

## SESIÓN CIENTÍFICA

# Heterogeneidad de HER2 por inmunohistoquímica e hibridación in situ y su rol predictivo en la respuesta patológica completa en cáncer de mama con tratamiento neoadyuvante

María B. Ancao<sup>1</sup>, Federico Waisberg<sup>2</sup>, María T. Pombo<sup>3</sup>, Carlos M. Loza<sup>1</sup>, Verónica Y. Fabiano<sup>1</sup>, María V. Costanzo<sup>2</sup>, Adrián A. Nervo<sup>2</sup>, Mora Amat<sup>4</sup>, María A. Perazzolo<sup>1</sup>, Luciana Sabatini<sup>1</sup>, Federico A. Coló<sup>1</sup>

## RESUMEN

### Introducción

La heterogeneidad en la expresión de HER2 en el cáncer de mama puede predecir la resistencia a las terapias dirigidas.

### Objetivo

Nuestro objetivo principal fue determinar si la heterogeneidad representa un factor predictivo de enfermedad residual en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2 +++ que efectuaron tratamiento neoadyuvante, considerando otras variables confundidoras.

### Materiales y método

Se realizó un estudio de cohorte retrospectiva, analítica y cerrada, que incluyó pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2 +++, que efectuaron tratamiento neoadyuvante en el Instituto Alexander Fleming en el periodo comprendido entre 2019 y 2023.

1 Servicio de Mastología, Instituto Alexander Fleming.

2 Servicio de Oncología, Instituto Alexander Fleming.

3 Servicio de Inmunohistoquímica, Instituto Alexander Fleming.

4 Servicio de Anatomía Patológica, Instituto Alexander Fleming.

## Resultados

De un total de 107 pacientes con cáncer de mama HER2 +++ que realizaron quimioterapia neoadyuvante, 11,2% (12 pacientes) presentaron heterogeneidad para la expresión de HER2. Nueve pacientes que no alcanzaron pCR (23,70%) y 3 pacientes que la lograron (4,30%), presentaban heterogeneidad tumoral, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

## Conclusiones

Nuestros hallazgos determinan que la presencia de heterogeneidad sería un factor predictivo de una respuesta menos favorable al tratamiento. Es importante el reconocimiento de la heterogeneidad de HER2 y su reporte tanto en la punción biopsia como en los clones resistentes de la pieza quirúrgica post neoadyuvancia y en los ganglios linfáticos.

## Palabras Clave

Heterogeneidad intratumoral de HER2, Cáncer de mama, Respuesta patológica completa, Inmunohistoquímica, Quimioterapia neoadyuvante.

## *ABSTRACT*

### Introduction

Heterogeneity in HER2 expression in breast cancer may predict resistance to targeted therapies.

### Objective

Our main objective was to determine whether heterogeneity represents a predictive factor of residual disease in patients diagnosed with HER2+++ breast cancer who underwent neoadjuvant treatment, and whether it presents a predictive factor for the evaluation of complete response, considering other confounding variables.

## Materials and method

A retrospective, analytical, closed-label cohort study was conducted, which included patients diagnosed with HER2+++ breast cancer, who underwent neoadjuvant treatment at the Alexander Fleming Institute between 2019 and 2023.

## Results

Of a total of 107 patients with HER2+++ breast cancer who underwent neoadjuvant chemotherapy, 12 patients, 11.2%, had heterogeneity for HER2 expression. Nine patients who did not achieve pCR (23.70%) and three patients who did (4.30%) exhibited tumor heterogeneity. This difference was statistically significant.

## Conclusions

Our findings determine that the presence of heterogeneity would be a predictive factor of a less favorable response to treatment. It is important to recognize the heterogeneity of HER2 and report it, both in the biopsy, and in the resistant clones of the post-neoadjuvant surgical specimen and the lymph nodes.

## Key words

Intratumoral HER2 Heterogeneity, Breast Cancer, Pathologic Complete Response, Immunohistochemistry, Neoadjuvant Chemotherapy

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama con sobreexpresión/amplificación del receptor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2) presenta una prevalencia de 15 a 20% de los carcinomas invasores de mama.<sup>1,2,3,4,5</sup> Es comúnmente asociado con mayor grado histológico, mayor potencial metastásico, disminución de la supervivencia global, resistencia a la terapia endocrina y mala respuesta a algunas quimioterapias.<sup>6,7,8</sup> Es fundamental que, en todos los casos de carcinoma invasor, ya sea temprano, recurrente o metastásico, se realice una determinación precisa de la expresión de HER2. Para ello se utilizan técnicas de inmunohistoquímica<sup>9</sup> y de hibridación in situ fluorescente o cromogénica (FISH/CISH)<sup>10,11</sup>, las cuales requieren de una adecuada fijación y procesamiento del tejido.<sup>1,2,3,12,13</sup>

Es importante tener en cuenta que la presencia de heterogeneidad intratumoral es una característica común de todo tipo de cáncer, ya que surge a partir de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, las cuales pueden variar entre distintos clones en una población tumoral.<sup>14</sup>

Se ha demostrado que la heterogeneidad en la expresión de HER2 puede predecir la resistencia a las terapias dirigidas, lo que resalta su importancia en el diagnóstico, al momento de seleccionar el tratamiento.<sup>1,15,16</sup> Es decir, la definición precisa histológica de la heterogeneidad en la expresión de HER2, resulta de gran impacto para optimizar la selección de terapias dirigidas anti HER y reducir los regímenes terapéuticos estandarizados.

