

## TIPOS HISTOLÓGICOS ESPECIALES DE CÁNCER DE MAMA MÁS QUE IMÁGENES BONITAS

Jorge S. Reis-Filho \*

Es un placer estar aquí nuevamente para conversar con ustedes de algo que es muy atractivo para los patólogos. Vamos a hablar de tipos histológicos especiales de cáncer de mama. Este tema es más para los patólogos fanáticos, porque es sobre tipos histológicos especiales de cáncer de mama, algo que ha sido omitido por mucho tiempo, y nos olvidamos que lo sabíamos. Estos tipos histológicos especiales son más que fotos bonitas o imágenes lindas.

Quisiera hablar con ustedes del concepto de la heterogeneidad del cáncer de mama y de la perspectiva de los tipos histológicos especiales. Hay dos aspectos de tipos especiales. Primero, el perfilado transcriptómico y las correlaciones con subtipos moleculares especiales y tipos histológicos. Segundo, la correlación fenotipo-genotipo que emerge de nuestros estudios de tipos histológicos especiales de cáncer de mama y si alguno de estos tipos histológicos especiales podrían ser entidades moleculares diferentes.

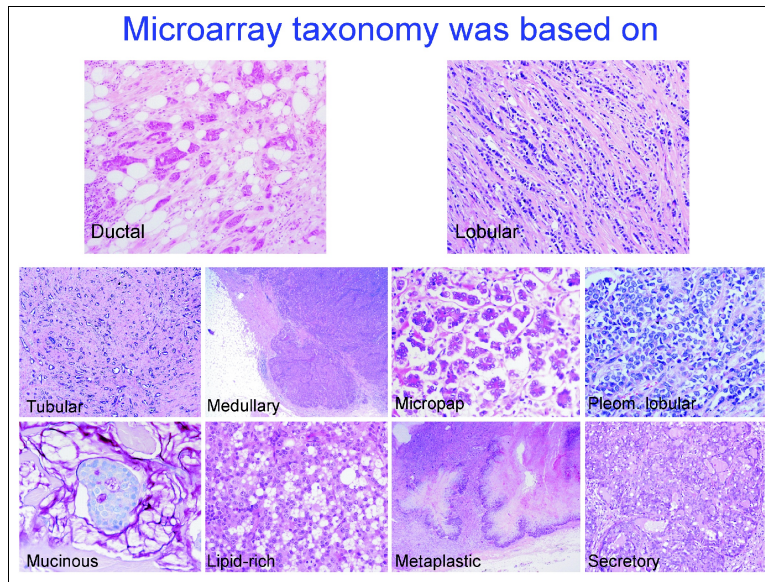
El perfil dado de expresión genética ha cambiado todo el panorama, en el sentido de nuestra comprensión de cáncer de mama, vemos que los RE positivos y los RE negativos son cánceres completamente diferentes, por lo menos a nivel transcriptómico. También se ha demostrado que dentro de los grupos RE positivos y negativos hay subtipos moleculares y los términos luminal A, luminal B, *basal-like*, HER2, han sido incorporados en nuestro léxico. Aunque este sistema de clasificación sin ninguna duda ha cambiado la forma en que percibimos la enfermedad, es improbable que haya capturado la heterogeneidad del cáncer.

Esta clasificación molecular sólo se basa en el análisis de carcinomas ductales y lobulillares, aunque éstos representan básicamente el 75-80% de todos los cánceres de mama invasivos, de ninguna manera cuentan la historia completa (Cuadro 1).

Aunque hay 19 tipos histológicos especiales que no solamente tienen distintos rasgos histológicos, sino que lo que está emergiendo es que estos tipos tienen distinto comportamiento o conducta biológica y, además, tienen diferentes características biológicas. ¿Cuáles son estos tipos histológicos especiales? Son entidades reconocidas por la clasificación de la WHO y representan entre el 20-25% de todos los carcinomas de mama. En los últimos años hay varias líneas de evidencia que sugieren que tienen implicaciones clínicas importantes. Por ejemplo, hay varios estudios que han demostrado ya que los carcinomas tubulares o cribiformes, aunque comparados con luminal A y B solamente y otros subtipos, tienen mejor pronóstico. Eso proviene de uno de los estudios del Dr. Viale y además un estudio de Nottingham, que ha demostrado que sobre 100 carcinomas tubulares, seguidos más 15 años, no hubo ni una metástasis a distancia causada por esos primarios, aun para los tumores con tipos histológicos especiales que no difieren, por ejemplo, de los ductales. Los lobulillares y los ductales tienen pronóstico similar, pero pueden, sin embargo, diferir en cómo se diseminan a otros sitios anatómicos. Por ejemplo, los lobulillares muchas veces se van al tubo digestivo, a órganos ginecológicos y meninges; entonces, en cuanto a su significado clínico hay ca-

---

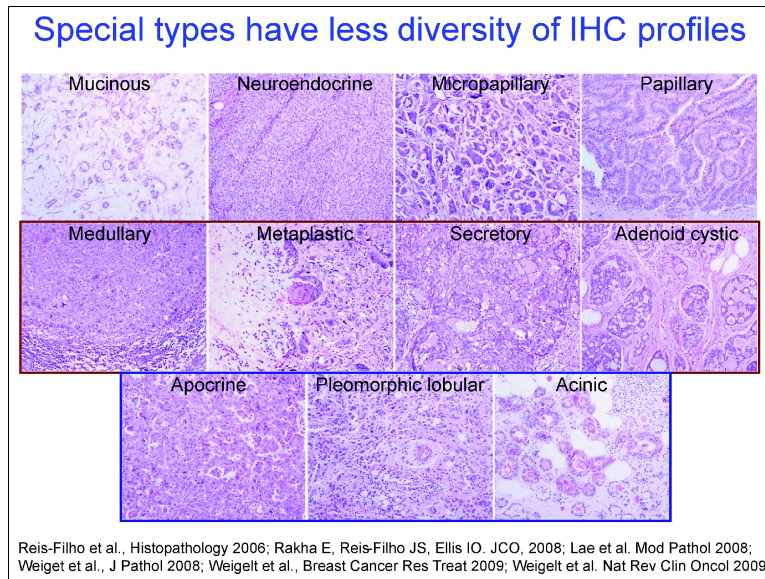
\* Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.

