

## CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO SUBCLASIFICACIÓN Y LAS IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

Jorge S. Reis-Filho

Quiero concentrarme en el tema de la subclasificación y las implicaciones terapéuticas, y el hecho de poder concluir juntos que el triple negativo sólo es una expresión operativa que incluye muchas enfermedades; eso es lo que quiero probar. No tengo conflictos de interés.

En esta conferencia para poder hablar de la subclasificación de los cánceres de mama triple negativos, nos vamos a tener que remontar a su definición, sus características clínico-patológicas, rasgos patológicos y subtipos histológicos. La subclasificación de cánceres triple negativos en cuanto a su subtipo molecular y las firmas de pronóstico como MammaPrint®. Luego finalizar con unas palabras acerca de la genética de los cánceres triple negativos.

¿Qué es un cáncer de mama triple negativo? Es una expresión operativa de un subgrupo de cánceres que están caracterizados por falta de RE, falta de RP y de HER2.

Por muchos años fue muy complicado definir qué quería decir RE negativo y RP negativo, pero ahora con las guías de ASCO los triple negativos deben ser definidos como los que tienen un RE de menos del 1%, un RP de menos del 1% y un HER2 de 0 hasta 2+ en inmunohistoquímica, pero FISH negativo.

¿Por qué molestarnos con los cánceres triple negativos? Este grupo nos interesa porque tienen implicancias terapéuticas, como no tienen RE y HER2 no pueden manejarse con terapias endocrinas ni agentes anti HER2; además, estos cánceres como grupo tienen un curso clínico

bastante agresivo, comparado con los luminales o RE positivos. Aparte de nuestro interés clínico en ellos, la otra razón por la cual nos interesan los triple negativos es la clasificación molecular.

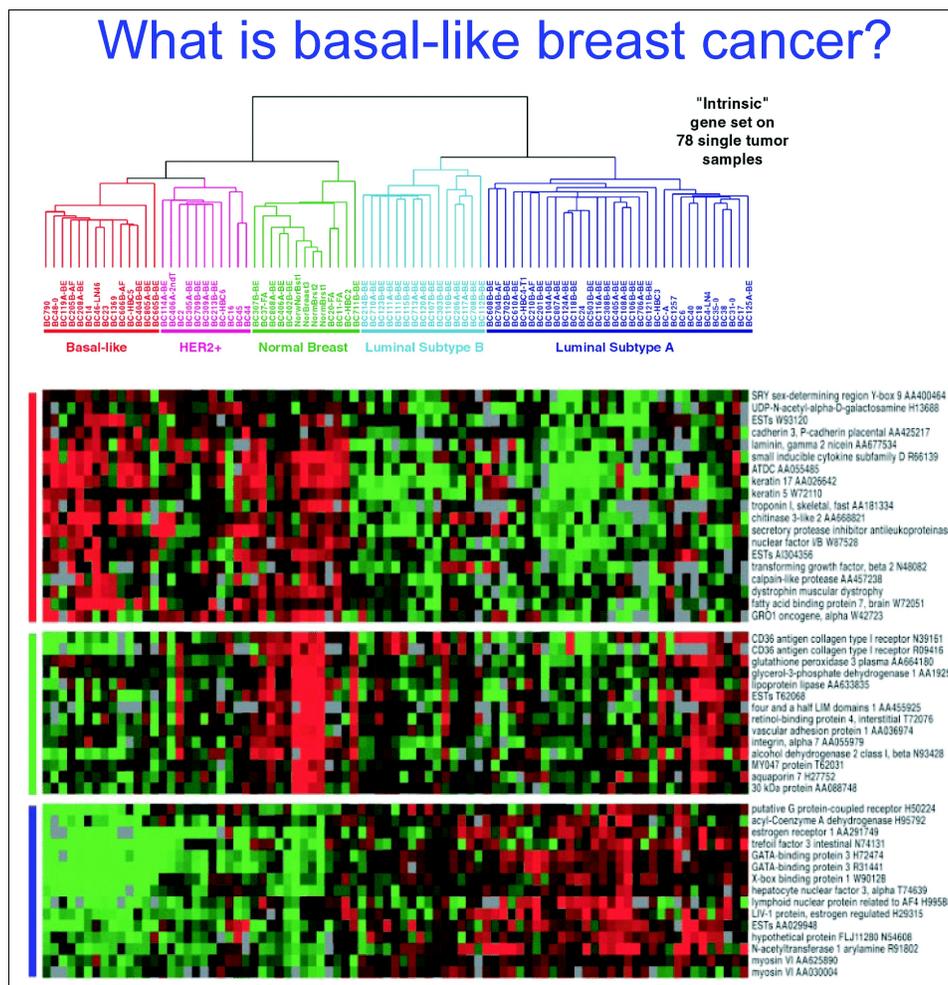
En los estudios iniciales que resultaron del desarrollo de la clasificación intrínseca se identifica un nuevo subgrupo, los *basal-like*, que fue el primer subtipo que solamente se definía en base al perfil genético y nada más; no había morfología sino simplemente perfil genético. Fue nombrado así, porque en su perfil transcriptómico había expresión de genes que normalmente se encuentran en las células basales de la mama, como citoqueratina 5 y 17.