La heterogeneidad intratumoral de HER2 (ITH) se define como subclones diferentes genéticamente intercalados o espacialmente separados, cuya arquitectura varía en el transcurso de la enfermedad. Las áreas dentro del mismo tumor pueden presentar diferentes niveles de expresión de proteínas o amplificación de genes.<sup>1,2,16</sup>

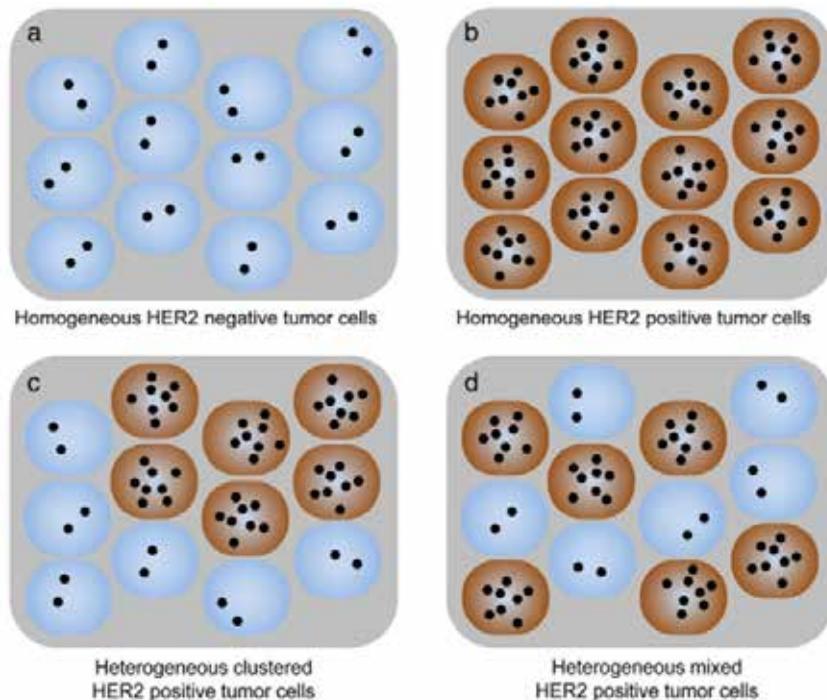
Se presentan tres patrones con respecto a la distribución geográfica de heterogeneidad, según la amplificación génica (Figura 1):<sup>1,2,12,17</sup>

1) Tipo agrupado (regional), definido como dos áreas distintas con diferentes poblaciones de células tumorales amplificadas con el gen HER2.

2) Tipo mosaico (entremezclado), definido como una mezcla difusa de células con diferentes estados de amplificación del gen HER2.

3) Tipo disperso, definido como células tumorales amplificadas con HER2 aisladas en un tumor predominantemente no amplificado.<sup>2,12,17</sup>

**Figura 1.** Patrón de expresión de HER2 y tipos de heterogeneidad intratumoral en cáncer de mama.



a) HER2 negativo en todas las células. b) HER2 positivo en todas las células. c) HER2 heterogéneo: clones HER2 positivos con patrón de células agrupadas d) HER2 heterogéneo clones HER2 positivos con patrón de células dispersas/mosaico 2 "The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future"

Existen estudios recientes que utilizan GPA (HER2 gene-protein assay)<sup>2,3,15</sup> como técnica de detección novedosa, que consiste en la combinación de inmunohistoquímica junto a ISH, para la evaluación de la expresión de la proteína HER2 y la amplificación del gen en forma simultánea en un solo portaobjetos, lo que permite ver amplificación del gen y expresión proteica del HER2 en las mismas células tumorales. Con la ayuda de esta técnica, la ITH puede ser genética o no genética.<sup>1,2,3,15</sup>

El tumor con ITH genética muestra la coexistencia de células tumorales HER2 positivas clásicas con amplificación del gen HER2 y sobreexpresión de la proteína HER2, y células tumorales HER2 negativas sin amplificación del gen HER2 o sobreexpresión de la proteína HER2. El tumor con ITH no genética, presenta células tumorales con amplificación del gen HER2 pero sin sobreexpresión de la proteína HER2, y células tumorales clásicas positivas para HER2.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo Primario**

El objetivo de este estudio fue determinar si la heterogeneidad representa un factor predictivo de enfermedad residual en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2 +++ que efectuaron tratamiento neoadyuvante y si la heterogeneidad representa un factor predictivo para la evaluación de respuesta completa, considerando otras variables confundidoras como receptores hormonales positivos, tamaño tumoral y presencia de compromiso ganglionar al momento del diagnóstico.

### **Objetivo Secundario**

Evaluar la incidencia de heterogeneidad en una cohorte institucional de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER 2 +++.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

Se realizó un estudio de cohorte retrospectiva, analítica y cerrada, que incluyó 107 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2 +++ que efectuaron tratamiento neoadyuvante en el Instituto Alexander Fleming en el periodo comprendido entre 2019 y 2023. En la población seleccionada se incluyeron pacientes con diagnóstico histológico e inmunohistoquímico realizado en nuestra institución,

con resultado HER2 +++, que recibieron tratamiento neoadyuvante con bloqueo anti-HER2, ya sea como parte del abordaje inicial del tumor primario o en el contexto de una recidiva locorregional. En este trabajo no fueron incluidas aquellas pacientes con inmunohistoquímica HER2 ++ y amplificación de ISH, dada su escasa representación. También fueron excluidas pacientes con diagnóstico de embarazo durante el tratamiento neoadyuvante, diagnóstico de enfermedad avanzada y aquellas que recibieron primero tratamiento quirúrgico.

Las siguientes consideraciones fueron efectuadas para el análisis de la estadificación de pacientes:

Se definió heterogeneidad en conformidad a las guías ASCO/CAP 2013 y 2018.<sup>13,18</sup> Se llamó heterogénea a toda muestra que tuviera presencia de una segunda población de células, de las cuales el 10% o más eran células tumorales con un número de copias de HER2 distinta y/o una relación HER2/CEP17 diferente. Se debe realizar e informar un recuento por separado de al menos 20 células que no se superpongan dentro de esta población. La directriz de 2018 reconoció que se pueden encontrar patrones inusuales de expresión de inmunohistoquímica (IHQ) de HER2, incluida una tinción intensa y completa en menos del 10% de las células tumorales.

