

EVALUAR LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GENÉTICA CON LA PRUEBA MAMMAPRINT Y TARGET PRINT CON INMUNOHISTOQUÍMICA

CLAUDIA GONZÁLEZ CANELÓN, GERARDO HERNÁNDEZ MUÑOZ, RICARDO PAREDES HANY, JUAN HERNÁNDEZ RASQUÍN, CARMEN ELENA MARÍN.

UNIDAD DE MASTOLOGÍA CLÍNICA LEOPOLDO AGUERREVERE, CARACAS, VENEZUELA.

RESUMEN

OBJETIVO: Experiencia con prueba de 70 genes (*Mammaprint*[®]), en evaluación y tratamiento de pacientes con cáncer de mama y comparar determinación de niveles de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2 por inmunohistoquímica con análisis por *microarray* (*Target Print*). **MÉTODO:** 66 pacientes de la Unidad de Mastología de la Clínica Leopoldo Aguerrevere, estadio I a II, ganglios clínicamente negativos con prueba de *Mammaprint*[®] y *Target Print* se les realizó mastectomía o cirugía preservadora más ganglio centinela e inmunohistoquímica. **RESULTADOS:** De 66 pacientes 86,8 % tratadas con cirugía preservadora más ganglio centinela. 46,9 % fueron ganglios positivos incluyendo 3 micrometástasis (4,5 %). Receptores hormonales positivos, para estrógenos y progesterona en 63 % evidenciándose concordancia del 79 % entre estos, la inmunohistoquímica y *Target Print*. 2 pacientes fueron discordantes para HER2 (3 %) comparando los dos métodos, fueron evaluados por FISH y concordaron con resultado final del *Target Print*. 66 pacientes, 42 (64 %) clasificados de alto riesgo genético, indicándose quimioterapia a pesar de lo que establecieron factores clínicos patológicos. 24 pacientes (36 %) clasificadas de bajo riesgo se tomaron en cuenta factores clínico patológicos y resultado de *Mammaprint*[®] para terapia adyuvante. **CONCLUSIÓN:** La prueba genética *Mammaprint*[®] es una herramienta más, de altísima utilidad, para complementar decisión del tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama. El análisis por *microarray* muestra una altísima concordancia con inmunohistoquímica /FISH y provee una información objetiva del estatus de receptores hormonales en cáncer de mama.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, mama, perfil, expresión genética, 70 genes.

SUMMARY

OBJECTIVE: We show our experience with test of 70 genes (*Mammaprint*[®]), in evaluation and the treatment patients with breast cancer, we evaluated the (*Target Print*) microarray expression level of estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 compared with immunohistochemistry. **METHOD:** 66 patients with breast cancer were evaluated in the breast cancer Unit Leopoldo Aguerrevere, with clinical stage I-II, and node negative, with *Mammaprint*[®] test and *Target Print*, who were to mastectomy or conservative surgery and sentinel node. **RESULTS:** 66 patients 86 % was treated by conservative surgery and the sentinel node. 46.9 % were node-positive including 3 micro-metastases (4.5 %). Hormone receptors were expressed as positive for estrogen and progesterone in 63 % the concordance between microarray and immunohistochemistry was 79 %. Two patients were discordant for HER2 receptor (3 %) what shows high concordance between both methods. Additional FISH was used in these cases; they were concordant with microarray analysis (*Target Print*). 66 patients, 42 (64 %) were classified as high genetic risk, indication of chemotherapy in spite of what established the pathological clinical factors. 24 patients (36 %) were classified as low risk considered pathological and clinical factors besides *Mammaprint*[®] to indicated adjuvant therapy. **CONCLUSION:** *Mammaprint*[®] genetic testing is a tool of high utility, to complement the decision of adjuvant treatment in patients with breast cancer. The microarray analysis (*Target Print*) shows high concordance with immunohistochemistry/FISH and provides an additional objective assessment of tumor receptor status in breast cancer.

KEY WORDS: Breast, cancer, gene expression, profile of 70 genes.

