



Biomarcadores del cáncer de mama vs firmas genómicas: hacia la búsqueda de una terapia personalizada

Horacio Astudillo-de la Vega,* Érika Ruiz-García,** David Muñoz-González,*** Javier Barajas-Figueroa,**** Jesús Miguel Lázaro-León,***** Héctor A Maldonado-Martínez,***** Vicente Valero*****

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer, y la mortalidad que provoca sólo es superada por la de cáncer de pulmón. La heterogeneidad biológica del cáncer de mama tiene implicaciones para el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas. Actualmente, el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama y las decisiones terapéuticas se basan en una serie de parámetros clínico-patológicos (estado de los ganglios linfáticos, tipo y grado histológico, tamaño del tumor, estado de los receptores hormonales y del oncogén HER2, entre otros). Una nueva clasificación del cáncer de mama se basa en el análisis de la expresión de múltiples genes en cada tumor. En los últimos años se han relacionado los fenotipos tumorales con los perfiles de expresión genómica, tras el análisis por microarreglos de ADN de las variaciones en los patrones de expresión genómica. Existen básicamente dos metodologías para la evaluación de perfiles genómicos: perfil de expresión génica por medio de microarreglos de ADN, que requiere de tejido congelado o fresco y del uso de la RT-PCR para cuantificar la expresión de los genes seleccionados prospectivamente sobre el tumor embebido en parafina. Uno de los ejemplos más exitosos y ahora más conocido es el denominado Oncotype DX. Este método está siendo empleado y comercializado en diversas partes del mundo debido a su fácil utilización al basarse en biopsias diagnósticas fijadas en formol e incluidas en parafina; ha demostrado alta reproducibilidad y consistencia en sus resultados, además de un gran beneficio al lograr seleccionar las pacientes que no podrían necesitar un tratamiento con quimioterapia. En definitiva, en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento y el entendimiento de la biología

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy in women and causing mortality is surpassed only by the lung cancer. Biological heterogeneity of cancer breast has implications for prognosis and therapeutic decisions. Currently, the prognoses of patients with breast cancer and treatment decisions are based on a series of clinic pathological parameters (lymph node status, histological type and grade, tumor size, status of hormone receptors and HER2 oncogene, etc.). A new breast cancer classification is based on the analysis of the expression of multiple genes in each tumor. In recent years there are molecular phenotypes associated with tumor genomic profiles, upon analysis by DNA microarrays variations in patterns of genomic expression. There are basically two methods for assessing genomic profiles: a gene expression method through DNA microarrays, which requires frozen tissue and the use of RT-PCR to quantify the expression prospectively selected genes on tumor Paraffin embedded tissues. One of the most successful example methods and best known is called Oncotype DX. This method is being used and marketed in various countries of the world due to its easy to use based on diagnostic biopsies fixed in formalin and embedded in paraffin; demonstrated high reproducibility and consistency as well as a great benefit to achieve results select patients who may not require treatment with chemotherapy. In the last years, it has deepened knowledge and understanding of molecular biology of breast cancer, which has contributed to a progress in the establishment of new predictive and prognostic genomic profiles in this type of tumor, making actually the new paradigm of translational research in cancer.

- * Laboratorio de Investigación Traslacional y Terapia Celular, UIMEM, CMN Siglo XXI, IMSS, México, DF, México.
 ** Departamento de Oncología Médica, Instituto Nacional de Cancerología, México, DF, México.
 *** Departamento de Gineco-Oncología, Instituto Nacional de Cancerología, México, DF, México.
 **** Servicio de Oncología Médica, Hospital Ángeles, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.
 ***** Servicio de Oncología Médica, Hospital General de México, Ciudad de México, DF, México.
 ***** Departamento de Patología Molecular e Inmunopatología, INCan, México, DF, México.
 ***** Breast Medical Oncology Department, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.

molecular del cáncer de mama, lo que ha contribuido a un avance en el establecimiento de nuevos perfiles genómicos predictivos y pronósticos en este tipo de tumor, haciendo realidad el paradigma de la investigación traslacional.

