

SECCIÓN DOCENTE

## Factores pronósticos en el cáncer de mama: parte III. Factores moleculares

F. J. Andreu

*Servicio de Patología. UDIAT-Centre Diagnòstic. Corporació Parc Taulí. Sabadell, Barcelona*

**Palabras clave:** Cáncer de mama. Hibridación *in situ* cromogénica. Hibridación genómica comparada. Perfiles de expresión génica.

**Key words:** Breast cancer. Chromogenic *in situ* hybridization. Comparative genomic hybridization. Gene expression profiling.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama se considera actualmente una enfermedad genética compleja caracterizada por la acumulación de múltiples alteraciones moleculares. Como se ha comentado en artículos anteriores de esta serie, el manejo clínico de las pacientes con cáncer de mama se basa en una serie de aspectos clínicos y factores patológicos, tanto pronósticos como predictivos de respuesta, bien establecidos. No obstante, los factores convencionales parecen insuficientes a la hora de reflejar la heterogeneidad, tanto clínica como patológica del cáncer de mama. Esto es, a pesar de la fuerte asociación entre las variables clínico-patológicas evaluadas rutinariamente y el pronóstico, muchas pacientes que comparten estas variables pueden evolucionar y tener una respuesta a la terapéutica, diferentes. Por ello, y en pleno desarrollo de las terapéuticas individualizadas, sigue siendo necesario el avance en el estudio de factores pronósticos que ayuden a una mejor estratificación de las pacientes en diferentes grupos de riesgo y en la identificación de factores predictivos y dianas terapéuticas.

El manejo actual de estas pacientes debería tender a considerar por un lado aspectos de patología tradicional, estudios inmunohistoquímicos y estudios de patología molecular (hibridación *in situ*, hibridación genómica comparada –CGH- y perfiles de expresión, entre otros).

### HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La técnica de hibridación *in situ*, ya sea fluorescente (FISH) o con otros métodos de revelado (CISH, SISH) se considera el gold standard en la valoración de la amplificación del gen ERBB2 (HER2/neu) en el cáncer de mama. Si bien la valoración inicial del status del ERBB2 se hace en la mayoría de programas (aunque no en todos) mediante el estudio inmunohistoquímico de sobreexpresión de la proteína, este método en la práctica, dista bastante de ser óptimo. Según un estudio reciente del Grupo de Garantía de Calidad de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), analizando los resultados de IHQ para la determinación de ERBB2 en 125 centros nacionales, estos se pudieron considerar óptimos en no más del 70% de hospitales en el mejor de los casos. Estos datos han generado la iniciativa de edición de una guía de recomendaciones, por parte de SEAP y SEOM y con participación de miembros de la SESPM, con el fin de estandarizar los factores –tanto analíticos como preanalíticos– que condicionan de forma trascendental la fiabilidad de la determinación.

La técnica de hibridación *in situ* (FISH/CISH/SISH) valora –según se trate de kits que incluyen una única sonda locus específica para el gen ERBB2 o doble sonda para el gen y centromérica del CEN17– el número de señales de hibridación o la relación entre el número de copias del gen y de señales centroméricas.

Para FISH/CISH de doble sonda, se consideran los siguientes resultados: *no amplificado* (cociente ERBB2/CR17 < 1,8); *amplificado* (cociente > 2,2); *borderline* (entre

1,8 y 2,2). Para este último grupo se propone el conteaje de mayor número de células o una segunda evaluación independiente y la consideración de *borderline amplificado* para cocientes mayores o iguales a 2 y *borderline no amplificado* para cocientes inferiores a 2 en la nueva evaluación.

Para CISH con sonda única locus específica siguen utilizándose los criterios originalmente descritos por Tanner, en 2000 (1). Se considera *amplificación* cuando se observan > 10 señales de hibridación o agregados gruesos de señales en > 50% de células problema; *no amplificación*: entre 1-5 señales de hibridación en > 50% de células (entre 3 y 5 señales suele corresponder a polisomía para el cromosoma 17, aunque sin recomendarse su confirmación); *baja amplificación*: entre 6 y 10 señales de hibridación o agregados discretos de señales en > 50% de células. En estos últimos casos se recomienda una segunda determinación CISH con sonda centromérica CEN17. Se considera *baja amplificación* en casos disómicos (promedio de 2 señales CEN17/núcleo) y *no amplificación-polisomía* para los casos con 3 o más señales CEN17 por núcleo, de promedio.