Recibidos: 15/08/2012 Revisado:13/01/2013

Aceptado para publicación: 17/10/2013

Correspondencia: Dra. Claudia González. Unidad de Mastología, Clínica Leopoldo Aguerrevere, Av. Río

Manapire, Parque Humboldt. Caracas, Venezuela.

Tel. +582129797179.

E-mail: claudiagonzalez440@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los factores pronósticos y predictivos para la evolución del cáncer de mama, están bien establecidos, consolidados y validados. Sin embargo, los pacientes con cáncer de mama con el mismo estadio de la enfermedad pueden tener una respuesta al tratamiento y una evolución muy diferentes. Los predictores más importantes de metástasis (por ejemplo, el estado de los ganglios linfáticos y el grado histológico) no logran clasificar con precisión los tumores de mama en función de su comportamiento clínico. Se necesitan nuevos y más precisos factores predictivos para la evaluación y tratamiento de esta patología ^(1,2).

Los estudios genéticos del cáncer de mama han demostrado ser factores pronósticos y predictivos de gran utilidad y en diversos estudios han establecido una disminución en la administración de quimioterapia en aproximadamente un 30 % de pacientes receptores hormonales positivos ganglios negativos, determinando un grupo de pacientes de buen pronóstico que no se benefician de quimioterapia y estableciendo con mayor precisión el grupo que sí lo amerita.

A pesar de que el estatus ganglionar está considerado como uno de los factores pronósticos más importantes, 25 % a 30 % de los pacientes ganglios positivos permanecerán libres de enfermedad a distancia. Estudios en curso como el de Mook S y col., con la firma pronóstica de 70 genes (*Mammaprint*[®]) podemos identificar paciente con 1 a 3 ganglios positivos con buen pronóstico de su enfermedad que no se beneficiarán de quimioterapia ⁽³⁾. Así como el estudio de Straver y col., en el que nos permite identificar pacientes que responderán o no a la quimioterapia neoadyuvante ⁽⁴⁾.

Los perfiles de expresión genética apoyan la hipótesis que los cánceres de mama receptor de

estrógeno (RE) + / (RE) - se originan en distintos tipos celulares. Y además los marcadores de inmunohistoquímica carecen de estandarización y validación.

Los niveles en los receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y la sobreexpresión del HER2 son factores determinantes en el tratamiento y pronóstico del cáncer de mama y hasta la actualidad la inmunohistoquímica es el método predominante en el estudio de los mismos. Sin embargo, creemos que se necesita validar y evaluar la concordancia y seguridad del análisis por *microarray* de la expresión de RE, RP, y HER 2 con la inmunohistoquímica porque se han evidenciado variabilidades interlaboratorio (técnicas de fijación del tejido, elección del anticuerpo e interpretación) lo que podría variar los resultados y encontrar falsos positivos o negativos en un porcentaje de casos del 30 % o más según diferentes estudios ⁽⁵⁾.

En este estudio preliminar demostraremos nuestra experiencia con la prueba de 70 genes (*Mammaprint*[®] 70 gene prognostic signature), los factores clínico patológicos asociados al alto o bajo riesgo, la concordancia de los RE, RP y HER2 con la inmunohistoquímica y posteriormente la evolución y el tratamiento de estas pacientes con cáncer de mama.

MÉTODO

Se evaluaron 70 pacientes con cáncer de mama en la Unidad de Mastología de la Clínica Leopoldo Aguerrevere, estadio I-II, con ganglios clínicamente negativos, con la prueba *Mammaprint*[®] (70 gene prognostic signature) realizando mastectomía parcial o cirugía preservadora de la mama más ganglio centinela y disección axilar en los casos en que el ganglio centinela fuera positivo.

La pieza operatoria se lleva a la unidad de anatomía patológica e inmediatamente se toma la muestra de la zona macroscópicamente

más representativa del tumor y se coloca en la solución preservadora que incluye el *kit* de *Mammaprint*[®] (Figura 1). Incluimos en parafina el tejido que rodea el área de dicha toma para verificar posteriormente la presencia de tumor

en las láminas histológicas y asegurarnos que la muestra es suficiente para el estudio (Figura 2).