Otra característica de estos tumores es que por su perfil genético muestran muy bajo o ninguna expresión de receptor de estrógeno, como se ve en el Cuadro 1 todo verde; además, de acuerdo con el perfil de expresión genética, también se ve sobreexpresión de HER2. Entonces, al comienzo varios expertos del campo definían los cánceres tipo basal como tumores de fenotipo de triple negativo y que ambos serían sinónimos. Ahora, en el 2013, este concepto ya no se sostiene.

Ahora hay varias líneas de evidencia que demuestran que no todos los cánceres triple negativos, de acuerdo con la inmunohistoquímica son basales, y tampoco todos los basales son triple negativos, por inmunohistoquímica. En el estudio que se observa en el Cuadro 2 se puede leer la referencia del grupo que comercializa el test PAM50. Con PAM50 e inmunohistoquímica

---

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



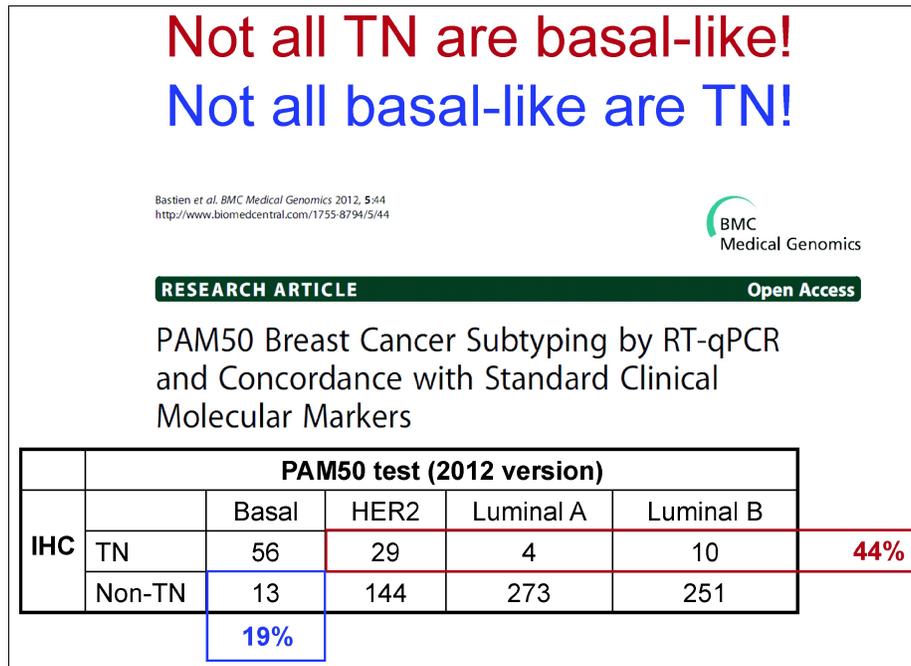
Cuadro 1

demuestran de manera bastante objetiva que de los tumores clasificados como triple negativos por inmunohistoquímica, 44% se clasifican no como basales por el PAM50, y se puede ver que en los tumores clasificados como basales por el PAM50, el 19% no son fenotipo triple negativo, de acuerdo con la inmunohistoquímica.

En base a este resultado y otros, sería justo decir que triple negativo de ninguna manera es sinónimo del fenotipo basal. Hay una gran superposición entre los triple negativos y los basales, alrededor del 70-80%. Si uno define los triple negativos en base a inmunohistoquímica, define el grupo y luego hace el *microarray* ge-

nético, el 70% va a ser basal, pero también va a haber otros clasificados como apocrinos moleculares, *claudin-low* u otros subtipos. En la misma línea, si uno define los cánceres basales por *microarray* y después hace la inmunohistoquímica a esos tumores, alrededor del 80% van a ser triple negativos, pero va a haber otros que son HER2+, HER2 amplificados y otros van a expresar RE y RP, pero a bajos niveles. Entonces, el primer concepto es que los triple negativos no son sinónimo de tipo basal.