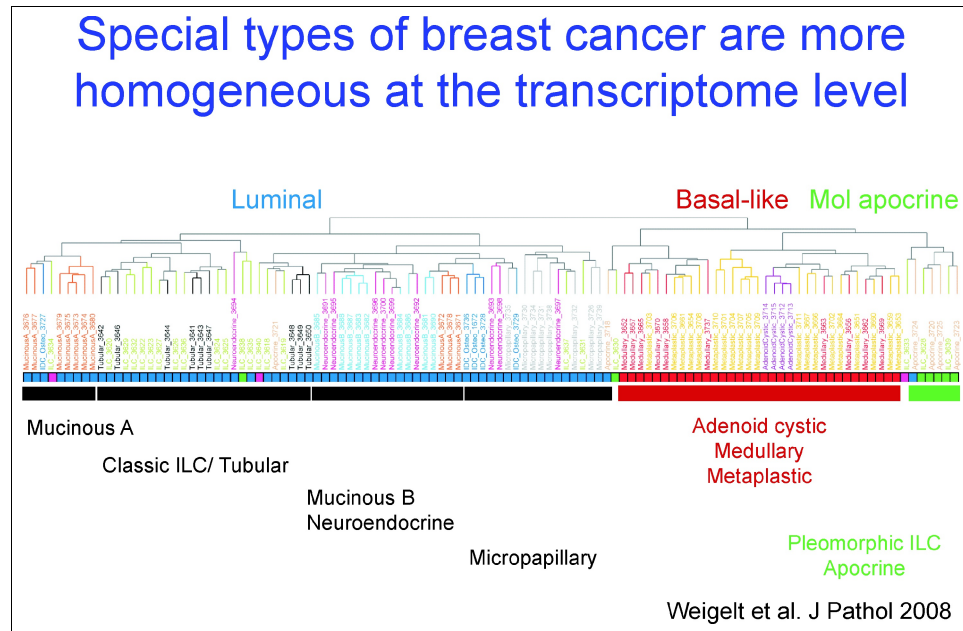


racterísticas emergiendo. Lo que quiero recalcar es que es probable que tengan características biológicas diferentes.

Dos preguntas que quiero plantear. Primero, si los tipos histológicos especiales de cáncer de mama tienen fenotipos moleculares diferentes; por ejemplo, si en carcinomas ductales si hace-

mos perfilado, siempre caen en 4 a 5 subtipos, luminal A, luminal B, *basal-like*, HER2, ¿es eso lo mismo para los tipos histológicos especiales? Segundo, si los tipos histológicos especiales de cáncer de mama constituyen entidades moleculares completamente distintas, por ejemplo, de los ductales.





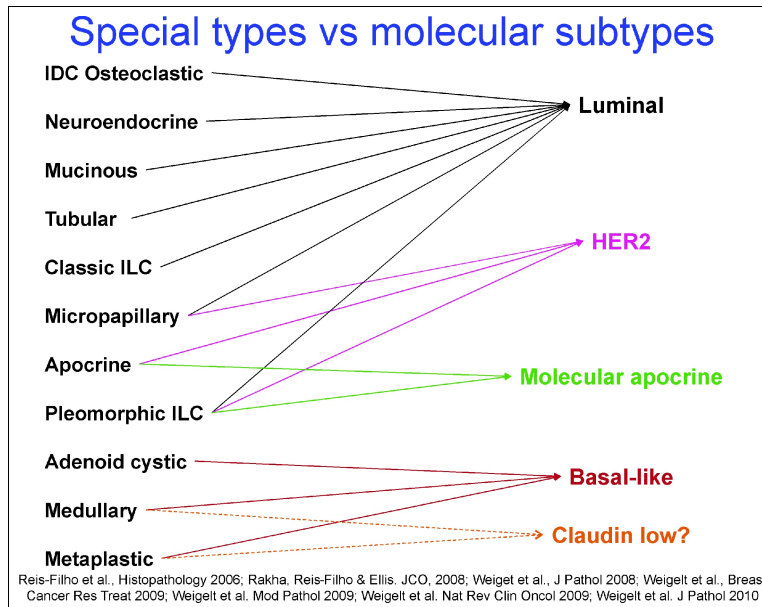
Cuadro 3

Pasando a la primera pregunta. Básicamente, lo que estoy planteando es si estos tipos especiales tienen subtipos moleculares diferentes y van a ser más homogéneos que los ductales o menos homogéneos. Durante muchos años, dado que los *microarrays* no se podían usar con ARN obtenido de tejidos incluidos en parafina, era bastante difícil determinar si iban a tener subtipos moleculares diferentes. Varios grupos, incluyendo el nuestro, han utilizado marcadores sustitutos para tratar de definir los subtipos. Lo que emergió es algo muy interesante, resumido en el Cuadro 2. Básicamente, algunos tipos especiales, siempre en forma uniforme, muestran patrones inmunohistoquímicos iguales. Así por ejemplo, la primera línea, mucinoso, neuroendocrino, micropapilar y papilar, son siempre RE positivo. Más del 95% tienen expresión de RE, nunca expresan marcadores basales y rara vez expresan HER2. Aproximadamente 5-10% los micropapilares y pueden ser amplificadas, pero en general esos tumores son RE positivos. El medular, metaplásico, secretor y quístico adenóide, son triple negativo, RE negativo, RP negativo, siempre más del 90%, y expresan mar-