Además se realizó análisis por *microarray* de la expresión de RE, RP y HER2 a través del test *Target Print*. Y se comparó con la

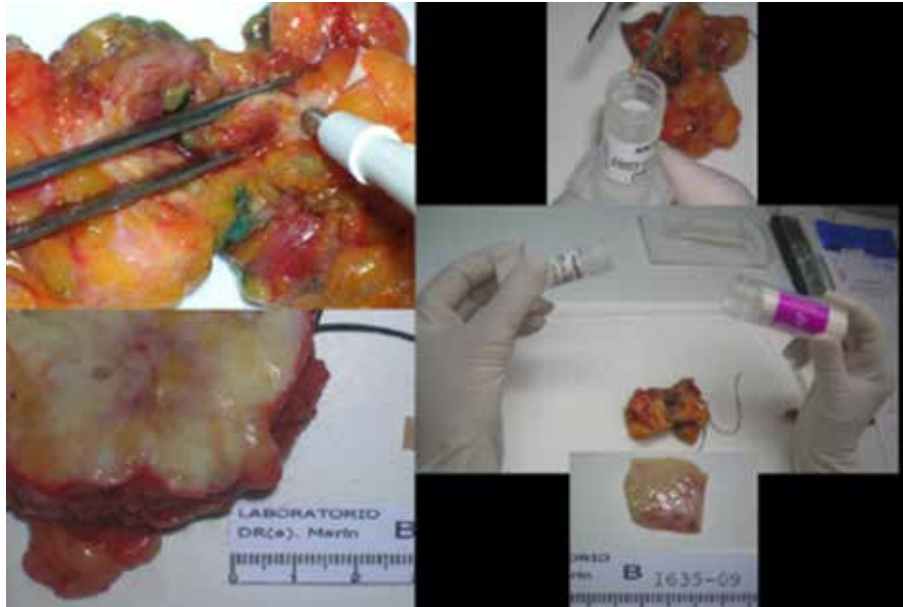


Figura 1. Toma de muestra de la zona macroscópicamente más representativa del tumor y colocación en la solución preservadora que incluye el *kit* de *Mammaprint*[®].

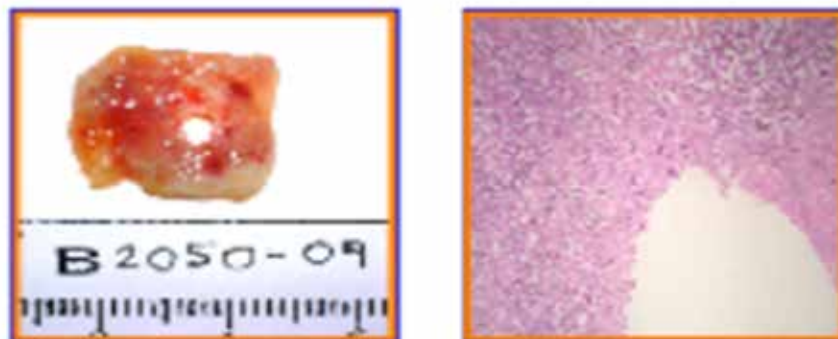


Figura 2. Incluimos en parafina el tejido que rodea el área de muestra para verificar posteriormente la presencia de tumor en las láminas histológicas y asegurarnos que sea suficiente.

inmunohistoquímica realizada en el laboratorio de anatomía patológica de la clínica Leopoldo Aguerrevere en 66 pacientes con cáncer de mama.

Y a los casos HER2 discordantes o 2+ por inmunohistoquímica se le realizó FISH (*fluorescence in situ hybridization*) el cual fue útil para determinar el resultado final del mismo.