Palabras clave: Perfiles de expresión génica, microarreglos, HER2, RE, Oncotype DX, firmas genómicas, cáncer de mama.

Key words: Gene expression profiles, microarrays, HER2, ER, Oncotype DX, genomic signatures, breast cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tumor ginecológico más común en la mujer, con aproximadamente 180,000 nuevos casos diagnosticados en los Estados Unidos de América en 2007, de los cuales aproximadamente 41,000 pacientes murieron por esta causa.¹ El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida de cualquier mujer se estima en un 12.6% (equivalente a una de cada ocho mujeres).¹ Cuando se establece el diagnóstico de cáncer de mama, existen factores pronósticos y predictivos que ayudan en la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento. Se puede considerar como factor pronóstico cualquier parámetro conocido en el diagnóstico o después de la cirugía, que se asocie con la supervivencia, global o libre de enfermedad, en ausencia de tratamiento adyuvante.² Los factores que permiten identificar pacientes con mal pronóstico en principio son más fáciles de evaluar y encontrar que los que sirven para reconocer pacientes con muy buen pronóstico; la razón radica en que para la identificación de estas últimas son necesarias grandes series de casos con seguimientos prolongados. Un factor predictivo es cualquier valor asociado al grado de respuesta de un tratamiento específico. En el cáncer de mama temprano los factores predictivos pueden ser determinantes por su importancia a la hora de decidir el tratamiento adyuvante, los cuales son más útiles que los factores pronósticos, aunque su identificación es más compleja, pues requieren de ensayos clínicos exigentes para su evaluación y su validación, que deben ser aleatorizados, con gran número de pacientes para dotarlos de suficiente potencia estadística, y además deben partir de protocolos estandarizados para la detección y cuantificación del o los factores a determinar. Por lo anterior, en los últimos años se han logrado validar muy pocos factores predictivos, aun cuando sepamos su importancia para evitar sobre-

tratamientos en las pacientes oncológicas.³ En los últimos años se ha descubierto un gran número de biomarcadores importantes en la regulación de los procesos implicados en la carcinogénesis, por lo que en muchos estudios se han aplicado estos avances para la identificación y caracterización de factores predictivos y pronósticos en el cáncer de mama. Así ha nacido en los últimos años lo que actualmente conocemos como investigación traslacional en oncología (equivalente a trasladar los conocimientos adquiridos en el laboratorio de investigación a una aplicación clínica), haciendo sinergia en la colaboración entre los llamados investigadores básicos y los investigadores clínicos. El grado histológico, el tamaño tumoral, el estado de los ganglios linfáticos axilares y el estudio de los receptores hormonales en el tumor (receptores de estrógenos y de progesterona) son marcadores pronósticos utilizados universalmente que en la actualidad, en conjunto con los datos clínicos, establecen el tratamiento empleado. Afortunadamente, en la actualidad se ha iniciado el desarrollo de marcadores moleculares que logran identificar la mejor o peor respuesta de los tumores mamarios a los posibles tratamientos hormonales quimio o radioterápicos, así como la predicción de posibles recaídas.

FACTORES TRADICIONALES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN LA ACTUALIDAD

Las metástasis ganglionares

El estado de los ganglios linfáticos axilares es el factor pronóstico más importante del cáncer de mama, en ausencia de metástasis a distancia. Sabemos que sin afectación ganglionar la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 10 años es aproximadamente del 70-80%; esta cifra disminuye hasta un 35-40% cuando hay una afectación ganglionar, y es peor cuando existen 10 o más adenopatías, bajando