cadore basales, citoqueratina 5, citoqueratina 17, BR. El último renglón, con frecuencia son fenotipo triple negativo, pero si los tienen con marcadores basales nunca los expresan o muy rara vez. Entonces, éstos son triple negativo, pero no son *basal-like*. En general, con perfil dado de expresión genética tienen una clasificación apocrina.

Aunque toda esta información estaba emergiendo sobre estas correlaciones entre los subtipos, en realidad el primer estudio para investigar la pregunta de si los subtipos se correlacionan con subtipos específicos, fue abordada por el estudio de Weigelt en Nueva York y cuando estaba trabajando en Ámsterdam. Analizaron 113 cánceres invasores de 11 tipos histológicos especiales e hicieron un *arrays* de expresión genética usando 22 marcadores.

El Cuadro 3 muestra la imagen que emergió y que cambió el paisaje por completo. Básicamente, han demostrado que estos tipos especiales de cáncer de mama son más homogéneos a nivel molecular, que los carcinomas ductales que no son de tipo especial. En primer lugar, lo que observaron es que los tumores de cada uno de



Cuadro 4

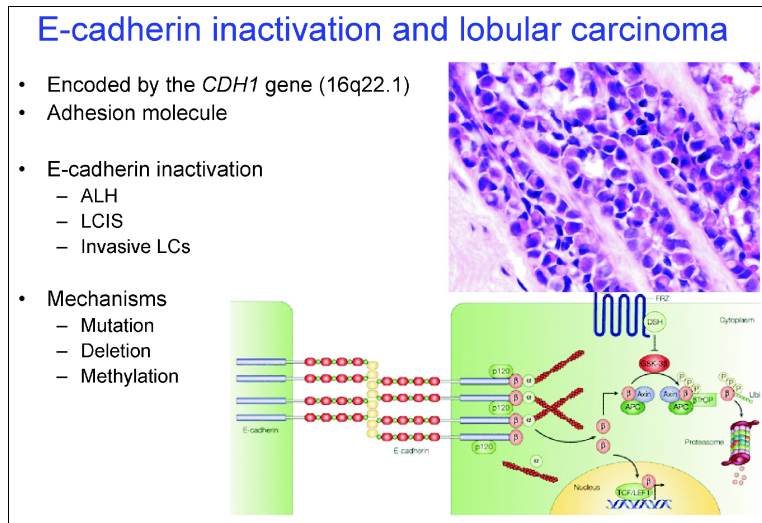
los tipos histológicos especiales, preferencialmente se acumulan de acuerdo con la expresión genética. Segundo, los tumores de cada subtipo uniformemente van a ser de un subtipo molecular. El mucinoso A; el clásico y el tubular, están agrupados juntos. El mucinoso B, neuroendocrino, nuevamente también, son todos luminales; el micropapilar también. Ahora bien, los adenoides quísticos, medulares y metaplásicos se agrupan y están dentro del subtipo basal. Los apocriños y los lobulillares pleomórficos, que son tumores que con frecuencia muestran diferenciación apocrina, tenían el subtipo apocrino molecular. Entonces, esto que anticipamos en los carcinomas ductales no se ve en estos tipos especiales, sólo son un subtipo y preferencialmente se acumulan, lo cual implica que son más homogéneos.

Después de estudios de varios grupos, incluido el nuestro, investigaron muchos de estos subtipos especiales y surgió lo que muestra el Cuadro 4. Algunos subtipos siempre son de tipo luminal, que de acuerdo con *microarray*, son los osteoclasticos de células gigantes, los neuroen-

docrinos, los mucinosos, los tubulares y los lobulillares clásicos; mientras que los adenoides quísticos, los medulares y los metaplásicos son preferencialmente de tipo basal. Pero hay tipos especiales de cáncer que pueden tener más de un subtipo molecular; por ejemplo, los micropapilares son preferencialmente luminal pero algunos son HER2+. Los apocriños son preferencialmente moleculares apocriños, pero también pueden ser HER2+. Los pleomórficos lobulillares son quizás los más diversos; rara vez son luminales, más frecuentemente moleculares apocriños y a veces HER2. Con la identificación del tipo *claudin low* hay un pequeño subgrupo y los metaplásicos fusiformes pueden clasificarse como *claudin low*.