A pesar de los problemas de la definición y de la nomenclatura, y que estas definiciones han sido usadas de manera intercambiada, el hecho



Cuadro 2

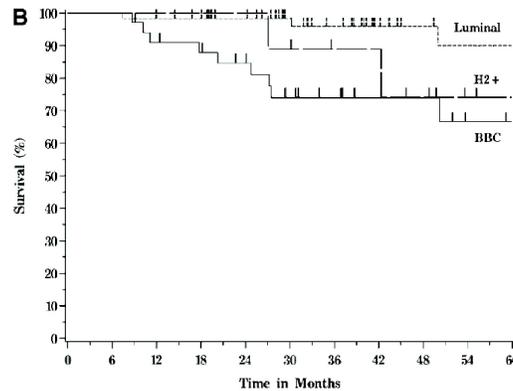
es que varios estudios demostraron que esos tumores tienen características clínico-patológicas bastante específicas.

Los cánceres basales y triple negativos representan un 12-17% de todos los carcinomas de mama. Son prevalentes en mujeres más jóvenes, de origen africano e hispánico, y hay un enriquecimiento de estos tumores en las pacientes que tienen la mutación de BRCA1. De hecho, de todos los cánceres que se desarrollan con mutación BRCA1, el 80-85% va a ser triple negativo. Si reunimos una serie de cánceres triple negativos, independientemente de la historia familiar, y después hacemos la secuencia de BRCA1, el 10-14% va a tener una mutación de BRCA1. Hay un subgrupo de estos triple negativos que está caracterizado por la mutación de BRCA1. Finalmente, en aquellos países donde los programas de *screening* de cáncer de mama están instaurados, hay enriquecimiento de cánceres triple negativos en el subgrupo de intervalo; es decir, esos cánceres que se desarrollan entre dos sesiones de *screening*.

Otra cosa interesante es la relación con los marcadores de pronóstico. Como ustedes saben el tamaño es uno de los factores de pronóstico más importante que tenemos. Sin embargo, en los triple negativos el impacto del tamaño en el pronóstico es distinto. En los no triple negativos la máxima de que los tumores más grandes tienen peor resultado es cierto; los de más de 2 cm tienen peor evolución que aquellos inferiores a 2 cm. Pero en los triple negativos no es así. Es más, los más grandes y los menores a 10 años de seguimiento, tienen exactamente la misma evolución. La única asociación entre el tamaño y la conducta de los triple negativos parece estar relacionada con cuán rápido el tumor recidiva. Los tumores más grandes recidivan más rápido que los pequeños. Este concepto ha sido demostrado en varios estudios, pero todos son análisis retrospectivos; entonces, hay que tomarlos con pinzas. Pero hay evidencia para sugerir que el tamaño tiene diferente impacto en las pacientes con cánceres triple negativos o no triple negativos.

## The basal-like and TN paradox

Molecular type	Pathological complete response
TNP (BBC)	29%
HER2 (H2)	10%
Luminal	6.5%



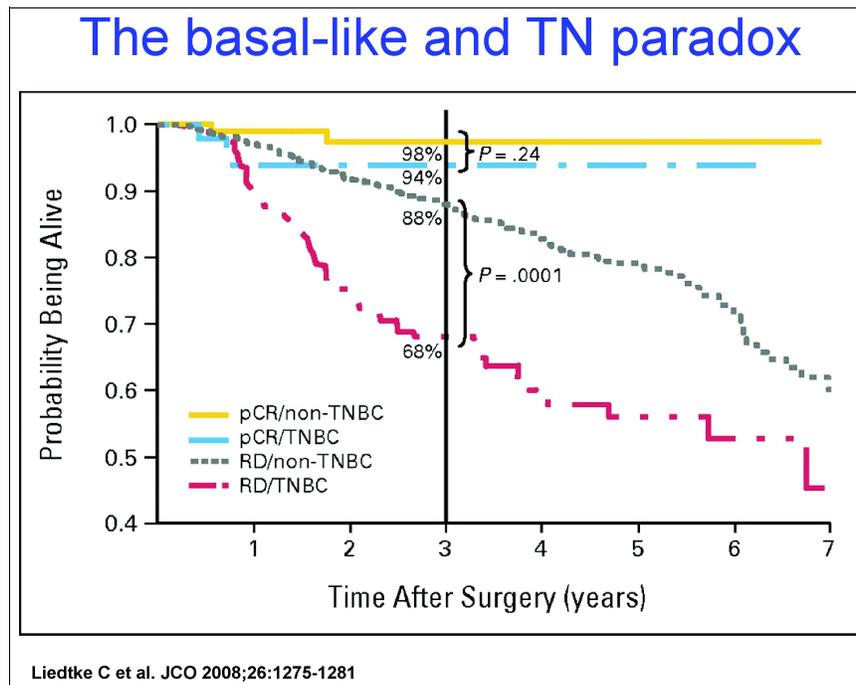
Carey et al. Clin Cancer Res 2007;13:2329-34.