En conformidad con dichas guías, el tiempo de isquemia fría fue inferior a una hora y la duración de la fijación del tejido en formalina tamponada neutra al 10%, de 6 a 72 horas.<sup>2,13</sup>

Todas las muestras, tanto de mama como de la axila, fueron revisadas retrospectivamente por profesionales de patología de nuestra institución para la confirmación de heterogeneidad.

Para el análisis de las variables, se tomaron en cuenta determinados parámetros.

Se evaluó la presencia de ganglios axilares positivos mediante la revisión de la historia clínica de las pacientes. Aquellas que presentaban adenopatías en la ecografía de partes blandas axilar fueron sometidas a una punción bajo guía ecográfica con aguja gruesa o a una punción aspiración con aguja fina.

El tamaño tumoral se determinó mediante ecografía, siendo esta modalidad más utilizada que la resonancia magnética.

Las pacientes de este estudio cumplían los requisitos para recibir quimioterapia neoadyuvante. En su gran parte realizaron tratamiento neoadyuvante con Docetaxel, Carboplatino y Trastuzumab - Pertuzumab.

Para evaluar la respuesta patológica completa, se empleó la clasificación de carga tumoral residual (RCB).<sup>19</sup>

Se utilizó estadística descriptiva utilizando medias, medianas, rangos intercuartilo, proporciones e intervalos de confianza, según corresponda. Asimismo, se describieron las variables registradas en el estudio, comparando su prevalencia en la población con heterogeneidad respecto al resto de la muestra incluida utilizando tests estadísticos de t y chi cuadrado, para variables continuas y categóricas, respectivamente.

Se efectuó una evaluación de regresión logística para estudiar si otras variables habitualmente relacionadas con la predicción de enfermedad residual actuaban en forma independiente a la presencia de heterogeneidad. Entre las mismas incluimos: status ganglionar, categorización del tamaño tumoral por TNM, expresión de receptores estrogénicos y presencia o ausencia de heterogeneidad.

Se consideró una prevalencia de heterogeneidad de HER2 +++ de 15% considerando los estudios efectuados en CISH. Se asumió que los pacientes que tuvieron heterogeneidad tendrían una pCR del 10%, mientras que los que no tienen heterogeneidad, una pCR del 50%. En base a estas premisas, el tamaño muestral mínimo fue 68.

El análisis estadístico fue efectuado con el software R versión 14.0.0.<sup>120</sup>

## *RESULTADOS*

De la base de datos del centro mamario del Instituto Alexander Fleming en el período comprendido entre enero de 2019 y diciembre de 2023, se seleccionaron 107 pacientes con cáncer de mama HER2 +++ que realizaron quimioterapia neoadyuvante y luego fueron sometidas a cirugía.

Dentro de este grupo de 107 pacientes solo 12 (11,2%) presentaron heterogeneidad para la expresión de HER2.

Se resumen las principales características de la población incluida en la Tabla 1 y 2.

**Tabla 1.** Características clínicas y biológicas según el status de heterogeneidad HER2.

	Sin heterogeneidad (N=95)	Con heterogeneidad (N=12)	p
N (%)	95 (88,78)	12 (11,22)	
Edad	49 (RIC 43-57)	50 (RIC 41-55,5)	0,54
RH positivos (%)	49 (51,6)	9 (75)	0,22
RH negativos (%)	46 (48,4)	3 (25)	
Estadio tumoral (%)			0,49
T1	42 (44,7)	4 (33,3)	
T2	45 (47,9)	6 (50)	
T3	7 (7,4)	2 (16,7)	
Axila clínicamente positiva	45 (47,4)	7 (48,3)	0,62
Tamaño tumoral cm (mediana)	2,3 (RIC 1,8-3,2)	3 (RIC 2,25-5,4)	0,36
Receptores hormonales %			
RE (%) Biopsia (mediana)	5 (RIC 0-90)	90 (RIC 0-98)	0,015
RP (%) Biopsia (mediana)	0 (RIC 0-50)	55 (RIC 2,5-75)	0,033
Tumorectomía (%)	47 (49,5)	3 (25)	0,19
Biopsia Ganglio Centinela (%)	77 (81,1)	9 (75)	<0,001
Axila positiva post neoadyuvancia ypN + (%)	9 (9,44)	7 (58,3)	<0,001
Respuesta patológica completa pCR (%)	66 (69,5)	3 (25)	0,007

\*RIC: Razón Intercuartilica

**Tabla 2.** Características clínicas y biológicas según respuesta del tratamiento.

	Sin respuesta completa (N=95)	Con respuesta completa (N=12)	p
N (%)	38 (35,51)	69 (64-49)	
Edad	47 (RIC 42,5-56,5)	50 (RIC 46-56)	0,95
RH positivos (%)	30 (78,90)	28 (40,60)	<0,001
RH negativos (%)	8 (21,1)	41 (59,4)	
Estadio tumoral (%)			0,49
T1	22 (44,70)	24 (35,30)	
T2	15 (47,90)	36 (52,90)	
T3	1 (7,40)	8 (11,80)	
Axila clínicamente positiva	19 (50)	33 (47,80)	0,98
Tamaño tumoral cm (mediana)	2 (RIC 1,7-3)	2,5 (RIC 2-3,6)	0,012
Receptores hormonales %			
RE (%) Biopsia (mediana)	80 (RIC 25-98)	0 (RIC 0-80)	<0,001
RP (%) Biopsia (mediana)	50 (RIC 0-80)	0 (RIC 0-30)	<0,001
Tumorectomía (%)	17 (44,70)	33 (47,80)	0,91
Biopsia Ganglio Centinela (%)	29 (76,30)	57 (83)	0,15
Axila positiva post neoadyuvancia ypN + (%)	16 (42,10)		
Respuesta patológica completa pCR (%)	9 (23,70)	3 (4,30)	0,007

\*RIC: Razón Intercuartilica

## Edad

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad tanto en pacientes con pCR como en el diagnóstico de heterogeneidad tumoral.