la tasa hasta un 10-15%.^{4,5} Los carcinomas mamarios drenan en uno o dos ganglios, los cuales se llaman ganglios centinelas. El ganglio centinela es predictivo del estado de los ganglios linfáticos siguientes en la cadena, por lo que la biopsia selectiva del ganglio centinela puede ayudar en la mujer a evitar la morbilidad asociada con la disección axilar completa, especialmente considerando que muchos carcinomas mamarios no presentan metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico (etapa N0). En algunas mujeres, especialmente en aquellas en las que el tumor se localiza en los cuadrantes internos de la mama, el ganglio centinela puede ser de la cadena mamaria interna, que habitualmente no se biopsia por la morbilidad asociada al procedimiento. Las macrometástasis (aquellas de un diámetro > 2 mm) tienen importancia pronóstica debido a que los ganglios centinela en la actualidad se pueden someter a un examen anatomopatológico exhaustivo, que incluye: cortes adicionales a intervalos regulares e inmunohistoquímica para algunos marcadores propios de la célula tumoral, o incluso a la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) para identificar ahora la expresión de los genes de esas mismas proteínas. Por lo anterior, ahora se logran detectar escasas células tumorales en el parénquima del ganglio linfático, lo que identifica cada vez más un creciente número de casos con micrometástasis (0.2 - 2 mm) o con la presencia de células tumorales aisladas (en grupos celulares menores a 0.2 mm).

El tamaño tumoral en la mama

El tamaño tumoral del carcinoma mamario es el segundo factor de pronóstico más importante e independiente del estado y de los ganglios linfáticos axilares. Sin embargo, el riesgo de metástasis en ganglios linfáticos axilares aumenta con el tamaño del carcinoma.⁴ Las mujeres con carcinomas menores de 1 cm de diámetro sin adenopatías tienen un pronóstico que se aproxima al de las mujeres sin cáncer de mama, por lo que la tasa de supervivencia de estas mujeres a los 10 años sin tratamiento es de aproximadamente el 90%. Por otro lado, más de la mitad de las mujeres con tumores mamarios > 2 cm de diámetro tienen metástasis ganglionares y muy mal pronóstico para su enfermedad.

Factores predictivos de respuesta a tratamientos específicos

La mayoría de las pacientes con afectación ganglionar y/o carcinomas de más de 1 cm de diámetro se benefician de alguna forma de tratamientos sistémicos. A pesar de los avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer de mama y de la enorme cantidad de biomarcadores descritos en los últimos años, actualmente los únicos tres marcadores validados como factores predictivos de respuesta a tratamientos específicos en este tipo de tumor son los receptores de estrógenos, de progesterona y el oncogen HER2/neu.

Receptores de estrógenos y progesterona

En la actualidad, la determinación de los receptores hormonales (estrógenos y progesterona) se realiza por inmunohistoquímica. Del 50 al 80% de los carcinomas mamarios expresan receptores de estrógenos (RE), y estos tumores son más frecuentes en mujeres postmenopáusicas. Estadísticamente, las mujeres con carcinoma de mama con receptores hormonales positivos tienen un pronóstico ligeramente mejor que el de las mujeres con receptores hormonales negativos. Sin embargo, el alcance donde tiene utilidad la valoración de los receptores hormonales es en la predicción de la respuesta al tratamiento hormonal, de modo que la decisión de recomendar a una paciente con cáncer de mama un tratamiento hormonal adyuvante debe basarse en la detección de receptores hormonales en el tumor.⁶ La mayoría de los laboratorios han determinado arbitrariamente que el 10-20% de células tumorales positivas en una biopsia de estudio es el punto de corte para definir la positividad de los receptores hormonales.⁷ Sin embargo, en la actualidad existen estudios donde se sugiere que las pacientes con tumores que presenten aproximadamente el 1% de células débilmente positivas, mejoran significativamente en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global si son tratadas con tamoxifeno.⁸ En el tejido mamario, el tamoxifeno actúa como un antiestrógeno, inhibiendo la unión del estrógeno a su receptor y, de esta manera, disminuyendo la proliferación de las células tumorales RE-positivas. Los beneficios del tamoxifeno se incrementan cuando el tratamiento se prolonga durante cinco años, resultando en una reducción anual del 50% en la tasa de recidivas y del 28% en la tasa de mortalidad.⁹