**Cuadro 3**

Otra característica de los triple negativos, que es bastante notable, es el hecho que la relación con el riesgo residual después de la terapia inicial es distinta. En los no triple negativos, especialmente en los RE positivo, el riesgo de la recaída a distancia después de la terapia inicial es constante y podemos ver recaídas de pacientes con RE positivo de hasta 15 años después del manejo inicial. Para los triple negativos el riesgo es mayor después de 1-4 años de seguimiento, pero después de los 4 años el riesgo empieza a declinar y finalmente se aplana a los 8 años. La manera en que lo percibimos es que si una paciente con un cáncer triple negativo es manejada con el estándar de atención actual y esa paciente no ha tenido una recidiva a los 8 años, esa paciente probablemente esté curada. Habiendo dicho esto, sin embargo, este año tuve dos casos anecdóticos de cáncer triple negativo que hicieron una recidiva tardía; pero siempre hay excepciones a la regla.

Otra característica de los triple negativos que vale la pena mencionar es su patrón metastásico. Aunque se disemine a muchos sitios, menos frecuentemente van a los ganglios ganglionares, hueso e hígado, y muestran más proclividad al cerebro y pulmones. De hecho, si integramos la serie de depósitos metastásicos y luego se hace la pregunta de cuál es el fenotipo que da lugar a esa metástasis, solamente el 7% de las metástasis óseas vienen de cáncer triple negativo; por otro lado, 57% de todas las metástasis son cerebrales y 40% pulmonares. Esta observación conduce a dos conclusiones. Los triple negativos favorecen la diseminación hematogena y no linfática, y que hay un componente de alojamiento metastásico.

La última característica clínico-patológica se refiere a la subtipificación y es la respuesta a la terapia neoadyuvante. El Cuadro 3 muestra los datos de Lisa Carey y col., porque fueron los primeros en comprobar este punto. Lo que hi-



Cuadro 4

cieron fue algo muy simple, armar una serie de cánceres triple negativos tratados con tratamiento neoadyuvante. Después hicieron inmunohistoquímica de los tumores y los dividen en triple negativo, HER2+ y luminal, y correlacionaron los fenotipos con la respuesta patológica completa. Como saben, aunque no es perfecto, quizás sea uno de los mejores marcadores sustitutos que tenemos para el resultado de pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante. Observaron que la mayor tasa de respuesta patológica completa se vio en los triple negativos. Sin embargo, al seguir a estas pacientes hasta 5 años, se vio que dichas pacientes con los cánceres triple negativos tenían el peor pronóstico. ¿Cómo conciliamos esta paradoja? La mayor tasa de respuesta patológica completa por un lado, pero la peor evolución a los 5 años.

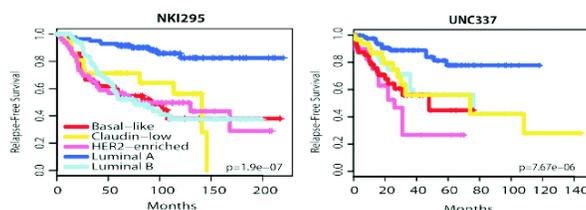
Esta observación aparentemente paradójica puede ser reconciliada si dividimos los datos con respecto a fenotipo y respuesta patológica completa, que fue hecho por el grupo de Liedtke

(Cuadro 4). Demostraron que los triple negativos que evolucionaron a respuesta patológica completa después de la quimioterapia no adyuvante, la línea azul, tuvieron muy buen resultado, al igual que las pacientes con RE+ que lograron la respuesta patológica completa. Por otro lado, las pacientes con triple negativo que no lograron la respuesta patológica completa tuvieron el peor pronóstico. Este gráfico recalca dos puntos importantes: primero, que hay heterogeneidad en la respuesta de los cánceres triple negativos a la quimioterapia convencional; y segundo, hay un subgrupo de cánceres triple negativos que tiene una sensibilidad exquisita a los agentes convencionales. Entonces, aquí desde el punto de vista clínico tenemos dos subgrupos de enfermedad.

En cuanto a la terapia, yo les mencioné que hay un subgrupo de triple negativo, 10-14%, impulsados por mutaciones tipo BRCA1. En un estudio de fase 2 de Andrew Tutt, demuestra que 400 mg de un solo agente, logra respuestas

## Claudin-low breast cancers are enriched for tumours with a TN phenotype

	Claudin-low			Basal-like		
	UNC	NKI	MDACC	UNC	NKI	MDACC
Patients	37	21	18	73	42	15
ER+	12%	33%	22%	11%	19%	0%
PR+	23%	-	22%	6%	-	13%
HER2+	22%	-	6%	9%	-	13%
TN	71%	-	61%	80%	-	73%
Grade 3	77%	38%	61%	88%	86%	93%