Como conclusión, espero haberles demostrado que a nivel de inmunohistoquímica y expresión genética cada tipo especial de cáncer de mama es más homogéneo que lo que esperaríamos de los ductales. Que hay subtipos del fenotipo luminal que son tubulares, lobulillares clásicos, neuroendocrinos y mucinosos. Del fenotipo basal, que son medulares, metaplásicos y



**Cuadro 5**

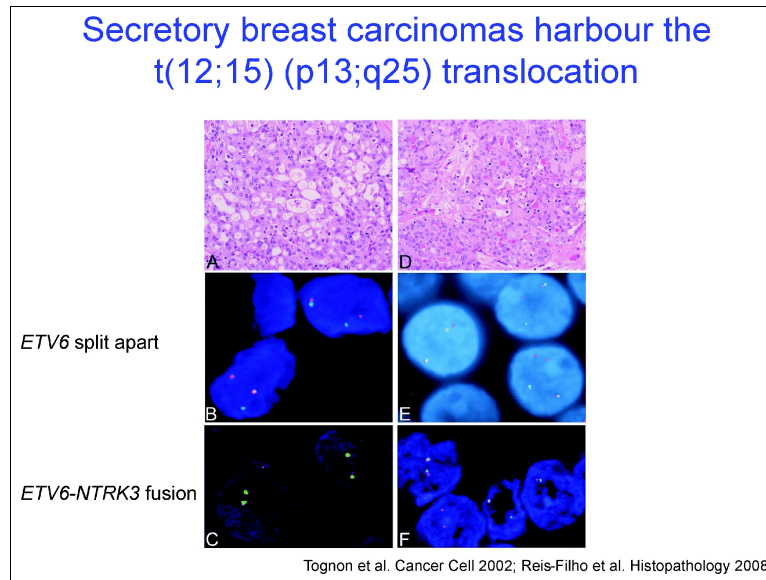
adenoides quísticos. Hay otros subtipo apocrino molecular, que son los apocrinos y los lobulillares pleomórficos.

Pasando a la segunda parte sobre tipos especiales, el interrogante es si se trata realmente de entidades moleculares completamente diferentes o son simplemente imágenes bonitas para mostrar en una conferencia como ésta. Si yo hubiera tenido que dar esta charla hace un tiempo, me hubiera estado rascando la cabeza para mostrarles ejemplos, pero hoy, en el 2013, tengo muchísimos ejemplos para comprobar que la respuesta a la pregunta es afirmativa.

El primer ejemplo que puedo compartir con ustedes es el carcinoma lobulillar, que tiene una correlación genotípica en el cáncer de mama (Cuadro 5). Siempre ha demostrado ser impulsado por pérdida de la expresión de la cadherina. La cadherina es una proteína codificada por el gen *CDH1*. Por ejemplo, para que se unan las células requieren una vía de cadena de cadherina intacta, es el complejo. Entonces, la pérdida de cadherina se pensaba que es la causa de esa falta de cohesión que se ve en los lobulillares. Por ejemplo, de una hiperplasia va a todo el mecanismo y lo que produce la pérdida de cadherina pueden ser mutaciones, metilación o delección. La disociación entre el lobulillar y la inac-

tivación de la cadherina se sabía, pero cada vez que conversamos esto con los biólogos nos dicen que esto es sólo una asociación, no se ha probado que la pérdida de cadherina produzca los carcinomas lobulillares, en particular porque las mutaciones germinales causan cáncer gástrico de anillo de sello, pero rara vez lobulillares.

Este tema fue abordado en el 2006 y se desarrolló en un modelo murino. Se usaron métodos muy elegantes para inactivar p53 y cadherina en las glándulas mamarias del ratón y en un subgrupo de células progenitoras luminales. Inactivaron cadherina y p53 y básicamente todos estos animales desarrollaron tumores. Esos tumores eran células aisladas, sueltas, sin cohesión, con características histológicas típicas del carcinoma lobulillar humano. Pero, en realidad, aunque había inactivación de p53, estos tumores eran más parecidos a los pleomórficos que a los clásicos lobulillares. Lo que es interesante es que no solamente las características histológicas de tumores eran igual que las de los lobulillares, sino además su patrón de metástasis. Los tumores que desarrollaron estos animales, hicieron metástasis al tubo digestivo, a los órganos genitales y superficies serosas. Recapitulando, las características cardinales del carcinoma lobulillar en humanos mostraron evidencia directa de que

**Cuadro 6**

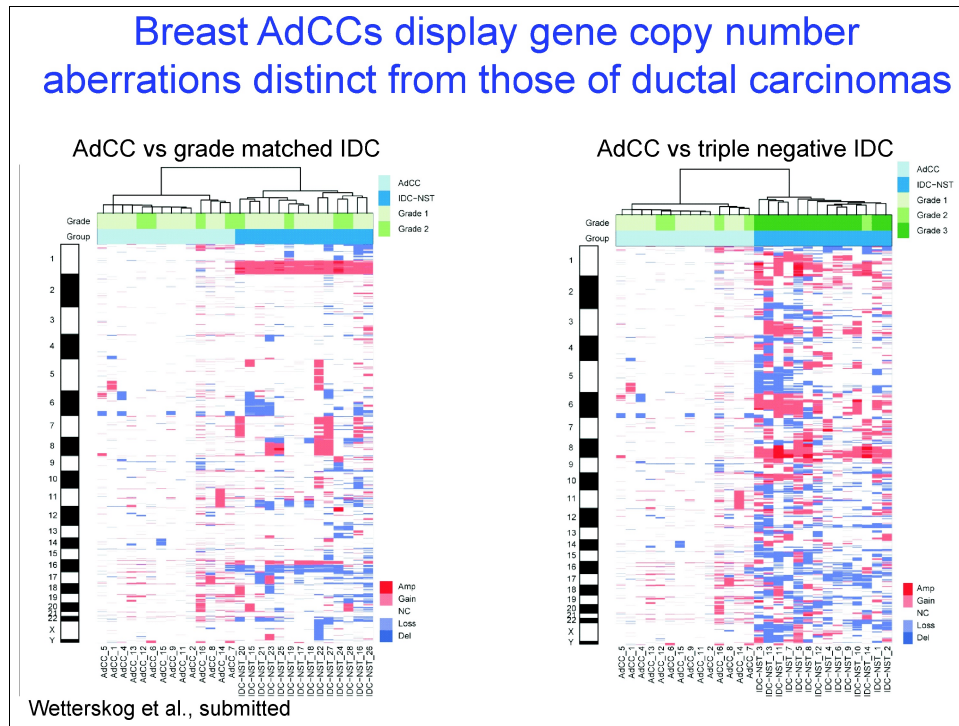
la pérdida de cadherina produce la formación de tumores con fenotipo lobulillar; una correlación feno y genotípica.