## Receptores hormonales

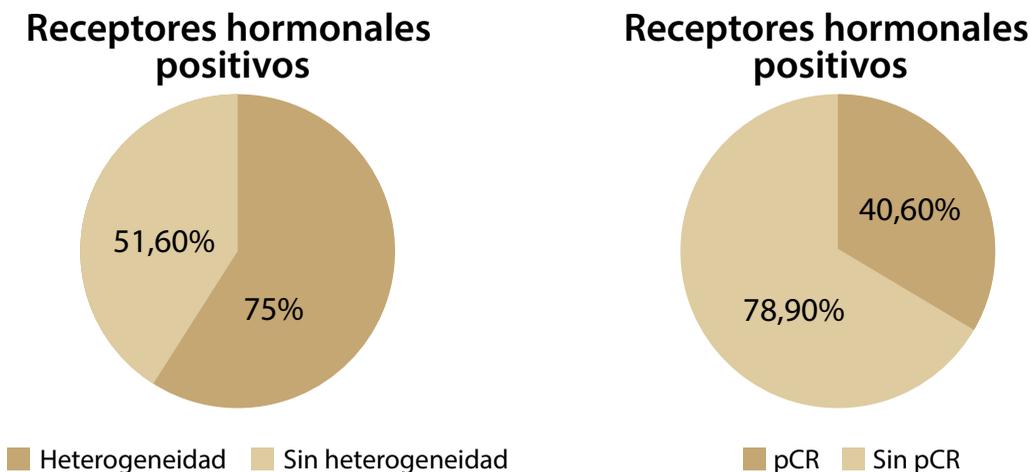
La expresión de receptores hormonales (RH) positivos fue mayor en la población con heterogeneidad: 51,6% en pacientes sin heterogeneidad y 75% en pacientes con heterogeneidad (Gráfico 1).

Aquellas con heterogeneidad en la muestra mostraron una mediana de expresión de RH en la biopsia de 90% (RIC 0-98), mientras que las pacientes sin heterogeneidad, presentaron una mediana de expresión de RH de 5% (RIC 0-90) ( $p=0,015$ ). Lo mismo sucedió con los receptores progestínicos (RP) en biopsia, con una mediana de 55% para heterogeneidad (RIC 2,5-75) y 0% (RIC 0-50) sin heterogeneidad ( $p = 0,033$ ).

El porcentaje de pacientes con RH positivos fue significativamente mayor en el grupo sin respuesta patológica completa (pCR) con un 78,90%, en comparación con el grupo con pCR, donde el porcentaje fue del 40,60%. Este hallazgo fue estadísticamente significativo, con un valor de  $p < 0,001$  (Gráfico 1).

Para el grupo sin pCR, la mediana de expresión de RE en biopsia fue 80% (RIC 25-98). En comparación al grupo con pCR, la mediana de expresión de RE fue de 0% (RIC 0-80). Lo mismo ocurrió con los RP en biopsia, el grupo sin pCR presentó una mediana de expresión de 50% (RIC 0-80) y con pCR 0% (RIC 0-30), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

**Gráfico 1.** Asociación entre receptores hormonales positivos, heterogeneidad tumoral y pCR.



## Tamaño tumoral

En ambos grupos de pacientes, predominaron los tumores de tamaño T2 (entre > 2 y hasta 5 cm) según TNM.

En pacientes que no presentaban heterogeneidad en HER2, se observaron tumores de tamaño igual o menor a 2 cm (T1) en 42 pacientes (44,7%), entre > 2 y hasta 5 cm (T2) en 45 pacientes (47,9%) y tumores mayores a 5 cm (T3), en 7 pacientes (7,4%).

En pacientes con heterogeneidad en HER2, se encontraron tumores de tamaño igual o menor a 2 cm (T1) en 4 pacientes (33,30%), entre 2 y hasta 5 cm (T2) se observaron en 6 pacientes (50%) y tumores mayores a 5 cm, en 2 pacientes (16,7%).

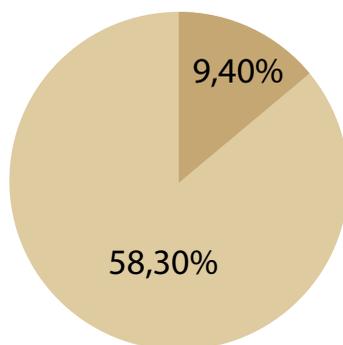
De las pacientes que alcanzaron pCR, 24 pacientes (35,30%) tenían tumores T1, 36 pacientes (52,90%), tumores T2 y 8 pacientes (11,80%), tumores T3. De aquellas sin pCR, 22 pacientes (44,70%), 15 pacientes (47,90%) y 1 paciente (7,40%) tenían tumores T1, T2 y T3, respectivamente.

En cuanto al tamaño (centímetros) las pacientes con heterogeneidad presentaban una mediana de 3 (RIC 2,25-5,4), mientras que las pacientes sin heterogeneidad una mediana de 2,3 (RIC 1,8-3,2), con un valor de  $p=0,36$ .

La mediana de tamaño tumoral fue de 2 cm (RIC 1,7-3) para pacientes sin pCR y de 2,5 cm (RIC 2-3,6) para las que alcanzaron pCR ( $p = 0,012$ ).

**Gráfico 2.** Asociación entre metástasis axilar en anatomía patológica y heterogeneidad HER2.

### Metástasis axilar en anatomía patológica



■ Sin heterogeneidad ■ Con heterogeneidad

## Status ganglionar

De las pacientes sin heterogeneidad en la expresión de HER2, 45 pacientes (47,4%) presentaron ganglios axilares positivos confirmados mediante ecografía de partes blandas axilar y biopsia, mientras que, de las pacientes con heterogeneidad, 7 pacientes (48,30%) presentaron ganglios axilares positivos.