Prat et al, Breast Cancer Res 2010

**Cuadro 5**

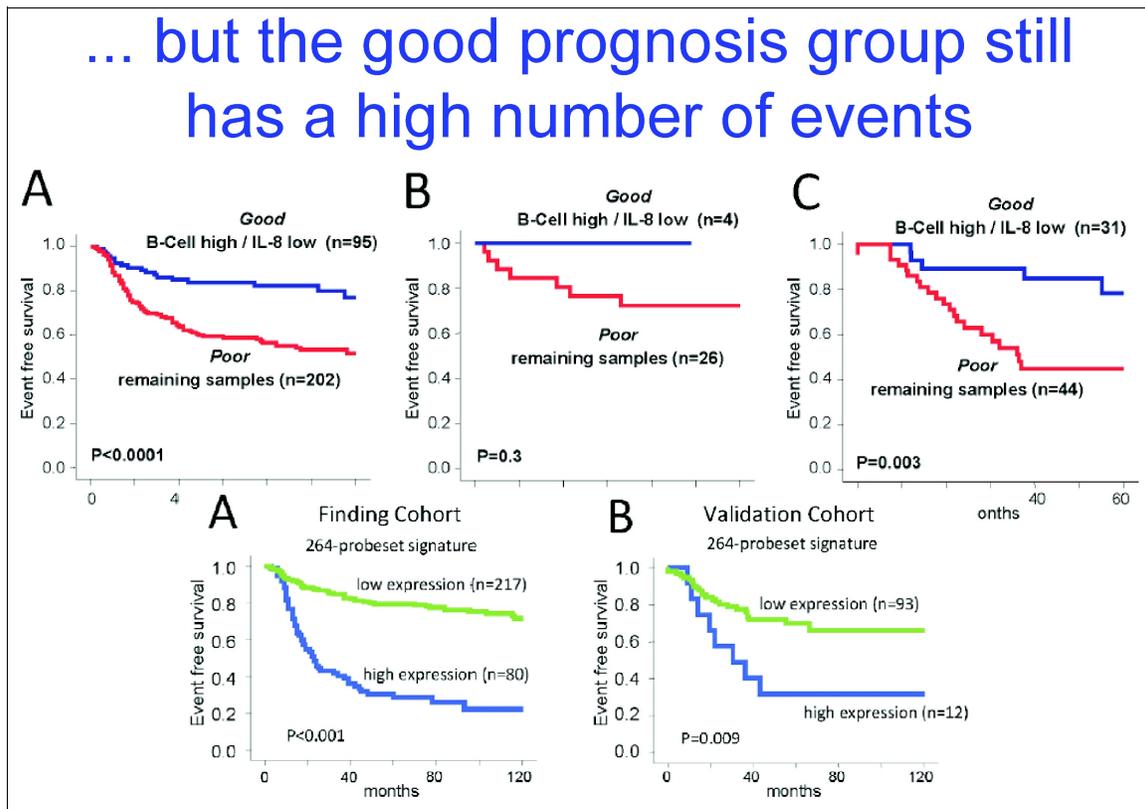
objetivas en pacientes con cánceres BCRA1 y 2. El 40% muestran respuesta objetiva a los inhibidores PARP, pero el beneficio de los inhibidores PARP como agente único está quizás limitado a las pacientes con las mutaciones BCRA1, porque en el estudio de Gelmon publicado en el *Lancet Oncology* un año después, investigaron los triple negativos con y sin mutaciones BCRA1, y observaron que el beneficio para los inhibidores PARP se restringía al grupo que tenía los tumores con mutación BCRA1; los otros no se benefician. Las conclusiones de Karen Gelmon eran en un estudio pequeño, pero lo que quiero señalar es que sí hay un subgrupo de cánceres triple negativos que es impulsado por mutaciones BCRA1 y esos tumores quizás se beneficien de la terapia con inhibidores de PARP potentes.

Pasando ahora a las características patológicas de los triple negativos y los subtipos histológicos, digamos que a pesar de los problemas

de la definición entre los triple negativos y los basales, la realidad es que algunos estudios, incluyendo los de nuestro grupo, han demostrado que los triple negativos se caracterizan por una constelación de características histopatológicas que en conjunto los hacen diferentes de otros tipos de cáncer de mama invasivo.

Son principalmente grado III, tienen un infiltrado linfocitario, bordes que empujan hacia afuera, una alta tasa de mitosis, áreas de necrosis central, características medulares que muchas veces se encuentran y elementos metaplásicos, aunque no muy frecuentes, que son característicos de los triple negativos, especialmente en cuanto a células escamosas y fusiformes. Esta constelación de características histológicas caracterizan los que se llama la variedad de los triple negativos. Ésta de ninguna manera es toda la historia completa.