Se han hecho estudios de carcinomas lobulillares comparados con los ductales, para tratar de entender cuál es la característica molecular de estos carcinomas lobulillares. Los hicimos coincidir con grado, receptor de estrógeno y subtipo molecular. Todo lo que sabemos tiene influencia en la expresión genética, los equiparamos y nos preguntamos cuál es la diferencia entre el ductal y el lobulillar, qué es lo que marca la diferencia. Lo primero que hicimos fue preguntarnos, ¿qué genes son distintos de los que se expresan en lobulillar y ductal? Una vez que lo obtuvimos las vías principales desreguladas se relacionan con el esqueleto, con la señalización de célula a célula, con la interacción y el ensamblaje celular. O sea, que los lobulillares son caracterizados por la pérdida de función de la e-cadherina.

Hablemos ahora de otro tipo de tumores que podrían demostrar correlaciones fenotípicas y genotípicas. En el Cuadro 6 se puede observar los carcinomas secretores de la mama o productores, que son muy raros, menos del 1% de todos los cánceres de mama. Son el único subtipo

que afecta a las pacientes prepúberes. Tienen un curso clínico indolente y son bastantes intrigantes, porque por inmunohistoquímica son fenotipo triple negativo y por el perfil de expresión genética son tipo basal. Esos tumores en el año 2002 demostraron tener una translocación cromosómica que compromete ETV6 y el NTRK3 que es un gen de fusión oncogénico. Varios grupos investigaron más de 1.500 cánceres de mama invasivos y los únicos tumores que tienen este gen de fusión fueron los carcinomas secretores de mama, un ejemplo más de una correlación feno y genotípica.

Más aún, el carcinoma adenoides quístico puede afectar cabeza y cuello, glándulas salivales, próstata, mama, y en la mama son triple negativo. Tienen un curso clínico indolente; la expresión genética muestra un fenotipo *basal-like*. Hace unos años un grupo analizó cuatro de estos carcinomas adenoides quísticos y demostró que alojan translocaciones cromosómicas del cromosoma 6 y 9, que resultan en la formación de un gen de fusión también, se llama MYB-NFIB. El mecanismo de acción de este gen de fusión no es conocido, lo único que sabemos es que este gen de fusión produce una regulación



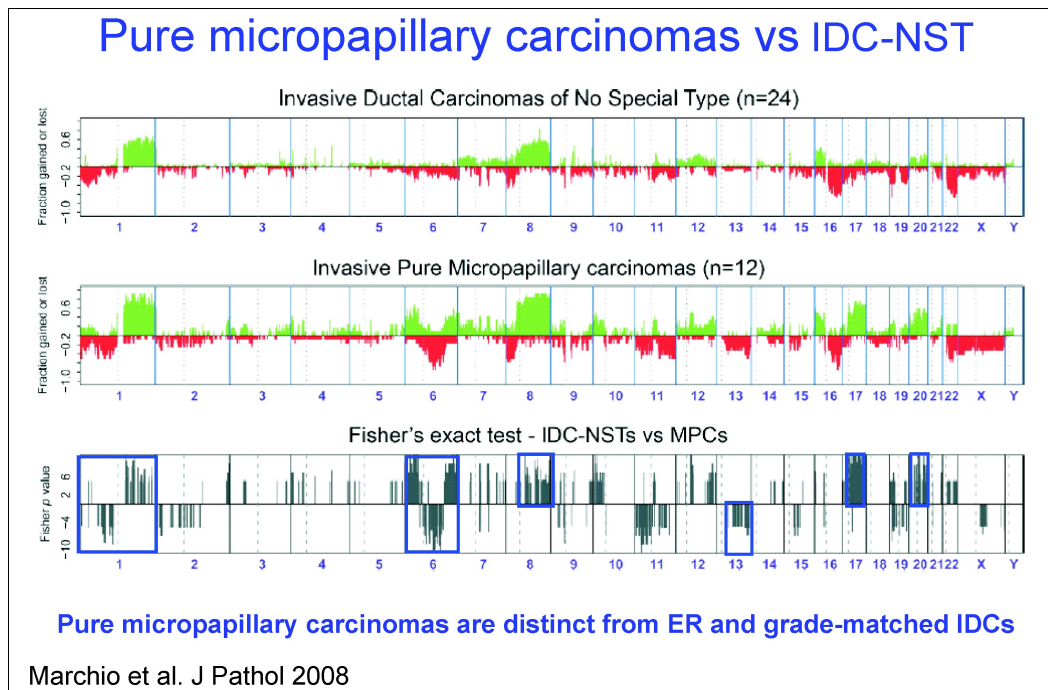
Cuadro 7

mayor del MYB que es un protooncogén que se expresa fuertemente en los tumores triple negativo. La expresión de MYB es rara pero en los carcinomas adenoides quísticos es muy alta.