El oncogén HER2/neu

El gen HER2 (el segundo de los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano o también llamado c-erb-B2 o neu) codifica para una glucoproteína transmembranal que interviene positivamente en el control del crecimiento celular.^{10,11} No parece tener un ligando específico o aún no se ha caracterizado, sino que al parecer actúa como correceptor de múltiples factores de crecimiento. Existe sobreexpresión del gen HER2/neu en aproximadamente el 20-30% de los carcinomas mamarios. En más del 90% de los casos, la sobreexpresión de la proteína se debe a la amplificación del número de copias del gen por cada célula (localizado en la región cromosómica 17q21) y puede determinarse la expresión de la proteína mediante inmunohistoquímica, así como el número de copias del gen por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Al igual que ocurre con los receptores hormonales, la evaluación del oncogén HER2 es muy importante para determinar la respuesta al tratamiento dirigido con el trastuzumab. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido selectivamente contra las células tumorales que expresan en su membrana la proteína HER2/neu y su desarrollo ha supuesto un gran avance en el tratamiento del cáncer de mama.¹² El tratamiento con trastuzumab en neoadyuvancia en tumores HER2+ puede lograr la reducción del tumor hasta en un 40% respecto a aquellas pacientes a las que no se les administra este fármaco.¹³ Al utilizar el trastuzumab en pacientes HER2+ en conjunto con quimioterapia, se pueden obtener mejorías hasta en un 12% en la supervivencia libre de enfermedad, y hasta en un 52% menos de recaídas con una disminución del 33% en la mortalidad.¹⁴

NUEVOS MARCADORES MOLECULARES PREDICTIVOS DE RESPUESTA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA: LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

La heterogeneidad biológica del cáncer de mama tiene implicaciones para el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas. Una nueva aproximación en la clasificación del cáncer de mama mediante el análisis de expresión de múltiples genes en cada biopsia tumoral tiene como objetivos potenciales: Lograr una mejor clasificación de los tumores; una definición del

origen de esta enfermedad; un aumento en la capacidad pronóstica; y ayudar a una mejor elección entre las diferentes opciones terapéuticas.¹⁵

Hasta hace muy pocos años, los cambios producidos en las células tumorales se estudiaban uno a uno en pequeños grupos y en pequeñas series de tumores. Las nuevas tecnologías de microarreglos permiten detectar y cuantificar simultáneamente la expresión de hasta cientos de miles de secuencias genéticas (potencialmente el genoma humano completo). La gran ventaja de los microarreglos es la capacidad de analizar simultáneamente los cambios a nivel de la expresión génica, es decir, la posibilidad de establecer un «retrato molecular del cáncer» para descubrir los patrones globales de expresión que no sería posible detectar con las técnicas convencionales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles de RNAm no siempre se correlacionan con los cambios en la expresión de las proteínas. La cantidad de proteínas en cada célula depende no sólo de la actividad transcripcional y traduccional, sino también de la degradación proteica (vida media) y de la velocidad de transporte fuera de la célula (traslocación), por lo que son otros los ensayos necesarios para determinar el contenido proteico real en el tumor, como es la espectrometría de masas o la utilización de geles bidimensionales. La inmunohistoquímica utiliza anticuerpos para detectar proteínas en cortes tisulares. Mientras el tejido utilizado para obtener un perfil de expresión de genes a partir del RNAm puede involucrar células tumorales y células normales (epiteliales y del estroma), la inmunohistoquímica tiene la gran ventaja de permitir identificar el tipo celular que expresa la proteína y la localización celular específica de la misma. Los estudios con microarreglos de cDNA (DNA complementario obtenido a partir del RNAm) han permitido identificar subtipos de cáncer de mama reconocidos previamente en el estudio morfológico (por ejemplo, carcinomas lobulillares), por expresión de proteínas (por ejemplo, los carcinomas RE+ y HER2+) y por mutaciones de línea germinal (por ejemplo, los carcinomas BRCA1 y BRCA2). Así, en el año 2000 Pérou y cols¹⁶ describieron lo que ahora se conoce como clasificación molecular del cáncer de mama; esto se logra tras analizar, mediante microarreglos de DNA, las variaciones en los patrones de expresión genómica de 40 tumores de cáncer de mama humano y agrupar los fenotipos

jerárquicamente según su «huella genética». Como resultado más importante, logran separar los tumores en diferentes subtipos con diferencias biológicas y pronósticas:

- a) Subtipo basal epitelial: Caracterizado por la ausencia o mínima expresión de receptores de estrógeno (RE) y HER2 (triple negativo), elevada expresión de citoqueratinas 5/6 y 17 (mioepiteliales), laminina, etc. A diferencia de otros subtipos, este grupo de tumores presenta alta frecuencia (82%) de mutaciones en TP53 y expresión de proteína p53 (TP53 funciona como punto de control «checkpoint» en el ciclo celular desencadenando respuestas ante el daño del DNA, así como en reparación y apoptosis). Los tumores de tipo basal reciben este nombre por su perfil de expresión genómica similar a la de un epitelio celular basal normal y a células mioepiteliales normales. También comparte características histológicas con las células basales epiteliales de la mama normal, y muestra una elevada tasa proliferativa, necrosis central con margen infiltrativo, así como escaso estroma, frecuentes células apoptóticas, respuesta linfocítica y estromal, características similares a las observadas también en los carcinomas que aparecen en mujeres portadoras de mutación en el gen BRCA1.¹⁷
- b) Subtipo HER2 +: Ausencia o mínima expresión de RE, elevada expresión de HER2. El perfil de expresión revela no sólo copias aumentadas de RNAm del gen HER2/neu, sino también un aumento en la transcripción de otros genes adyacentes que están amplificados en este segmento de DNA, como GRB7.
- c) Luminal A: Caracterizado por la elevada expresión de RE, proteína 3 de un complejo de unión de GATA, proteína de unión a caja-X, el factor 3, el factor nuclear 3-alfa de hepatocito LIV-1 y regulada por estrógeno. Comparte características con las células epiteliales luminales que se desarrollan a partir de la capa interna de revestimiento del ducto mamario.
- d) Luminal B y C: Baja a moderada expresión de genes específicos de perfil luminal incluyendo los de grupo de RE.

Posteriormente, dos grupos de trabajo diferentes compararon muestras de tumores de mama de baja

y alta agresividad e identificaron perfiles genómicos («firmas de genes»), con capacidad pronóstica, predictivos del comportamiento clínico.^{18,19} A éstos siguieron algunos otros hallazgos en esta misma línea,²⁰⁻²⁷ incluyendo un nuevo perfil de 186 genes, publicado el año 2007, que se correlaciona con la supervivencia no sólo en cáncer de mama sino también en cáncer de pulmón, de próstata y meduloblastoma, denominado «perfil génico de invasividad» y obtenido a partir de células con capacidad tumorigénica (próximas a las células madre).²⁸ Otro perfil se reportó a partir del estudio del papel que podrían desarrollar los fibroblastos asociados al tumor en la progresión tumoral. Se planteó la posibilidad de que el patrón de expresión genómica de los fibroblastos en cultivo estimulados por suero podría relacionarse con el patrón génico de los fibroblastos en tejidos lesionados («los tejidos dañados»), incluyendo los tejidos dañados por un tumor invasivo. Así, las pacientes con tumores que expresan este perfil de «respuesta al daño» tendrían una peor evolución.²⁰ El análisis de la expresión de múltiples genes puede ayudar a predecir la evolución clínica en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz, e incluso la información obtenida puede tener mayor valor predictivo que las características patológicas clínicas y pronósticas consideradas como estándar. Parece que los tumores que mejor responden a la terapia neoadyuvante como el subtipo basal o HER2 + difieren frente a los tumores resistentes o no respondedores.²⁹⁻³¹ Los perfiles de expresión génica podrían permitir la estratificación de determinados subgrupos en categorías pronósticas definidas de forma diferente.^{18,19,32-34} Un área de desarrollo de gran crecimiento en la investigación oncológica es la identificación de un perfil de expresión génica para predecir la respuesta a la terapia.³⁵ Dentro de las metodologías para determinar una firma molecular o genómica, existen hoy dos aproximaciones para la evaluación de perfiles génicos: i) El perfil de expresión génica por medio de microarreglos de DNAc, que requieren de tejido mamario fresco o congelado³⁶ y, por otro lado, el uso de la técnica de RT-PCR para cuantificar la expresión de los genes seleccionados en tumores fijados en formol e incluidos en parafina, de los que el ejemplo sería el más conocido test Oncotype DX,²² cuyas principales características se comentan a continuación, junto con otras firmas genómicas.