Los *basal-like* y los triple negativos son un espectro de lesiones. La mayoría son alto grado



Cuadro 6

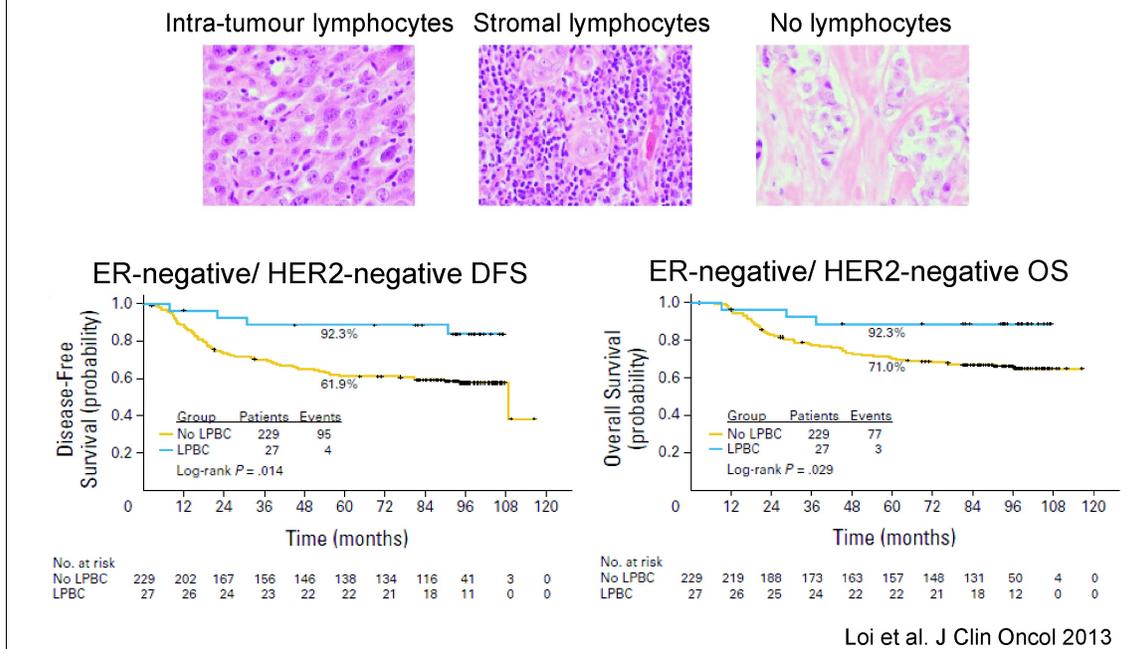
(grado III), ductales, invasivos, pero los medulares y los metaplásicos, más del 90%, son del fenotipo triple negativo y la mayoría de estas lesiones terminan siendo clasificadas como tipo basal y pueden ser *claudin-low*. Los apocrinos son fenotipo triple negativo, pero por genética nunca se clasifican como *basal-like*; son cuestiones de clasificación. Aparte de estos tumores de alto grado, hay otro subgrupo de tumores de bajo grado con una conducta indolente que siempre son del fenotipo triple negativo. Los secretores de la mama, que muchas veces afectan a pacientes prepúberes y otros que tienen un comportamiento más indolente que aquellos que están en cabeza y cuello. Estos tumores tienen algo más en común, son impulsados por translocaciones cromosómicas recurrentes que producen genes de fusión, el MYB-NFIB. Este tema de los tumores de bajo grado, indolentes,

fenotipo *basal-like*, impulsados por genes de fusión, es algo que varios grupos están investigando, porque es probable que haya otros subtipos. La heterogeneidad a nivel histopatológico no debería sorprendernos tampoco.

Los triple negativos a nivel molecular también son tremendamente heterogéneos. Inicialmente pensamos que los triple negativos y tipo basales son iguales, y ya les demostré que no. En los últimos 3 años hubo varios estudios que han demostrado que en realidad hay múltiples subtipos de la enfermedad triple negativo. Los primeros estudios se concentraron en todos los cánceres de mama, y después tratando de encontrar subtipos dentro de toda esa complejidad.

Los primeros resultados condujeron a la identificación del subtipo *claudin-low*, que fueron identificados por el análisis de modelos mu-

## “Lymphocyte-predominant” ER-negative/ HER2-negative breast cancers have a significantly better outcome



Cuadro 7

rinos. Los tumores impulsados por p53, BCRA1 muestran este subtipo *claudin-low* que se caracteriza por baja expresión de los luminales, alta expresión de los genes estromales e inflamatorios y el patrón de expresión de células iniciadoras de tumor, TCI o *stem cell cancer*. Antes se pensaba que este tumor es como una variante de triple negativo, pero lamentablemente no es necesariamente así.