Dado que se estudiaron sólo 4 casos, decidimos investigar carcinomas adenoides quísticos revisados por tres patólogos. Sólo 13 casos eran carcinomas adenoides quísticos. Después nos preguntamos, ¿cuántos tenían ese gen de fusión MYB-NFIB? Doce de 13 casos lo tenían. Lo que es verdaderamente interesante es que al comparar el nivel de expresión de MYB entre los carcinomas adenoides quísticos con otros del mismo grado, ductales o de otro fenotipo, el nivel de expresión de MYB en los carcinomas adenoides quísticos era significativamente mayor que en otros invasores, y mucho mayor que los niveles que se encuentran en los triple negativos o basales invasores. Demostrando que una de las características de los carcinomas adenoides quísticos es la sobreexpresión del protooncogén MYB.

También nos preguntamos si tenían una constelación distinta de número de copias y pérdida de genes, comparando carcinomas ductales del mismo grado o carcinomas ductales triple negativo. Una representación esquemática se observa en el Cuadro 7. Las amplificaciones en rojo, las ganancias en rosa y las pérdidas en azul. Se puede ver que las de adenoides quísticos se agrupan en forma separada de los ductales en ambos casos y que tiene genomas muy simples con pocas aberraciones cromosómicas. La única recurrente que se encontró como aberración es la delección de 6Q, demostrando nuevamente que los carcinomas adenoides quísticos son una enfermedad totalmente diferente de los ductales del mismo grado o del mismo fenotipo. O sea, un ejemplo más de una correlación fenotípica y genotípica.

Esto ha llevado a que nosotros entendiéramos mejor que el espectro de las lesiones que se clasifican como *basal-like* o triple negativo, es mucho más amplio de lo que pensábamos. La



Cuadro 8

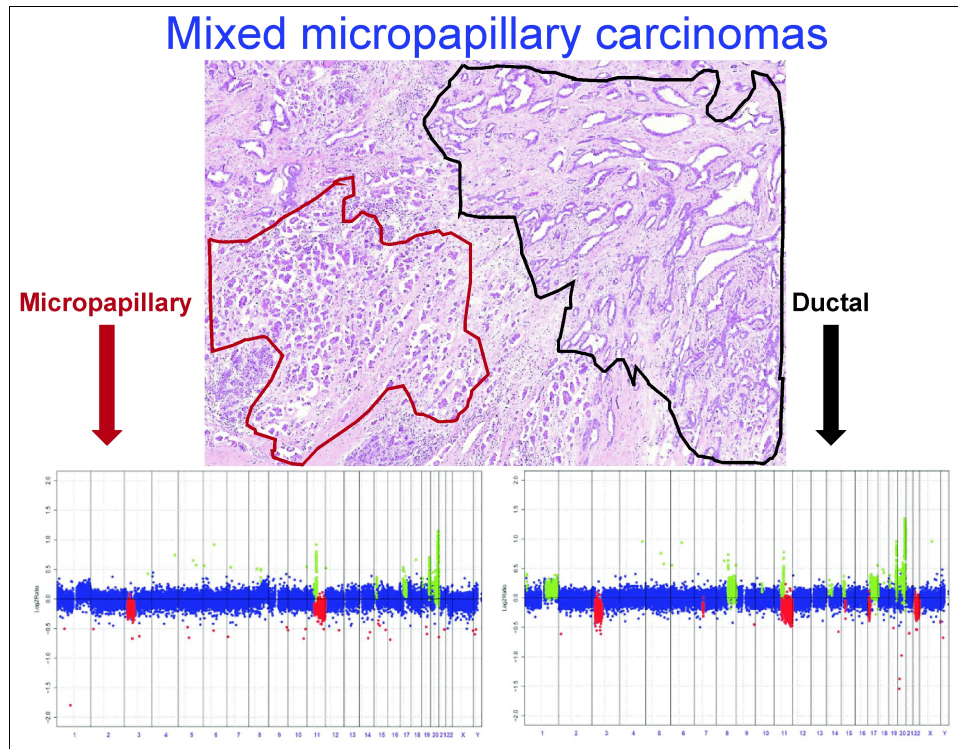
identificación de estos dos tumores de bajo grado y que tienen fenotipo basal y triple negativo, ha ampliado el espectro y ahora reconocemos que bajo el tipo basal y triple negativo tenemos un grupo y dos entidades, el secretor y el adenóide quístico, que son basales y que tienen un curso clínico indolente. Están caracterizados por translocaciones cromosómicas. Estamos haciendo la secuenciación del ARN de todos los tumores de bajo grado que tienen fenotipo triple negativo para ver si hay otros subtipos impulsados por genes de fusión. Basta decir que la mayoría de estos tumores son de alto grado, grado III, ductales, invasores, pero la mayoría de los medulares y metaplásicos son triple negativos y los apocrinos, con mucha frecuencia, también son de fenotipo triple negativo.

En los tumores que en realidad no tienen genes de fusión o por lo menos no se ha demostrado que sean tan diferentes de los ductales, cómo nos arreglamos para hacer el análisis, para tratar de definir si constituyen entidades moleculares distintas, separadas de los otros. Nosotro

utilizamos un enfoque, todavía vigente con tecnología moderna. Básicamente los principios son que acumulamos ciertos tipos e hicimos todo el análisis. En el pasado hacíamos este tipo de análisis con hibridación genómica comparativa, pero ahora hacemos *next-generation sequencing* (NGS). Tratamos de encontrar las aberraciones que están enriquecidas en los tumores de este subtipo y después buscamos una serie mucho mayor de estos tumores, hicimos *microarray* tisular con una cohorte grande y luego hacemos la validación.