Diecinueve pacientes (50%) que no alcanzaron pCR y 33 pacientes (47,80%) de las que si lograron pCR, tenían axila clínicamente positiva.

Dentro del grupo de pacientes sin heterogeneidad, se encontró que 9 pacientes (9,44%) presentaban metástasis axilares en la anatomía patológica (Gráfico 2). En comparación, en las pacientes con heterogeneidad, se observó metástasis axilares en 7 pacientes, lo que representa el 58,30% de este subgrupo. Este hallazgo fue estadísticamente significativo, con un valor de  $p < 0,001$ .

### **Cirugías realizadas**

Se realizó tumorectomía en un total de 47 pacientes que no presentaban heterogeneidad en HER2, lo que representó el 49,5% de la muestra. Por otro lado, en el grupo de pacientes con heterogeneidad en HER2, se realizó tumorectomía en 3 pacientes, lo que constituye el 25% de este subgrupo.

Las pacientes que fueron sometidas a mastectomía sin heterogeneidad fueron 49 pacientes (51,60%), siendo 9 pacientes (75%) las que realizaron mastectomía dentro de las pacientes con ITH HER2.

En cuanto a la cirugía axilar, se llevó a cabo la biopsia del ganglio centinela en un total de 77 pacientes, lo que equivale al 81,10% de las pacientes sin heterogeneidad. A diferencia de las pacientes con heterogeneidad, la biopsia del ganglio centinela se realizó en 9 pacientes (75%) ( $p < 0,001$ ). Las pacientes sometidas a linfadenectomía fueron 21 pacientes, representando un 18,95% de las pacientes sin heterogeneidad, y 3 pacientes con heterogeneidad HER2.

Se realizó tumorectomía en el 47,80% de las pacientes que obtuvieron pCR y en el 44,70% de las que no la alcanzaron.

Se practicó biopsia de ganglio centinela en 57 pacientes (83%) de las pacientes que presentaron pCR, mientras que se realizó dicha técnica quirúrgica en 29 pacientes (76,30%) de las que no mostraron pCR.

### **Cambios en la expresión HER2 en la cirugía**

En nuestro estudio, se observaron cambios en la expresión de HER2 en la cirugía. Una paciente experimentó un cambio, pasando a un HER2 low (Score 1+). Este cambio se correlacionó con quimio resistencia (RCB III) y con heterogeneidad en la biopsia. Otros cinco casos presentaron resultados equívocos de HER2 (Score 2+) en la cirugía. De estos, solo uno mostró heterogeneidad intratumoral en la biopsia, mientras que en los otros cuatro no fue posible determinar la presencia de heterogeneidad, ya que tres de estos casos tenían biopsias de otras instituciones.

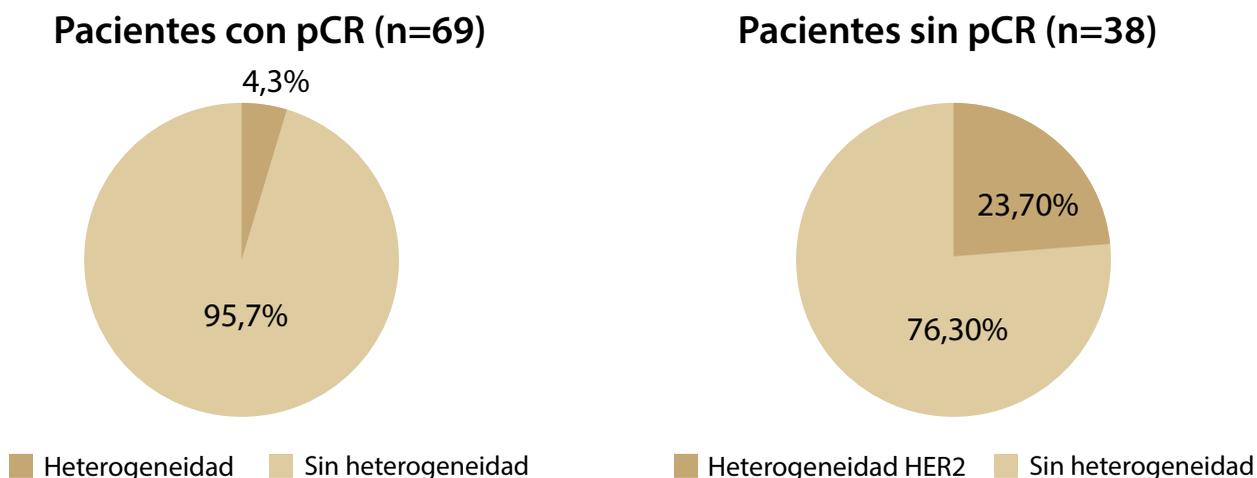
En otro caso, una paciente cuya biopsia fue revisada en el servicio de inmunohistoquímica del Instituto y no mostraba heterogeneidad, resultó con HER2 negativo (Score 0) en la cirugía.

### **Heterogeneidad HER2 en pacientes con y sin respuesta patológica completa (pCR)**

Se observó que 9 de las 12 pacientes con heterogeneidad HER2 (75%) no alcanzaron respuesta patológica completa (pCR), mientras que únicamente 3 pacientes (25%) lograron pCR.

Al analizar la distribución de la heterogeneidad según la respuesta al tratamiento (Gráfico 3), se encontró que entre las pacientes sin pCR (n = 38), 9 presentaban heterogeneidad (23,7%), mientras que entre las pacientes con pCR (n = 69), solo 3 presentaban heterogeneidad (4,3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p=0,007). Estos hallazgos sugieren una posible asociación entre la presencia de heterogeneidad HER2 y una menor probabilidad de respuesta completa al tratamiento neoadyuvante.