Nuestro centro viene utilizando la técnica de CISH con sonda única locus específica desde el año 2003, indicando su determinación para todos aquellos casos en que el estudio de sobreexpresión proteica de ERBB2 es dudoso o positivo (2). En concreto en estos últimos tres años, de un total de 705 cánceres infiltrantes de mama, sólo el 12,6% de cánceres de mama mostraron sobreexpresión de ERBB2. El porcentaje de casos dudosos con IHQ que resultaron finalmente amplificados fue del 6,1%. Así, un 14% de pacientes eran inicialmente tributarias de tratamiento con trastuzumab.

Independientemente del valor fundamental de la determinación de la sobreexpresión y amplificación de ERBB2 como predictivo de respuesta a trastuzumab, estos estudios ayudan al patólogo en la evaluación de la heterogeneidad tumoral y en las alteraciones de lesiones precursoras, sobre todo con observación de los resultados con métodos de revelado no fluorescente (CISH/SISH) (Figs. 1-3).

### HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (CGH)

La técnica de CGH ha hecho posible mejorar el conocimiento sobre las aberraciones genéticas en tumores sólidos. En la literatura se recogen experiencias que identifican una asociación entre alteraciones genéticas detectadas con CGH y grado tumoral, grado histológico, metástasis y supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Además, se ha demostrado la capacidad de la técnica para determinar el posible valor pronóstico de alteraciones cromosómicas específicas (por ejemplo, amplificación de 20q13) y su relación con mayor índice de recurrencias en pacientes con alto riesgo de padecer cáncer de mama.

Isola y cols. (3) definieron tres grupos diferentes de cáncer de mama según el patrón de desequilibrios cromosómicos determinados mediante CGH: grupo A (1q+, 16p+, 16q-) relacionado a receptores hormonales positivos y una supervivencia a los 5 años del 96%; grupo B (11q+, 20q+, 17q+, 13q-) y grupo C (8p-, 8q+) con una supervivencia a los 5 años del 80 y 56%, respectivamente. Por otro lado, diversos estudios han observado amplificaciones que no coincidían con los loci de oncogenes clásicos en cáncer de mama (1q32, 17q23-q25, 5p) y cuya importancia como factores pronóstico está aún por determinar.