Si se analiza la prevalencia y las características de los tumores *claudin-low* en distintas cohortes hay observaciones importantes (Cuadro 5). Dependiendo de la cohorte estudiada, hasta el 33% de todos los tumores *claudin-low* pueden ser RE+ como dijeron los proponentes, y aproximadamente 20% pueden ser HER2+. En cuanto al grado histológico, muchas veces pueden ser grado I y II también, dependiendo de la cohorte estudiada. Como los *basal-like* que entre el 86% y 93% son de grado III. Estas di-

ferencias de grado nos dicen que los tumores *claudin-low* muestran un pronóstico intermedio, comparados con los luminales o con los cánceres HER2+. Éste es el primer subtipo que emergió de los cánceres triple negativos.

El segundo es el subtipo apocrino molecular. Fue descrito por James Farmer y también por otro grupo en el 2005, pero fue redescubierto el año pasado en un trabajo de Charles Guedj. Analizaron muchos tumores e identificaron el subgrupo de enfermedad triple negativo que en realidad no se caracterizaba por la expresión de marcadores basales, sino más bien demostraron la regulación en más características transcriptómicas, que son consistentes con diferenciación apocrina. Lo más importante de todo este estudio, donde se concentraron no solamente en todos los cánceres de mama, sino también en los triple negativos; hicieron el análisis de expresión genética, usando un método muy elegan-

te. Identificaron seis subtipos moleculares de la enfermedad triple negativo: *basal-like 1*, *basal-like 2*, inmunomodulador, *mesenchymal-like*, MSL (*mesenchymal stem-like*) y luminal AR. Luego validaron esto en una cohorte separada y encontraron exactamente los mismos grupos. Hicieron algo más, fueron a líneas celulares de cáncer de mama e identificaron líneas celulares que recapitulaban exactamente cada uno de estos subtipos moleculares.

Lo que hicieron fue algo que nos está ayudando muchísimo, porque demostraron que diferentes tipos de cánceres triple negativos, por lo menos en los modelos preclínicos, responden a distintas terapias. Por ejemplo, el *basal-like* responde a cisplatino, mientras que el tipo mesenquimatoso parece responder a NVP-BEZ235 y el luminal AR parece mostrar una sensibilidad especial a los antiandrógenos bicalutamida. Toda esta información viene de modelos preclínicos. No hay que tomarla como la verdad absoluta, pero este abordaje nos ofrece un marco conceptual para el desarrollo de un sistema de clasificación que tenga implicaciones terapéuticas, para salir de esta idea de que el triple negativo es una sola enfermedad caracterizada por un número limitado de vías. Aquí vemos que diferentes tipos pueden ser modulados por distintas vías y que requieren distintas terapias.

Las firmas genéticas de pronóstico, en realidad, tienen poco o ningún valor en la enfermedad triple negativo, muy poco valor, ¿por qué? Porque su valor pronóstico desde MammaPrint® grado genómico, *76-gene signature*, todo viene con el tema de la proliferación.

Todos los que tienen mucha proliferación tienen mal pronóstico. El triple negativo por *default* tiene alto nivel de genes de proliferación. Entonces, si lo hacen a este *mamo signature* siempre se clasifica de mal pronóstico y no es así; no tienen valor con esta firma. Sin embargo, otros estudios hechos por otros grupos, han demostrado que la firma genética vinculada con la

respuesta inmune puede tener interés. Identificaron un módulo de 7 genes que puede separar los tumores negativos con buen o mal pronóstico. Éste es el primer intento para enfermedades negativas solamente.

Pero después otros grupos también subsiguientemente han demostrado que los genes de la respuesta inmune están asociados con el pronóstico de los cánceres de mama triple negativos. ¿Cómo funciona? A altos niveles de expresión de genes de respuesta inmune, buen resultado; bajo nivel, peor resultado.

Observando el Cuadro 6 se concluye que todas estas firmas funcionan, se pueden separar las dos curvas y hay una diferencia significativa, pero tienen su propio problema. Las curvas de buen y mal pronóstico se separan. Pero aun en el grupo de buen pronóstico, hay aproximadamente un 15% a 20% de eventos, de episodios. El buen pronóstico no es extraordinario, no es un pronóstico con el que los oncólogos se sienten tranquilos como para no ofrecer quimioterapia; entonces, la utilidad clínica de estas firmas genéticas es limitada. Si bien separan los buenos de los peores, pero no totalmente.

Estas firmas nos ayudaron de otra manera. Nos han ayudado a comprender que la respuesta inmune probablemente tiene un rol en el pronóstico de la enfermedad triple negativo.