**Gráfico 3.** Asociación entre pCR y heterogeneidad HER2.



**Tabla 3.** Análisis univariado y multivariado.

	OR p univariado	OR p multivariado
<b>Heterogeneidad intratumoral HER2 (HIT)</b>	0.5 (IC 95 0.03-0.53) p=0.006	0.17 (IC 95 0.03-0.66) p=0.01
<b>Receptores hormonales positivos</b>	0.18 (IC 95 0.07-0.44) p=0.0002	0.19 (IC 95 0.07-0.48) p=0.00062

Se realizó un análisis univariado y multivariado para evaluar el posible efecto confundidor de la variable receptores hormonales positivos sobre la asociación entre heterogeneidad HER2 y la respuesta patológica completa (pCR) (Tabla 3). Tal como se observa en la Tabla 1, la mayoría de las pacientes con heterogeneidad presentaban receptores hormonales positivos, lo que podría influir en la relación observada.

Se observa que, para cada una de las variables, existe una asociación con una menor probabilidad de alcanzar pCR, donde ser heterogéneo

y tener receptores hormonales positivos condiciona a tener relativamente un 80% menos de pCR. En el análisis multivariado advertimos que esta asociación es independiente, con valores de p significativos, lo que indica que ninguna de las dos variables depende de la otra para predecir la ausencia de respuesta completa.

## DISCUSIÓN

La heterogeneidad intratumoral en HER2 se observa en aproximadamente 10-40% de los cánceres de mama.<sup>1,12</sup> Se ha demostrado que los tumores con heterogeneidad de HER2 se asocian con mayor tamaño, mayor grado y positividad de los ganglios linfáticos regionales, datos vinculados con mal pronóstico.<sup>1,16</sup> Más aún, se relaciona con una sobrevida libre de enfermedad más corta, una menor sobrevida global y una menor respuesta a las terapias dirigidas anti-HER2.<sup>1,6,16</sup>

Son pocos los datos publicados y los estudios que evalúan la respuesta al tratamiento en pacientes con heterogeneidad HER2, con terapia neoadyuvante y cirugía posterior.

Yanjun Hou y col.<sup>15</sup> realizaron un estudio que incluyó a 64 pacientes, de las cuales 19 (30%) presentaban heterogeneidad intratumoral en HER2. Los autores utilizaron la técnica combinada de GPA para la detección de heterogeneidad y determinaron que la heterogeneidad de HER2 representa un factor independiente para una respuesta incompleta en las pacientes que realizaron quimioterapia neoadyuvante. En este estudio, se encontró que el grupo sin pCR tenía una proporción significativamente mayor de casos con heterogeneidad HER2 (56%, 14 de 25) en comparación con el grupo con pCR (13%, 5 de 39). Entre los casos sin ITH hubo pCR en el 76% de los pacientes, en comparación a tan sólo el 26% de los casos con ITH detectable. A diferencia de nuestro estudio, realizaron quimioterapia neoadyuvante 57 pacientes con 4 ciclos con Doxorubicina - Ciclofosfamida (AC) seguido de paclitaxel, docetaxel y trastuzumab, y 7 pacientes recibieron 4 ciclos con AC seguido de pertuzumab, trastuzumab, docetaxel.

Cabe destacar que nuestro estudio incluyó pacientes con puntuación HER2 +++, la mayoría de las cuales habían recibido quimioterapia neoadyuvante con seis ciclos de Docetaxel, Carboplatino y terapia anti-HER2 con Pertuzumab y Trastuzumab, que es el tratamiento estándar más habitual en nuestro medio para este tipo de cáncer de mama.

Otro estudio a tener en cuenta, que evaluó la asociación entre heterogeneidad HER2 y respuesta patológica completa (pCR) es el trabajo de Otto Metzger Filho y col.<sup>21</sup>, en el cual la heterogeneidad fue analizada mediante FISH en biopsias obtenidas de dos áreas distintas del tumor. Las pacientes incluidas presentaban cáncer de mama estadio II-III y recibieron tratamiento neoadyuvante con seis ciclos de TDM-1 junto a pertuzumab. En este estudio, la heterogeneidad HER2 se detectó en el 10% de los casos (16 de 157 pacientes evaluables). La tasa de pCR fue del 55% en pacientes sin heterogeneidad, mientras que fue del 0% en pacientes con heterogeneidad HER2, diferencia que resultó estadísticamente significativa ( $p=0,0001$ ).

Por otro lado, hay estudios que indican que la expresión de HER2 en el cáncer de mama puede verse influenciada por la quimioterapia neoadyuvante y/o terapia anti HER2, que puede generar cambios en el estado HER2 postratamiento. Si bien la expresión de HER2 generalmente es estable en el transcurso de la enfermedad, a diferencia de los receptores hormonales, se han reportado casos modificados cuyos hallazgos se asociaron a una pobre sobrevida libre de recurrencia, por lo que consideramos esencial reevaluar el estado de HER2 en el tumor residual tras la cirugía.<sup>6,22</sup>

Un cambio en el estado de HER2 puede reflejar ITH. El trastuzumab puede eliminar clones tumorales con sobreexpresión de HER2, dejando solo células con menor expresión, lo que sugiere un mecanismo de resistencia.<sup>6,15,16,22,23</sup>

La discordancia de la expresión de HER2 entre el tumor primario y el residual se asoció a mal pronóstico o falta de pCR.<sup>1,24,23</sup>

Estos resultados apuntan a la necesidad de terapias combinadas y enfoques personalizados para tratar el cáncer de mama, con un enfoque particular en la heterogeneidad tumoral.