LA FIRMA DE ÁMSTERDAM

Es la serie publicada hasta la fecha procedente de Holanda (por ello denominada Firma de Ámsterdam); se analizaron inicialmente una serie de 117 tumores que fueron posteriormente validados en una cohorte de 295 carcinomas de mama en estadios I-II con relación al perfil pronóstico de 70 genes relacionados con el ciclo celular, la angiogénesis y la invasividad (distinguiendo si habían recaído antes o después de 5 años). Este conjunto de genes permitió clasificar a los tumores como de mal pronóstico (n = 180) o de buen pronóstico (n = 195).¹⁸ El perfil genómico mostró, a 10 años, diferencias entre los grupos de buen y mal pronóstico en la supervivencia global (95% vs 55%) y supervivencia libre de metástasis (85% vs 51%), respectivamente. Este perfil génico de 70 genes posteriormente ha sido validado en una serie de pacientes sin afectación ganglionar axilar.³⁷ Por su carácter retrospectivo, el estudio holandés debe ser considerado como generador de hipótesis, pero de ninguna manera suficiente como para justificar su uso clínico rutinario. El estudio MINDTAC (Microarreglo para la enfermedad nodo negativo, puede evitar la quimioterapia) en el que se comparan pacientes sin afectación ganglionar axilar, los criterios habituales histopatológicos/clínicos frente a una evaluación de perfil genómico contribuirá a aclarar diversas interrogantes. Por ejemplo: ¿puede un esquema de docetaxel y capecitabina sustituir con ventaja a otro basado en antraciclinas?

LA FIRMA DE ROTTERDAM

La denominada Firma de Rotterdam (índice de grado genómico) fue descrita en una serie inicial de 286 carcinomas de mama en estadio N0 que no habían recibido quimioterapia adyuvante.¹⁹ La serie se dividió en un grupo de estudio (115 tumores, 80 RE + y 35 RE-) y un grupo de validación (171 tumores). Se concluyó una firma molecular constituida por un conjunto de 76 genes relacionados con el ciclo celular, la progresión tumoral y la proliferación celular. Estos 76 genes se dividieron en un conjunto de 60 con valor pronóstico en tumores RE+ y otro conjunto de 16 genes con valor pronóstico en los carcinomas RE-. Además, este perfil de expresión génica se asoció al grado histológico del tumor, proponiendo ser de ayuda para establecer el grado histológico y su

valor pronóstico, particularmente en tumores grado 2 (moderadamente diferenciados) y resultó ser un predictor independiente del riesgo de metástasis. Este perfil, basado en la expresión de 76 genes, ha sido validado en un ensayo multicéntrico en 180 pacientes con cáncer de mama etapa N0, y que no recibieron quimioterapia adyuvante.³⁸ Este estudio permitió discriminar grupos de pacientes que desarrollaron metástasis luego de 10 años: 94% vs 65%.