RESULTADOS

De las 70 pacientes evaluadas, cuatro resultaron inadecuadas para la prueba por lo que fueron excluidas. De las 66 pacientes restantes el 86 % (57) pacientes fueron tratadas con cirugía preservadora más ganglio centinela y el 14 % con cirugía radical. El 55 % de las pacientes tenían edades comprendidas entre los 41 y 60 años de edad (promedio 53,8 años). El 13 % de nuestras pacientes (9) eran menores de 40 años. El tipo histológico predominante fue el carcinoma ductal infiltrante representando el 59 % de los pacientes (39), el lobulillar 18 % y los papilares 18 %.

Los ganglios fueron positivos en el 46,9 % de las muestras, incluyendo tres pacientes con micrometástasis que representaron el 4,5 %. En la mayoría de las pacientes (35) fueron negativos, es decir, un 53 %. Evidenciando que el 81 % correspondió a 1-3 ganglios positivos y solamente en 6 pacientes (19 %) se encontraron más de 4 ganglios positivos.

Los receptores hormonales se expresaron como positivos tanto de estrógenos y de progesterona en el 63 % de los casos por *microarray* y en el 65 % de los casos por inmunohistoquímica. La expresión del Her 2 Neu fue positiva en el 22 % de los casos (11 pacientes).

Los receptores hormonales por *microarray* (*Target Print*), fueron concordantes con la inmunohistoquímica en el 79 % de los casos, con 13 pacientes discordantes (19,6 %). Solo 2 pacientes (3 %) no concordaron el HER2, y dos

pacientes resultaron HER2 indeterminado por 2+, los cuales fueron negativos por *microarray*. Estos 4 casos se enviaron a corroborar con FISH, y todos concordaron con el resultado por *microarray* (*Target Print*). Sin embargo, el 97 % de los casos tuvo una clasificación idéntica tanto por inmunohistoquímica como por *microarray* para HER2, lo cual nos habla de una altísima concordancia. La evaluación de los casos concordantes y discordantes entre la inmunohistoquímica y el *Target Print* fueron: (HER2 concordante en el 97 % de los casos y 3 % discordante. RE/RP concordante en 79 % de los casos y discordante en 21 %).

De los 66 pacientes, 64 % (42) fueron clasificados de alto riesgo por la prueba genética *Mammaprint*[®] y 36 % (24) fueron clasificadas de bajo riesgo. En el primer grupo de pacientes de alto riesgo el valor de *Mammaprint*[®] se sumó a los factores clínicos patológicos para la indicación de quimioterapia adyuvante, aunque estos últimos fueran de buen pronóstico. En los de bajo riesgo se tomaron en cuenta los factores clínicos patológicos y el resultado *Mammaprint*[®] para decidir terapia adyuvante ya fuera quimioterapia y/u hormonoterapia. El grado nuclear I se asoció al bajo riesgo en el 77,7 % de los casos y a alto en el 22,0 %. Contrariamente, el grado nuclear III se asocia al 86,3 % de los casos de alto riesgo y solo 13,5 % de los de bajo riesgo.

El alto riesgo estuvo asociado a ganglios positivos en el 71 % (22/31 casos) con tres micrometástasis; con receptores hormonales negativos (18/18 casos) 100 % y al Her2 positivos 9/11 casos (81,8 %). Es importante destacar que 13 de los 13 casos triple negativo por *microarray* fueron clasificados como de alto riesgo.

DISCUSIÓN

En los estadios tempranos del cáncer de mama, la cirugía es el tratamiento principal y, en conjunto con la radioterapia, pueden controlar

la enfermedad locorregional en la mayor parte de los casos. Sin embargo, alrededor de 30 % de los pacientes morirá finalmente debido a una enfermedad diseminada. Es por esto que se han desarrollado tratamientos adyuvantes (hormono o quimioterapia). Desde tiempo atrás se conoce la heterogeneidad del cáncer de mama. Los factores pronósticos tradicionales no satisfacen por completo la toma de decisiones terapéuticas. Se necesitan factores pronósticos más precisos para diferenciar a las pacientes según el tipo de riesgo ^(1,2).