Usando esta metodología científica decidimos investigar si los micropapilares de la mama constituyen una entidad separada. Esto fue hecho por una *fellow* italiana increíble, que estaba muy motivada y que decidió abordar esta pregunta tan complicada, porque los carcinomas micropapilares son raros (1% al 3% de todos y en los casos mixtos el 7%) y muestran un patrón de crecimiento "de adentro hacia afuera". En vez de mostrar polaridad hacia la luz, muestran polaridad hacia el estroma; o sea, un patrón in-





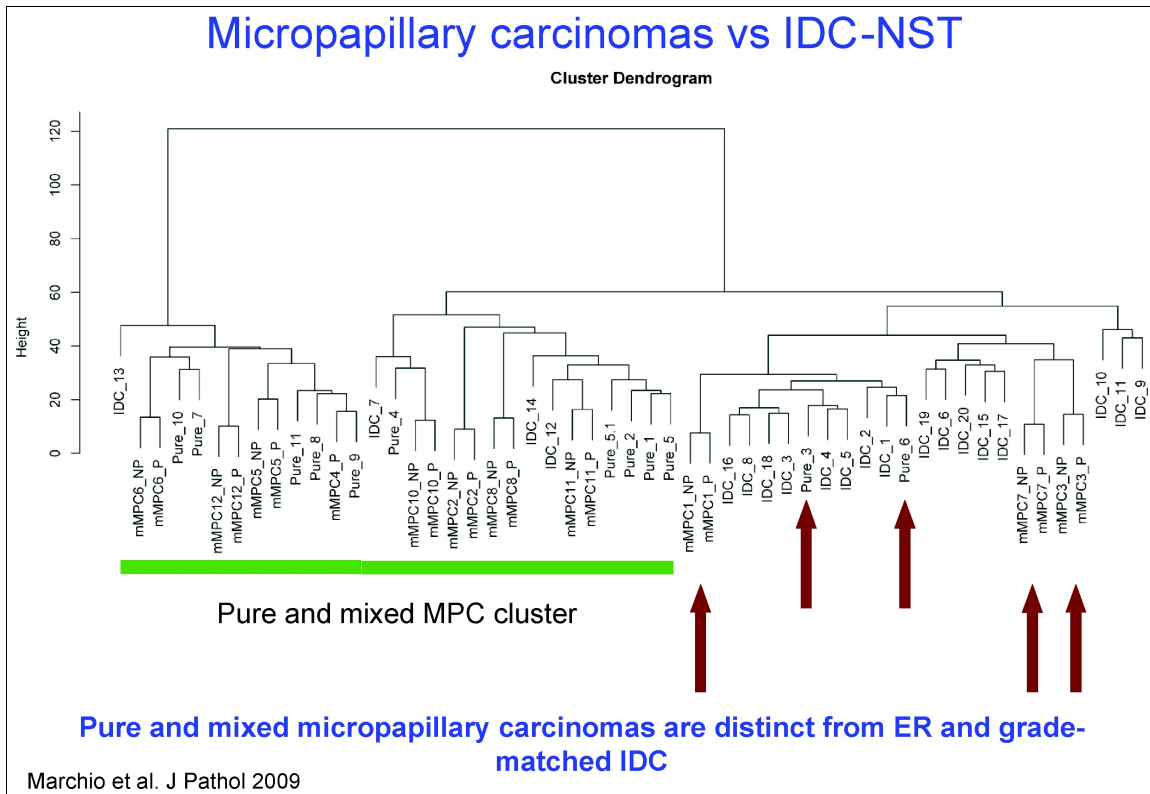
verso. Con frecuente asociación con metástasis, muchas veces son diagnosticados en estado muy avanzado y muchas veces están vinculados con un peor pronóstico. Se juntaron estos tumores y sólo se usaron los que eran realmente micropapilares puros. Se hizo el análisis y los resultados se observan en el Cuadro 8. Se puede observar la frecuencia de ganancias y pérdidas del mismo grado, el mismo subtipo molecular. Los cromosomas están representados en el eje X; la frecuencia de ganancias en verde y pérdidas en rojo. Al comparar la frecuencia de cambios en los micropilares con los ductales, se aprecia que hay varias regiones donde hay más ganancia o pérdida en los micropilares y la constelación de aberraciones genéticas nos permite separarlos totalmente de los ductales, sugiriendo que los micropilares puros son distintos de los RE y de los ductales. Una de las diferencias más importantes, es el hecho que la pérdida del 16Q era más frecuente en combinación con 1Q, co-

mo ganancia. Se puede ver que los trazados a ese nivel son muy diferentes.

Luego, se planteó la pregunta de los micropilares mixtos. El Cuadro 9 ilustra un buen ejemplo, con un área ductal y un área micropapilar. Se decidió hacer la microdissección e investigar si tenían cambios similares. Los resultados están resumidos en el cuadro del cromosoma 1 al X. Los dos componentes se ven abajo, en trazado, las mismas modificaciones, las mismas ganancias y pérdidas, pero no solamente por contaminación con estromas, sino que se veían casi idénticos. Al obtener toda una serie se hizo un análisis supervisado. Cada par de los componentes micropilares y no micropilares se agrupaban; quiere decir, que los micropilares y no micropilares de cada uno de los mixtos, eran casi idénticos a nivel genético.