LA FIRMA DE 21-GENES O LLAMADO ONCOTYPE DX

Un trabajo pionero en la utilización de muestras parafinadas fue el de Cronin y cols,³⁹ en el que se analizaban muestras de cáncer de mama fijadas en formol e incluidas en parafina utilizando la técnica de RT-PCR en el formato de tarjeta microfluidica. Paik y cols²² analizaron 651 muestras parafinadas de pacientes con carcinoma de mama con extensión ganglionar e inmunohistoquímica positiva para el receptor de estrógenos. En este trabajo, identificaron un perfil de expresión que logra predecir el riesgo no sólo en recaída sino también el beneficio a la quimioterapia en cáncer de mama. En base a estos resultados se diseñó un test que incluye 21 genes (16 genes diana implicados en el desarrollo del cáncer de mama y 5 genes de referencia) que han sido patentados con el nombre de Oncotype DX y que posibilitó el diseño de un algoritmo predictivo de riesgo (La puntuación de recurrencia) agrupando el resultado en tres categorías pronósticas: Alto riesgo (> 30%, Riesgo de recaída); Riesgo intermedio ($\geq 18\%$ y $\leq 30\%$) y Bajo riesgo (< 18%). La expresión elevada de genes «favorables», como el grupo de los regulados por el receptor de estrógenos, GSTM1 o Bag1 resulta en una puntuación de recurrencia baja, mientras que la expresión elevada de genes «desfavorables» como HER2, grupo de genes relacionados con invasión, y CD68 genera una puntuación elevada. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico iniciado en mayo de 2007 patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer Americano (NCI): Asignación individualizada de Opciones de prueba para el tratamiento o TAILORx, con el fin de evaluar si los genes asociados frecuentemente con el riesgo de recidiva entre las mujeres con cáncer de mama en etapas iniciales pueden ser utilizados en la práctica diaria para asignar a las pacientes el tratamiento más efectivo y adecuado.

De hecho, la utilización de este ensayo se recoge en el compendio de recomendaciones para el uso de marcadores tumorales en cáncer de mama revisado en las últimas reuniones de ASCO,³ así como en la guía de la práctica clínica en cáncer de mama del NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (www.nccn.org). El Oncotype DX ha demostrado no sólo la capacidad pronóstica sino también predictiva del beneficio obtenido con el tamoxifeno. Para el uso de la hormonoterapia en cáncer de mama se diseñó un estudio (estudio B-14), en donde se demostró que las pacientes con puntuación de recurrencia alta no se beneficiaban del tratamiento con tamoxifeno, mientras que los grupos de puntuación baja o intermedia obtenían un beneficio sustancial.⁴⁰ Además, se han efectuado estudios de validación externos. Por ejemplo, Habel y cols⁴¹ publicaron un grupo de casos (n = 220) y controles (n = 570) de características similares. Después de correlacionar el tamaño y el grado histológico con la puntuación de recurrencia proporcionada por el Oncotype DX, se correlacionó bien con el riesgo de mortalidad a 10 años por cáncer de mama en pacientes con tumores mamarios positivos a estrógenos y tratadas con tamoxifeno. Aún más importante todavía es la capacidad de la prueba (Oncotype DX) de predecir el beneficio de la quimioterapia adyuvante en las pacientes con una puntuación alta de recurrencia. Este aspecto ha sido estudiado en los casos incluidos en el estudio NSABP B-20 con cáncer de mamas sin afectación ganglionar y receptores negativos tratados con tamoxifeno con/sin quimioterapia adicional (CMF o MF). Los datos obtenidos de un subgrupo de 651 pacientes mostraron que los casos de recurrencia con una puntuación alta presentaban un gran beneficio de la quimioterapia adyuvante (HR 0.26, disminución de recidiva a 10 años: 27%), mientras que una puntuación de recurrencia baja significaba un mínimo beneficio (o ninguno): disminución de recidiva a 10 años: 1.1%.⁴²

CONCLUSIONES

En la actualidad, una gran limitación importante para establecer estudios de expresión génica en el cáncer es la obtención de suficientes tumores en fresco con calidad en el manejo y su preservación, para que así se pueda garantizar que los resultados obtenidos sean significativos. La utilización de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, y tal como se conser-

van de forma rutinaria en los servicios de Patología, tiene como principal ventaja el acceso a grandes series de pacientes, lo que permite seleccionar retrospectivamente una casuística y seguimiento bien definidos. El análisis molecular, especialmente mediante qRT-PCR o PCR-microarrays ofrece, como hemos visto, un gran potencial aplicado al diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento, pero requiere de un RNA de elevada calidad, lo que no siempre está disponible en cualquier centro hospitalario. El único inconveniente que ofrecen las muestras en parafina es el defectuoso estado de conservación de su material genómico debido al proceso de fijación. Los últimos avances técnicos han permitido que actualmente se purifiquen las biomoléculas de mejor calidad, con un rendimiento aceptable. Esto ha logrado que cada vez sea mayor el número de trabajos de cribaje génico que utilizan estas muestras como material de estudio.