El desarrollo de la expresión genética por microarreglos y la tecnología relacionada proporcionan un perfil más preciso de la enfermedad. La clasificación molecular puede ser más poderosa que la histopatología como factor predictivo de los diferentes tratamientos. Esto resultaría en un uso menos frecuente y más selectivo de la quimioterapia y con ello la ventaja considerable de reducir la toxicidad y los costos ⁽⁶⁾.

El proyecto del genoma humano y el desarrollo de la alta tecnología respecto a los microarreglos, proporciona la oportunidad para comprender el perfil molecular del cáncer de mama ⁽⁷⁾. Perou y col., estudiaron los patrones de expresión genética en células epiteliales de la glándula y del cáncer de mama ⁽⁸⁾.

En el 2002, Van't ver y col., realizaron un estudio acerca de la predicción del perfil genético y sus resultados clínicos en el cáncer de mama, proponiendo este método para seleccionar a pacientes que puedan beneficiarse de la quimioterapia ⁽⁹⁾. En el 2003 Sorlie y col., refinaron esta clasificación molecular ⁽¹⁰⁾.

Se determinaron por microarreglos de ADN varios subtipos de cáncer de mama que se diferencian en su patrón de expresión genética ^(6,10) y en su pronóstico ⁽¹¹⁾, patrón que persiste en sus metástasis ^(12,13). El cáncer de mama se divide en dos grupos basados en la presencia de expresión genética del RE, el cual se ha observado como el mayor factor discriminador del subtipo

molecular. Este perfil de expresión genética reveló tres subtipos por RE: el luminal A, el B y el C, aunque la estabilidad de este último subgrupo aún no está clara. El RE- comprende HER-2neu, al tipo basal y tipo normal.

Varios estudios han usado los microarreglos para clasificar los tumores en base a su perfil de expresión genética ^(14,15). Estos estudios han revelado en forma consistente una diversidad molecular en el cáncer de mama que en forma frecuente corresponderá a diversos tipos de fenotipos.

La prueba de 70 genes en cáncer de mama (*Mammaprint*[®]) fue investigada en tumores de cáncer de mama infiltrantes con los tres ganglios axilares positivos. El presente estudio demostró que el diagnóstico molecular puede identificar un grupo de pacientes de bajo riesgo con ganglios axilares positivos, los cuales tradicionalmente fueron clasificados como de alto riesgo en los factores pronósticos tradicionales anatomopatológicos ^(13,16). En nuestro estudio se logró identificar 9 de 31 pacientes ganglios positivos que reportaron bajo riesgo según *Mammaprint*[®], es decir, un 29 % de las pacientes ganglios positivos que podrían no beneficiarse de quimioterapia. Esto será validado de manera prospectiva en el ensayo MINDAC.

Knauer M, en un estudio multicéntrico desarrolló y validó el pronóstico del cáncer de mama, utilizando la prueba de *Mammaprint*[®] y demostró que los pacientes de bajo riesgo no se beneficiaban del uso de quimioterapia añadido a la hormonoterapia, en cambio con esta combinación se alcanzó un alto beneficio en las pacientes de alto riesgo ⁽¹⁶⁾. Este resultado en el análisis multicéntrico no solo confirma que el perfil genético de 70 genes es un índice de pronóstico válido e independiente para el cáncer de mama, sino que ayuda a indicar en forma certera la terapia coadyuvante ⁽¹⁷⁾. Destacando en nuestro estudio que el 100 % de las pacientes triple negativo así como las 18 pacientes receptores hormonales negativos fueron reportadas como

de alto riesgo según su perfil genético.

Datos adicionales que soportan el potencial predictivo del perfil genético de 70 genes se comprueba con el estudio de terapia neoadyuvante de Straver y col., en este estudio solo pacientes con un perfil genético de alto riesgo alcanzaron una respuesta patológica completa a los regímenes de quimioterapia y por lo contrario los pacientes de bajo riesgo no respondieron ⁽⁴⁾. Los resultados de este estudio soportan la teoría que los perfiles de expresión genética pueden separar los pacientes que responden sí o no a la quimioterapia.