Después se hizo algo más integrado, los puros, los mixtos, el componente ductal, el componente micropapilar, ¿cómo se organizan? Bas-





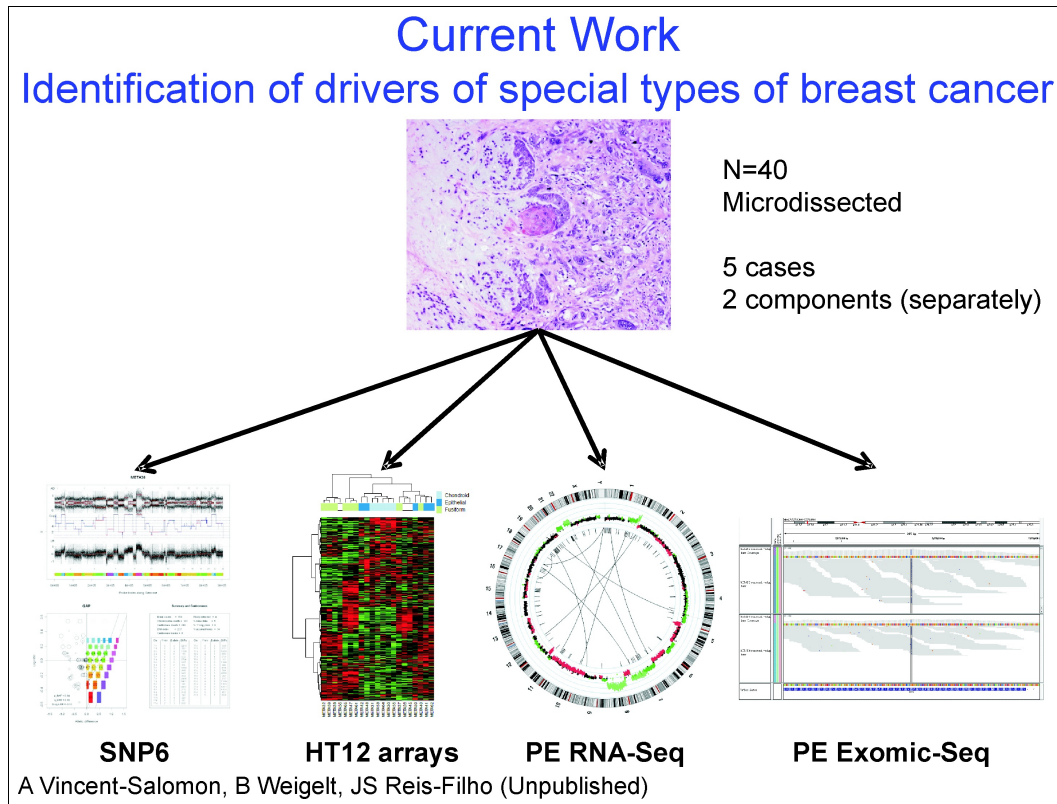
Cuadro 10

ta decir que los puros y los mixtos se agruparon juntos (Cuadro 10). Tenemos cinco ejemplos que no se agruparon, pero en total se ve que hay una diferencia estadísticamente significativa, sugiriendo que los carcinomas puros, micropapilares y mixtos, son distintos de los RE y de los ductales, y son mucho más parecidos entre sí.

Después se investigaron otros subtipos. Hay varios ejemplos de tipos histológicos especiales que constituyen entidades diferentes. Los carcinomas lobulillares clásicos y pleomórficos, distintos de los ductales. Los pleomórficos parecen ser una evolución de los clásicos, los lobulillares clásicos tienen más aberraciones genéticas. Los carcinomas mucinosos se demostró que son entidades discretas separadas. No estamos haciendo la secuenciación porque en realidad no tienen ninguna de las aberraciones genéticas que esperaríamos ver en cánceres de bajo grado RE. Son completamente diferentes y tenemos la corazo-

nada de que son impulsados por una constelación específica de mutaciones. Los carcinomas metaplásicos, en realidad, son diferentes totalmente. Parecen tener una vía BRCA1 más disfuncional, pero no responden a quimioterapia; entonces, no sabemos exactamente cuáles son las reglas básicas, pero una de las cosas que Bryan Hennessy demostró, es que estos tumores muchas veces tienen una expresión genética tipo transicional. ¿Qué significa?, no lo sabemos, pero estamos tratando de responder la pregunta.

Estudiando 40 carcinomas metaplásicos, estamos haciendo los perfiles genéticos. Todas las pruebas que se observan en el Cuadro 11 son para definir exactamente cuáles son los conductores de estos tumores raros y agresivos. Una cosa que les puedo adelantar es que estos tumores parecen ser uno de los subtipos de enfermedades triple negativas que muchas veces tienen mutación, entonces constituyen el subgrupo de



Cuadro 9

triple negativos impulsados por la vía PKI 3. Los resultados van a estar listos para enero-febrero del año que viene.

Espero haberles demostrado que hay tipos histológicos especiales que no sólo son imágenes bonitas, sino que además nos dicen mucho de la biología y son entidades más homogéneas. Tienen un número limitado de subtipos. En cada tipo tienen menos heterogeneidad transcriptó-

mica, estudiarlos constituye un medio para identificar nuevos impulsores de la enfermedad. Hay evidencia de correlación fenotípica y genotípica. Se presentaron tres ejemplos, las mutaciones CDH1, la translocación ETV6-NTRK3 y la translocación MYB-NFIB en los carcinomas adenoi- des quísticos. Se mostró el marco que estamos empleando para tratar de identificar qué hace que cada subtipo histológico sea un subtipo.