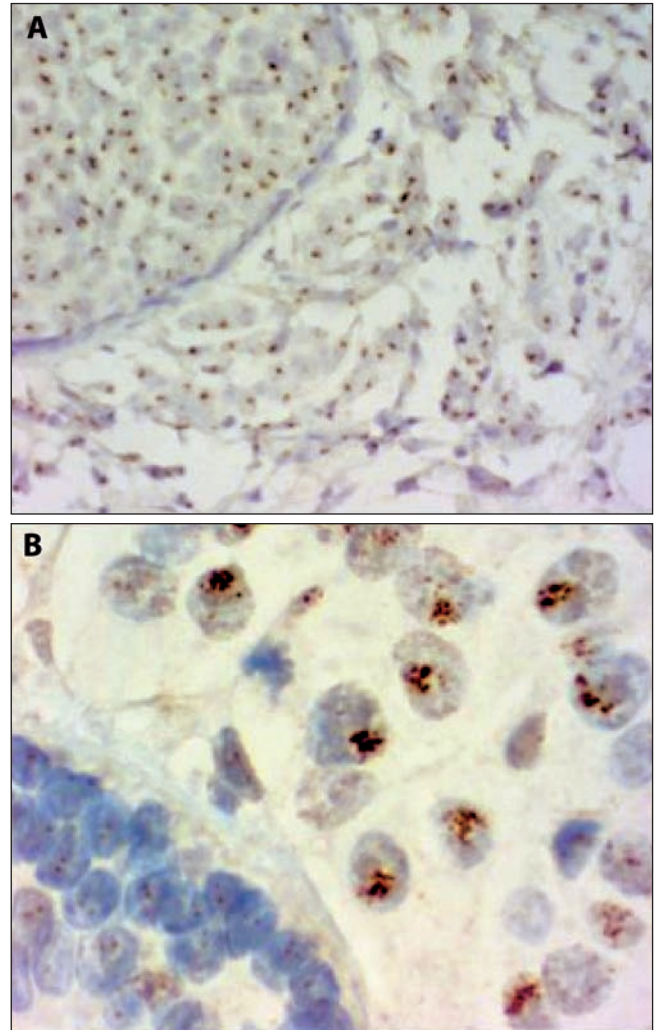


Fig. 1. A. ERBB2 amplificado mediante CISH (> 10 señales de hibridación/núcleo). En parte superior izquierda de la imagen se advierte componente intraductal, también con criterios de amplificación. B. El propio caso sirve como control. A la izquierda, porción de ducto mamario revestido por epitelio ductal preservado, con dos señales de hibridación por núcleo.

Nuestro grupo ha tenido la oportunidad de estudiar mediante CGH un grupo de cánceres de mama agrupados según su perfil inmunohistoquímico en cánceres ERBB2+, cánceres triple negativos (ER-, RP- y ERBB2-) y casos ER+ con diferente actividad proliferativa y casos de carcinoma lobulillar infiltrante, comprobando distin-

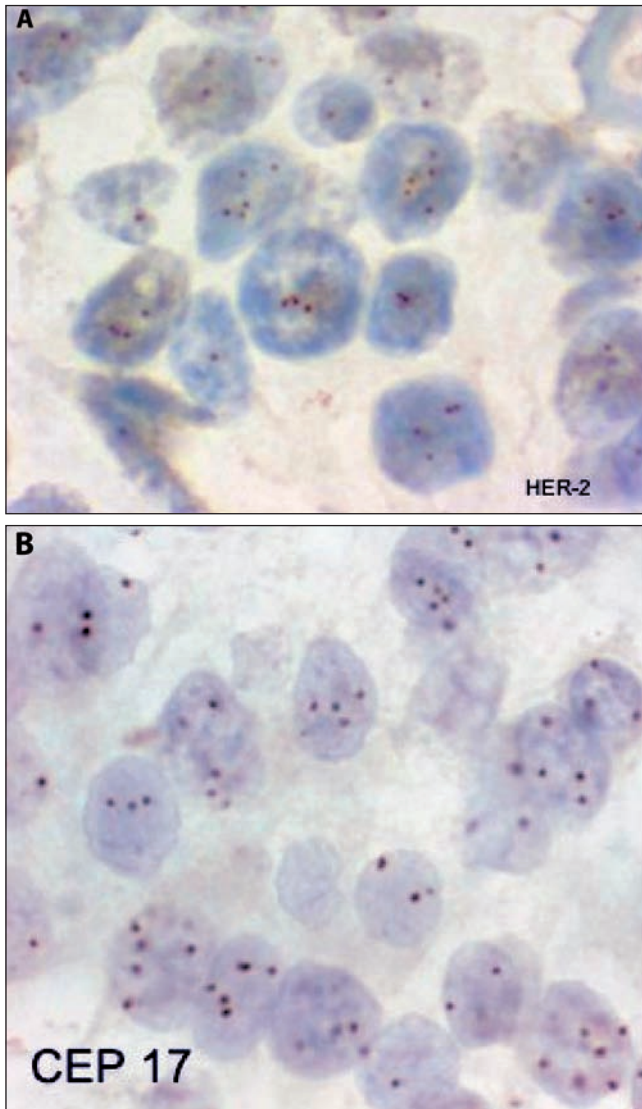


Fig. 2. A. *ERBB2* no amplificado mediante CISH (3-5 señales de hibridación/núcleo). B. Mediante CISH con sonda centromérica CEN17 se confirma polisomía para el cromosoma 17 (3 señales/núcleo de promedio).

tos patrones de alteraciones cromosómicas entre los grupos, reproduciendo los resultados aportados por otros grupos (4) (Fig. 4).