En el estudio DESTINY-Breast 04,<sup>25</sup> los pacientes con cáncer de mama metastásico con HER2 low tratados con T-DXd (Trastuzumab-Derux-tecan) mostraron una sobrevida libre de progresión y una sobrevida global significativamente más prolongadas que con la quimioterapia elegida por el médico. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-HER trastuzumab-derux-tecan (T-DXd) que actúa eficazmente contra las células que expresan HER2, después de que las catepsinas lisosomales escinden el conector en las células positivas para HER2, el fármaco liberado es permeable a la membrana celular y puede afectar a las células cercanas mediante un efecto bystander, independientemente del estado de expresión de HER2.<sup>26,27</sup>

La actividad antitumoral de T-DXd en tumores heterogéneos o con baja expresión de HER2, puede estar relacionada con el efecto sobre las células cercanas o con una alta proporción fármaco-anticuerpo.<sup>26,27,28</sup>

Por estas razones, la indicación de este anticuerpo conjugado resulta atractiva en tumores con heterogeneidad tumoral, tanto las células con alta y baja expresión pueden ser alcanzadas por esta droga. Asimismo, dado el efecto “bystander”, aquellas células sin expresión de HER2 también podrían recibir tratamiento citotóxico, mediante la carga incorporada al anticuerpo.

HER2DX<sup>29,30,31</sup> es una plataforma genómica validada en 2022, basada en la expresión de 27 genes y características clínicas, capaz de proporcionar 2 puntuaciones para predecir el pronóstico a largo plazo, como la probabilidad de pCR en cáncer de mama temprano HER2+++ con un régimen neoadyuvante reducido y sin quimioterapia. El ensayo integra información clínica como tamaño tumoral y status ganglionar, e información biológica como respuesta inmune, diferenciación luminal, la proliferación de células tumorales y la expresión del amplicón cromosómico HER2 17q<sup>12-21</sup>, incluido en el gen ERBB2.<sup>29,30,31</sup> En esta plataforma la heterogeneidad no está incorporada. Pensamos que nuestros hallazgos, deberían apoyar el poder incorporar la heterogeneidad como factor predictivo para determinar pCR.

Hay que reconocer que nuestro estudio presentó ciertos sesgos, como, por ejemplo, de las 12 pacientes con heterogeneidad en HER2, tres tenían biopsias que provenían de otras instituciones, las cuales no informaron sobre la heterogeneidad en las muestras. Esto dificulta el saber si ya presentaban heterogeneidad antes del tratamiento.

Resulta imprescindible para un correcto diagnóstico de ITH, que el grupo multidisciplinario de trabajo a cargo del centro mamario, considere variables como el tiempo de isquemia fría del tejido al momento de la cirugía, las condiciones preanalíticas, analíticas y posanalíticas, poniendo énfasis en el diagnóstico que incluye conocer la entidad y utilizar las diferentes técnicas de expresión proteica y de amplificación génica disponibles, que incluirán GPA, para reconocer los casos dudosos y de mayor dificultad diagnóstica.

## CONCLUSIÓN

Nuestros hallazgos podrían indicar, como se describe en la bibliografía, que la presencia de heterogeneidad sería un factor predictivo de una respuesta menos favorable al tratamiento, lo que se refleja en la baja incidencia de pCR en este grupo de pacientes.

La importancia del reconocimiento de la heterogeneidad de HER2, entidad poco conocida y subdiagnosticada, su reporte tanto en la punción biopsia, como en los clones resistentes de la pieza quirúrgica post neoadyuvancia y en el ganglio linfático, así como el agregado de los restantes biomarcadores clásicos y la utilización de plataformas genómicas en las pacientes en estadios tempranos con cáncer de mama, nos permitirán entender mejor el comportamiento biológico de la enfermedad en cada paciente, ajustar su tratamiento (medicina de precisión) y mejorar su expectativa de vida.

## REFERENCIAS

1. Hou Y, Nitta H, Li Z, et al. HER2 intratumoral heterogeneity in breast cancer, an evolving concept. *Cancers (Basel)*. 2023;15(10):2664. ◀◀◀◀◀
2. Nitta H, Kelly BD, Allred C, Jewell S, Banks P, Dennis E. The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathol Int*. 2016;66(6):313–24. ◀◀◀◀
3. Hou Y, Nitta H, Li Z, et al. HER2 gene protein assay is useful to determine HER2 status and evaluate HER2 heterogeneity in HER2 equivocal breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2017;147(1):211. ◀◀
4. Cronin KA, Harlan LC, Dodd KW, Abrams JS, Ballard-Barbash R. Population-based estimate of the prevalence of HER-2 positive breast cancer tumors for early stage patients in the US. *Cancer Invest* 2010;28(9):963–968. ◀
5. Guarneri V, Barbieri E, Dieci MV, Piacentini F, Conte P. Anti-HER2 neoadjuvant and adjuvant therapies in HER2 positive breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2010;36(Suppl 3):62–66 ◀
6. Hamilton E, Shastry M, Shiller SM, et al. Targeting HER2 heterogeneity in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2021;100:102286. ◀◀◀
7. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, et al. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000;182(2):150–62. ◀
8. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell JA, Rampaul RS, Blamey RW. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2004;91(8):1532–42. ◀
9. Bornstein-Quevedo L, de Anda-González J, Lara-Torres CO, et al. Navigating HER2-low testing in invasive breast cancer: update recommendations for pathologists. *Diagnostics (Basel)* 2023;13(4):681 ◀
10. Hoang MP, Sahin AA, Ordóñez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113(6):852–859. ◀
11. Van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, et al. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):68. ◀
12. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol*. 2014;27(1):4–18. ◀◀◀◀
13. Wolff AC, Hammond M, Allison KH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(11):1364–1382. ◀◀◀
14. Song Y, Wang Y, Tong C, et al. A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *Br J Cancer*. 2017;116(8):973–989 ◀◀
15. Hou Y, Nitta H, Wei L, et al. HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with incomplete response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;166(2):447–457 ◀◀◀◀◀
16. Rye IH, Trinh A, Sætersdal AB, et al. Intratumor heterogeneity defines treatment - resistant HER2+ breast tumors. *Mol Oncol* 2018;12(11):1838–55. ◀◀◀◀◀
17. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol*. 2021;72:123–135 ◀◀
18. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3997–4013 ◀◀
19. Residual cancer burden calculator. (s/f). MD Anderson Cancer Center. ◀◀
20. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. (s/f). ◀◀
21. Metzger Filho O, Viale G, Stein S, et al. Impact of HER2 heterogeneity on treatment response of early-stage HER2-positive breast cancer: phase II neoadjuvant clinical trial of T-DM1 combined with pertuzumab. *J Clin Oncol* 2023;41(3):500–11. ◀◀
22. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res* 2009;15(23):7381–7388 ◀