El estudio de perfil genético de 70 genes el cual fue desarrollado en premenopáusicas con cáncer de mama precoz, se ha demostrado que también es un factor pronóstico en mujeres posmenopáusicas y es de gran valor para seleccionarlos en las indicaciones de quimioterapia adyuvante.

El perfil de subtipos moleculares permite predecir la respuesta al tratamiento, se desarrolló en base a la clasificación de 80 genes, con un estatus concordante para los receptores RE, RP y Her-2 y la determinación cuantitativa de la expresión mono-génica y se clasifican en los subgrupos luminal, Her-2 y basal de acuerdo a este perfil multigénico. La aplicación de este hallazgo podría dar lugar a una mejora en el manejo clínico de las pacientes.

En este estudio se logró demostrar una altísima concordancia entre la IHQ y el análisis por *microarray* (*Target Print*) del 97 % para el HER2 corroborando los 2 casos discordantes y los 2+ por IHQ con FISH. Los cuales fueron

negativos por *microarray*. Lo que nos da una idea del beneficio clínico que aporta el análisis por *microarray* en los casos discordantes o en los que sean indeterminados con 2+ por IHQ, y de esta manera reducir el número de falsos positivos o negativos que en múltiples estudios llega al 30 % ⁽⁵⁾.

El *Oncotype Dx*[®] usa un chip compuesto por 15 genes más otros 6 de control interno que se relaciona con cáncer de mama. Sin embargo, para analizar el índice de recurrencia del cáncer, se necesitan fijar el ADN con una solución de formaldehído, la cual si no se realiza en forma adecuada puede dañar la muestra que extrae el patólogo.

Uno de los grandes avances del siglo XX es el tratamiento conservador del cáncer de mama y la identificación del ganglio centinela, para tener menor morbilidad y un manejo adecuado del cáncer de mama y de la axila.

Hoy el gran aporte del siglo XXI es generar la calidad de vida con terapias más precisas a través de la identificación molecular del cáncer de mama e incrementar su calidad de vida y una mejor supervivencia. Podemos concluir que la prueba genética de *Mammaprint*[®] es una herramienta de gran utilidad para complementar la decisión del tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama. Y el análisis por *microarray* de los RE, RP Y HER2 (*Target Print*) muestra una altísima concordancia con la IHQ, siendo un estudio adicional muy objetivo de los receptores hormonales y el HER2 en cáncer de mama.

REFERENCIAS

1. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn H. Meeting highlights: Internacional consensus panel on the treatment of primary breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1998;90(21):1601-1608.
2. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn H, et al. Meetin Highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. Ann Oncol.

- 2005;16(10):1569-1583.
3. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116(2):295-302.
 4. Straver M, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJ, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(3):551-558.
 5. Roepman P, Horlings HM, Krijgsman O, Kok M, Bueno-de-Mesquita JM, Bender R, et al. Microarray-based determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 receptor status in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 5(22):7003-7011.
 6. Cleator S, Ashworth A. Molecular profiling of breast cancer: Clinical implications. *Br J Cancer.* 2004;90(6):1120-1124.
 7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2000;406(6797):747-752.
 8. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(6871): 530-536.
 9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression fratterns of breast carcinomas distinguish. Tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10869-10874.
 10. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(18):10393-10398.
 11. Weigelt B, Glas AM, Wessels LFA, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(26):15901-15905.
 12. Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(20):9155-9158.
 13. Wacholder S, Hartge P, Prentice R, Garcia-Closas M, Feigelson HS, Diver WR, et al. Performance of common genetic variants in breast-cancer risk models. *New Engl J Med.* 2010;362(11):986-993.
 14. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas A, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Nat Cancer Inst.* 2006;98(17):1183-1192.
 15. Bueno-de-Mesquita JM, Sonke GS, van de Vijver MJ, Linn SC. Additional value and potential use of the 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer in daily clinical practice. *Ann Oncol.* 2011;22(9):2021-2030.
 16. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(3):655-656.
 17. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Hastah F. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(1):86-92.