En cualquier caso, la técnica de CGH convencional ha sido superada en el estudio de cáncer de mama, por la técnica de *array*-CGH que utiliza como sustrato de hibridación una matriz de secuencias génicas, con mayor poder discriminativo y de sensibilidad.

## PERFILES DE EXPRESIÓN

Entre las diversas técnicas de estudio de perfil de expresión génica, la utilización de los *microarrays* de tejido y la hibridación con cDNA o RNA tumorales, ha permiti-

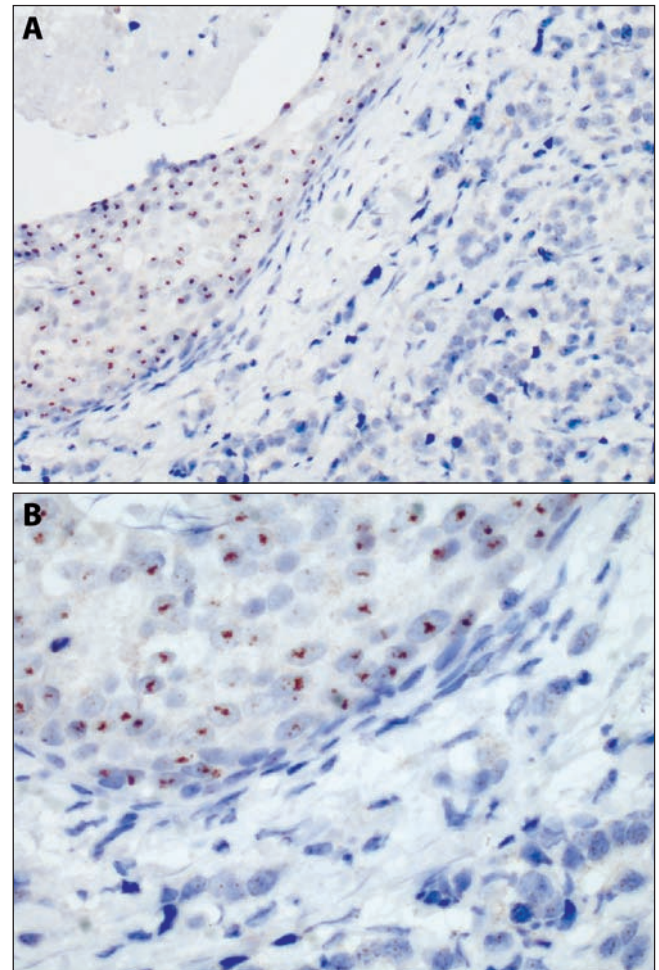


Fig. 3. La sobreexpresión y amplificación de *ERBB2* puede ser heterogénea dentro del mismo tumor y diferente entre los componentes intraductal e invasor del mismo. A. En el caso de la imagen, el componente intraductal (a la izquierda) muestra clara amplificación de *ERBB2* con CISH, mientras que el componente infiltrante (a la derecha) muestra dos señales de hibridación/núcleo. B. Detalle.

do el estudio molecular de amplios cohortes de muestras tisulares de archivo, procesadas de forma convencional, fijadas en formol e incluidas en parafina y la incorporación de los datos obtenidos a amplias bases de datos clínico-patológicos y de seguimiento de las pacientes. En sentido amplio, los estudios de perfiles de expresión con *microarrays* pueden diseñarse como análisis supervisados y no supervisados. Los análisis no supervisados se refieren al estudio de múltiples muestras tumorales y su categorización –mediante métodos estadísticos diversos– en diferentes subclases en base únicamente a los genes expresados y no expresados, y comprobar si estas agrupaciones tienen algún significado clínico (de hecho, se trata de desarrollar una nueva taxonomía molecular del cáncer de mama). Los análisis supervisados (comparación de clases y predicción de clases) por el contrario tienen como finalidad el estudio de las diferencias de expresión