Luego el grupo de Loi y otros grupos, y el Breast International Group, reanalizaron los materiales del estudio 298 y han demostrado que los triple negativos con lo que se llama el fenotipo predominante linfocito tenían un resultado extraordinario. Cuantificaron éstos en tumores con más del 50% de linfocitos, ricos en linfocitos y pobres en linfocitos. En el Cuadro 7 se puede ver los triple negativos ricos en linfocitos, 92,3% de buen resultado y vivas. Los tumores sin esa buena riqueza linfocitaria tienen peor resultado. Ese estudio nos da evidencia a nivel II como para demostrar que los cánceres triple negativos que tienen el fenotipo rico en linfocitos, proba-

Molecular subtypes: genetic features				
	Lum A	Lum B	Basal-like	HER2-enriched
PI3K pathway				
<i>PIK3CA</i>	49%	32%	7%	42%
<i>PTEN</i> mut/ loss	13%	24%	35%	19%
<i>INPP4B</i> mut/ loss	9%	16%	30%	30%
TP53 pathway				
<i>TP53</i> mut	12%	32%	84%	75%
<i>MDM2</i> gain	14%	31%	14%	30%
RB pathway				
<i>CCND1</i> amp	29%	58%	Rare	38%
<i>CCNE1</i> amp	Rare	Rare	9%	Rare
<i>CDK4</i> gain	14%	29%	Rare	25%
RB1	High exp	NS	Low exp Mut/ loss (20%)	NS

TCGA. Nature 2012

Similar to high grade serous carcinomas of the ovary and lung squamous cell carcinomas

Cuadro 8

blemente tengan muy buen pronóstico. Nos da evidencia a nivel II para sostener esta afirmación.

En conclusión, los cánceres triple negativos no son una sola enfermedad, hay subtipos moleculares que podrían tener implicaciones terapéuticas potenciales. Las firmas de pronóstico de primera generación no son útiles y la respuesta inflamatoria puede ser de pronóstico. Aunque resulta sumamente interesante que el contar linfocitos pueda tener valor de pronóstico, creo que va a ser muy difícil implementarlo en la práctica clínica.

La característica de los cánceres triple negativos es la presencia de las mutaciones p53. Estos tumores tienen una variabilidad muy grande en cuanto a su patrón de mutaciones y aberraciones del número de copias.

Pero cuando uno anota las aberraciones en cuanto a la vía, aparece un patrón. Las dos vías más comúnmente inactivadas en la enfermedad triple negativo son la vía de p53, que es la alteración más común. El 84% de los tumores que no tienen p53 tienen aplicación de MDM2, que es inactivador de p53. En cuanto a la vía RB

también está disfuncionando cantidad sustancial de estos triple negativos. ¿Cómo se activa? Esto es distinto en los triple negativos, comparados por ejemplo con los luminales. En los luminales la vía RB está inactivada debido a una amplificación de ciclina 1, en los triple negativos es una amplificación de ciclina E, no ciclina A. Se han comparado estos tumores con otros tipos de cánceres o cánceres en otros sitios. Los triple negativos son más similares a carcinomas serosos de alto grado del ovario y del pulmón, que a cualquier otro tipo de cáncer de mama, demostrando nuevamente que como grupo son completamente diferentes de otros tumores vecinos (Cuadro 8).

Los cánceres triple negativos son una colección de una enfermedad completamente diferente. En un estudio de Shah secuenciaron todos los genomas de 102 cánceres triple negativos. Lo primero que hicieron fue cuantificar el número de mutaciones, simplemente contar el número de mutaciones. En el grupo de triple negativo varió de más de 200 a sólo 1 o 2; o sea, un espectro enorme en cuanto a la cantidad de mutaciones que tienen estos tumores; aunque

son tan diversos que todavía los llamamos una sola enfermedad. Creo que esto recalca un aspecto muy importante, que la expresión cáncer triple negativo es solamente operativo, pero en realidad, es toda una colección de tumores muy diversa, tremendamente diversa. Otra cosa que se recalca en este estudio es que cuando secuenciaron los tumores, también pudieron determinar el porcentaje de células tumorales de cada tumor que tenían una cierta mutación. Usando este método pudieron ver el porcentaje de células cancerosas del tumor con esa mutación. Aun para mutaciones como p53 o PIK3CA había algunas que estaban presentes sólo un 20-30%, mostrando que un número sustancial de cánceres

triple negativos, en realidad son mosaicos de células cancerosas.

En conclusión, en esta charla espero haberles mostrado que los cánceres triple negativos son un grupo heterogéneo de tumores, que como grupo tienen una conducta clínica más agresiva pero también una alta tasa de respuesta a la quimioterapia. Que hay subtipos con buen resultado. Además, los triple negativos con predominancia linfocitaria son mejores, tienen un repertorio complejo de mutaciones somáticas. Hay algunos subgrupos con varias mutaciones y tumores compuestos de mosaicos de células cancerosas, con distinto tipo de aberraciones genéticas. Quisiera agradecerles su atención.