2 negativo era ERBB2.

La mutación que encontramos ha sido descripta en un trabajo recientemente publicado. Es una mutación que está en el dominio de la quinasa, es una inactivación de la vía, y en general




**Cuadro 12**

se encuentra en tumores HER2 negativo porque no está sobreexpresada, es un conductor. Lo que estamos haciendo es una secuenciación de todos los componentes HER2 negativos con patrones heterogéneos para determinar si tienen mutaciones HER2 y también estamos validando estos resultados funcionalmente. Una de las observaciones sumamente interesantes es que todos los casos que tienen heterogeneidad fueran HER2 negativos o positivos. Quizás HER2 es un conductor leve, pero en este caso los dos componentes, el amplificado y el no amplificado, probablemente sean impulsados por HER2 mismo. Pero la manera en que lo encontramos es distinta. El HER2 positivo con un anticuerpo contra el HER2, mientras que el HER2 negativo probablemente va a necesitar un inhibidor irreversible al HER2.

En conclusión, espero haberles demostrado que el cáncer de mama está compuesto de un mosaico de células tumorales. Que hasta las mutaciones pueden ser con una distribución heterogénea. Estos temas nos generan grandes desafíos, pero grandes oportunidades para la clasificación tumoral y predicción terapéutica.

Los mensajes son, que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea en cuanto a su histopatología, los perfiles moleculares. Los repertorios de mutaciones varían aun entre los diferentes subtipos y que cada tumor es genéticamente heterogéneo. Muchos dicen que aunque esta tecnología todavía no nos ha ayudado a cambiar la manera de tratar el cáncer; quizás no todavía, pero diría que la introducción de nuevas tecnologías ha cambiado el paradigma de cómo vemos el cáncer. En la década del noventa lo veíamos como una enfermedad con variación de pronóstico y respuesta a la terapia. Con la introducción de *microarrays* comenzamos a ver al cáncer de mama como heterogéneo con muchos subtipos, cada tumor distinto y en el 2013 ahora con la introducción de nueva secuenciación en nuestra posibilidad de ver la composición de cada tumor en detalle, vemos que cada tumor está compuesto de múltiples clones y cada paciente puede tener múltiples enfermedades. Los nihilistas dirán que es imposible, esto es una locura, un caos, no es posible la medicina de precisión. Yo diría lo contrario, diría que aprovechar esta información nos va a dar la primera oportunidad en la historia de divisar terapias combinadas basadas en la biología y no en empirismo o en el perfil de toxicidad. El futuro es brillante, sólo es cuestión de tener la mente abierta y no tenerle miedo a la nueva tecnología. Muchas gracias por su atención.