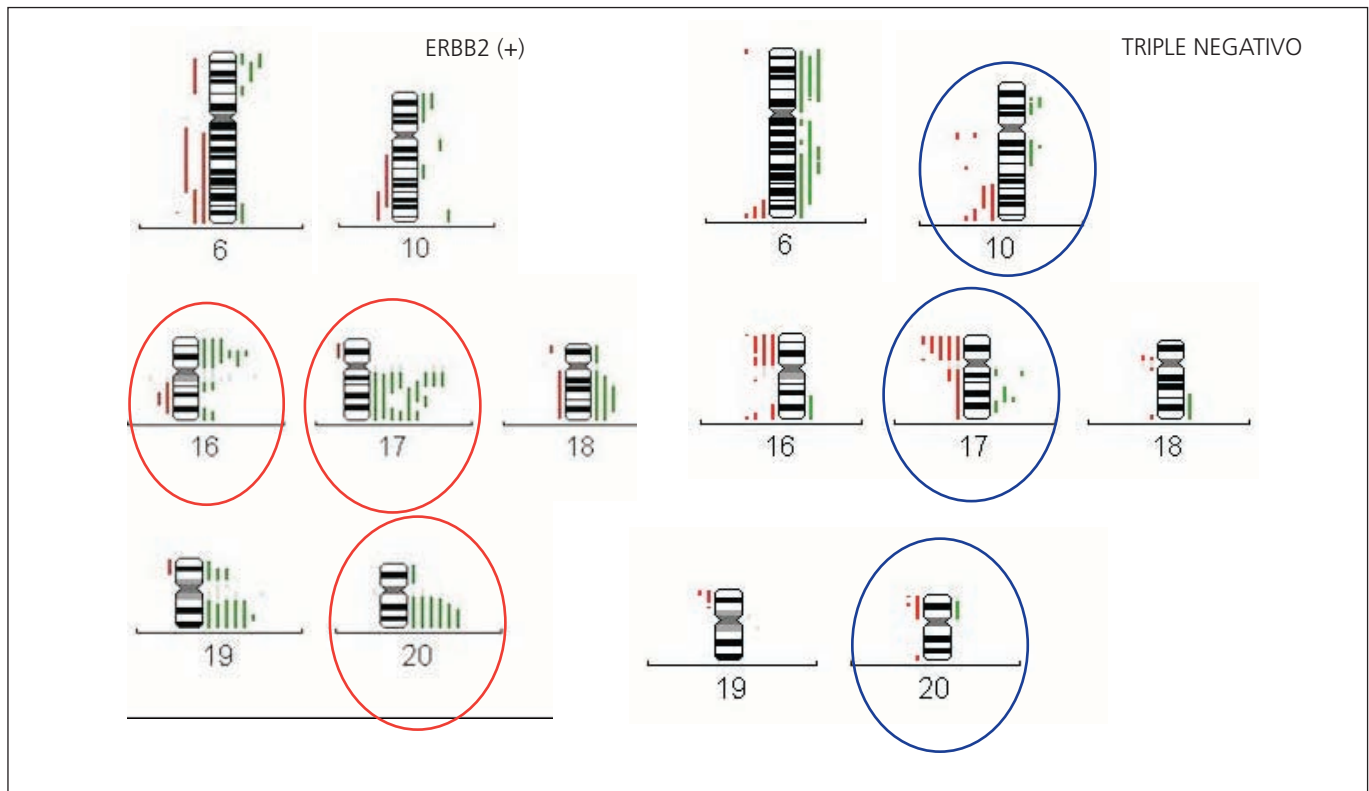


Fig. 4. Técnica de CGH. Diferentes patrones de desequilibrios cromosómicos para diferentes grupos de cánceres de mama, de acuerdo al perfil inmunohistoquímico de ERBB2, receptores de estrógenos y receptores de progesterona. En el grupo ERBB2+, además de amplificación universal en 17q, se observan alteraciones en regiones cromosómicas relacionadas con comportamiento biológico agresivo (20q13). Este perfil es diferente al mostrado en el análisis de cánceres tipo "triple negativo".

entre diferentes clases de tumor ya establecidas o el desarrollo de "firmas génicas" en base a diferentes categorías evolutivas o de respuesta a la terapéutica (5).