23. Caswell-Jin JL, McNamara K, Reiter JG, et al. Clonal replacement and heterogeneity in breast tumors treated with neoadjuvant HER2-targeted therapy. *Nat Commun* 2019;10:657. ◀
24. Hou Y, Shen R, Chaudhary S, et al. Correlation of expression of breast biomarkers in primary and metastatic breast carcinomas: A single-institution experience. *Acta Cytol* 2016;60(5):481–489 ◀
25. Modi S, Jacot W, Yamashita T et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-low advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2022;387(1):9–20. ◀
26. Nakada T, Sugihara K, Jikoh T, et al. The latest research and development into the antibody–drug conjugate, Ku [fam-] trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), for HER2 cancer therapy. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2019;67(3):173–185. ◀ ◀
27. Modi S, Park H, Murthy RK, et al. Antitumor activity and safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-low-expressing advanced breast cancer: results from a phase Ib study. *J Clin Oncol* 2020;38(17):188 ◀ ◀
28. Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, et al. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody–drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci* 2016;107(7):1039–1046. ◀
29. Guarneri V, Brasó-Maristany F, Dieci MV, et al. HER2DX genomic test in HER2-positive/hormone receptor-positive breast cancer treated with neoadjuvant trastuzumab and pertuzumab: a correlative analysis from the PerELISA trial. *EBioMedicine* 2022; 85:104320. ◀
30. Tolaney SM, Tung N, Wolff AC, et al. HER2DX genomic test in early-stage HER2-positive breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2023;9(1):42. ◀
31. Marín-Aguilera M, Jares P, Sanfeliu E, et al. Analytical validation of HER2DX genomic test for early-stage HER2-positive breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2023;9(1):36. ◀

## DEBATE

**Dr. Terrier:** Abrimos la discusión de este trabajo. Creo que es muy interesante porque es muy técnico, desde el punto de vista patológico, obviamente. Todo esto se basa en lo que nos diga el patólogo, pero a los mastólogos nos interesa estar al tanto de todo este tema e incluso en algunas cosas nos está formando el trabajo porque, de la heterogeneidad intratumoral se habla hace mucho tiempo, pero es como que lo tenemos ahí y nada más.

Creo que hoy en día la mayoría de nosotros no evaluamos la heterogeneidad, salvo alguna mención del patólogo, pero no como cosa estipulada en los informes.

¿Ustedes ya están haciendo eso como de rutina?

**Dra. Ancao:** Sí, lo hacemos en todos los HER-2 tres cruces desde el 2020.

**Dr. Terrier:** Me llamó la atención, debe tener una cuestión metodológica que por ahí no la pusiste, pero ¿por qué no incluyeron, porque en la práctica el FISH o los ISH positivos se consideran positivos y ustedes incluyeron los tres cruces de la inmuno pero no incluyeron los dos cruces con FISH positivo.

**Dra. Ancao:** Sí, en realidad CID, existe también la heterogeneidad en los ISH positivos, pero no era representativo, eran muy poquitos tumores entonces decidimos solamente incorporar a los tres cruces.

**Dr. Terrier:** Por una cuestión específica.

**Dra. Ancao:** No, solamente por eso.

**Dr. Terrier:** Digamos que en la práctica son positivos y se tratan como positivos.

Con esta evaluación previa a la neoadyuvancia, consideran que hoy se puede tomar alguna conducta diferente. Sería un factor de mayor predicción en un pCR, eso ya es claro, pero fuera de eso ¿alguna conducta distinta?

**Dra. Ancao:** No, hasta no tener otros resultados, otros estudios, todavía no, no hay otra considera-

ción, pero sí, el poder saber que es heterogéneo para ver cómo puede llegar a responder.

**Dr. Terrier:** Pero no cambia, vos lo dijiste, el clásico, el PSHP es el esquema, incluso hablaste de drogas más nuevas, pero todavía no hay una implicancia terapéutica de esto.

**Dra. Ancao:** No.

**Dra. Azar:** Sí, justamente iba en relación con la pregunta que hacía el Dr. Terrier, que vi que habías excluido los FISH positivos, los dos cruces y FISH positivos, porque hay trabajos que demuestran que por inmunohistoquímica, tres cruces responden mucho mejor que el dos cruces con FISH o SISH amplificados, aunque los excluyeron, ¿han podido ver esa relación de menor respuesta en los amplificados por FISH?

**Dra. Ancao:** No lo vimos en este caso.

**Dr. Terrier:** Sería como que en la práctica, los FISH positivos hay que considerarlos más como un heterogéneo que como un homogéneo positivo, una deducción mía nada más.

Creo que es un tema que da para mucho más, no el trabajo, que está muy bien, te felicito, sino mucho más en el desarrollo de los próximos tiempos. El HER-low y el HER-ultralow. Casi que no salió la actualización del low que se viene el ultralow, ni que hablar del trastuzumab deruxtecán y de todos los avances que van a venir en este grupo.

Bueno, muy bien, muchas gracias Dra. Ancao.

**Dra. Ancao:** Gracias.