Los estudios pioneros del grupo de Standford (6) permitieron establecer de forma revolucionaria que el cáncer de mama podía clasificarse en cuatro grandes categorías, en base a sus perfiles de expresión y mediante análisis estadístico de agrupación por componentes principales. Aparte de la separación en dos grandes clases moleculares: cánceres ER+ y ER-, se identificaban otros subgrupos dependientes de los primeros. Según este estudio, los casos ER+ se caracterizaban por la expresión aumentada de genes normalmente expresados por las células epiteliales luminales ("tipo luminal"). El brazo de cáncer ER- incluía 3 subgrupos: uno sobreexpresando ERBB2 ("tipo HER2"); otro expresando genes característicos de las células basales/mioepiteliales ("tipo basal-like") y un tercero con perfil de expresión similar al de tejido mamario normal. Posteriormente, con limitaciones, se han correlacionado estos diferentes grupos moleculares con diferentes patrones de expresión inmunohistoquímica, permitiendo de alguna forma incorporar esta nueva taxonomía, inicialmente molecular, a la práctica diaria, tal y como se expone en el artículo previo de V. Marco en esta revista (7), y en base a

un panel de anticuerpos limitado y disponible en la mayor parte de departamentos de patología.

En cualquier caso, a pesar de las grandes expectativas generadas por esta nueva taxonomía molecular, la utilidad práctica real de estos nuevos conocimientos ha sido sorprendentemente limitada (8). Hay autores que se preguntan qué aporta realmente de nuevo esta clasificación molecular, y más importante, cuál es el significado clínico de las clases de cáncer de mama identificadas. Y si la información aportada por este nuevo enfoque de tecnología molecular y de análisis estadístico más sofisticado no es simplemente el reflejo del estatus de receptores hormonales, de ERBB2 y del estatus proliferativo de un cáncer de mama, que podría determinarse fácilmente, mediante métodos inmunohistoquímicos convencionales. Probablemente, hasta el momento deberíamos considerar que el análisis de los perfiles de expresión es un primer paso hacia un refinamiento en la clasificación molecular y funcional del cáncer de mama, que podrá añadir información pronóstica y predictiva a los sistemas de clasificación actuales.

Por otro lado, los estudios supervisados de perfiles de expresión han generado resultados prometedores. Existen en el mercado algunas "firmas génicas" de valor pronóstico, aunque está todavía por determinar su indicación clínica pertinente en pacientes individuales.

Probablemente, se requerirá un mayor desarrollo y estandarización de la técnica de determinación de perfiles de expresión y el diseño de ensayos clínicos pertinentes, antes de que el patólogo pueda incorporarla como arma diagnóstica definitiva, con el fin de optimizar y asegurar la equidad asistencial de las pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 2000; 157(5): 1467-72.
2. Sáez A, Andreu FJ, Seguí MA, Baré ML, Fernández S, Dinarés C, et al. HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) compared with fluorescence in situ hybridization (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast* 2006; 15: 519-27.
3. Isola J, Chu L, DeVries S, Matsumura K, Chew K, Ljung BM, et al. Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 5: 4140-5.
4. Carrera R, Sáez A, Rey M, Rigola MA, Vázquez JA, Fernández S, et al. Análisis de desequilibrios cromosómicos en cáncer de mama ERBB2+, mediante hibridación genómica comparada (CGH) y correlación con hibridación in situ cromogénica (CISH) para los genes ERBB2, c-Myc, TOP2A y CCND1. *Rev Senología Patol Mam* 2008; 21(1): 21-7.
5. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology* 2008; 52(1): 67-81.
6. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9212-7.
7. Marco V. Factores pronóstico en el cáncer de mama: parte II. Factores inmunohistoquímicos. *Rev Senología Patol Mam* 2008; 21(5): 198-203.
8. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 225-31.