Evidentemente, es necesario hacer referencia a las limitaciones que plantean el análisis de los microarreglos en la estimación de riesgo en cáncer de mama.⁴³⁻⁴⁵ Algunos autores han llegado incluso a poner en duda la ventaja que los nuevos marcadores tienen frente a los marcadores clínicos clásicos, tras comparar el perfil de 70 genes con una combinación de índices pronósticos convencionales multivariados sobre el propio conjunto de datos obtenidos de la serie de Van't Veer y cols.⁴⁶ También es muy interesante el hecho de que el perfil de 70 genes de Ámsterdam y el denominado perfil de Rotterdam de 76 genes, a pesar de mostrar un diseño estadístico y clínico muy similar, sólo comparten 3 genes en común. Esta observación podría deberse al uso de plataformas de microarreglos diferentes y sobre todo a la variabilidad de las firmas o perfiles genómicos utilizados. Más aún, la posterior reevaluación de los datos de la Serie de van't Veer y cols ha demostrado que la Firma genómica/Perfil molecular no es única, sino que el conjunto de datos obtenidos de las matrices de microarreglos contiene múltiples perfiles (o firmas) que también se correlacionan con la supervivencia de las pacientes,⁴⁷ y esto ha sido confirmado para otras propuestas de perfiles genómicos.⁴⁸ Esta paradoja puede explicarse por la pequeña correlación clínica entre los genes y la evolución del cáncer, lo que hace difícil identificar los genes con mayor poder predictivo. Además, el proceso de selección de los genes depende en gran parte del conjunto de pacientes utilizados para desarrollar el modelo predictivo. Existen también dificultades

importantes, como el uso de muestras de pequeño tamaño y el uso de tecnologías muy sensibles y poco reproducibles. Otro de los problemas característicos de los perfiles génicos es el aumento del sesgo del uso de las muestras disponibles, que no logran adecuadamente representar a la totalidad de pacientes incluidos en el estudio. Es necesario efectuar una validación posterior, de manera externa a donde se originó el test, mediante su uso en diferentes laboratorios que pueda confirmar que los métodos utilizados son reproducibles y pueden ser aplicados de forma generalizada. Finalmente, hemos visto que el perfil de expresión del RNAm en el cáncer de mama es una potente herramienta que ha permitido obtener información muy útil relativa a la biología molecular del cáncer de mama. En los últimos años se han desarrollado herramientas análogas para analizar perfiles de DNA y expresión de proteínas. Además de identificar los tipos tumorales, también en el cáncer de mama se han utilizado las matrices de RNAm para predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento. Actualmente, realizar perfiles transcripcionales resulta inviable en cada caso clínico de cáncer de mama, aunque hay firmas moleculares basadas en un número relativamente reducido de genes que han sido validadas para el uso clínico, contribuyendo indiscutiblemente a lo que se ha denominado la «terapia personalizada» (tailored therapy). En los últimos años se han diseñado protocolos que permiten extraer RNA de calidad suficiente a partir de muestras de cáncer de mama fijadas en formol e incluidas en parafina y la técnica de qRT-PCR parece una herramienta adecuada para este tipo de estudios e, incluso, ya se está utilizando como técnica de apoyo para seleccionar aquellas pacientes que se beneficiarán del tratamiento adyuvante en el caso del cáncer de mama (Oncotype DX). Para finalizar, actualmente se desarrollan ensayos clínicos que en los próximos años nos ofrecerán información sobre el verdadero alcance clínico de esta nueva herramienta molecular orientada al pronóstico y a la selección del tratamiento adyuvante más adecuado para cada paciente con cáncer de mama.

BIBLIOGRAFÍA

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murria T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
- Domínguez MA, Marcos M, Meiriño R et al. Factores predictivos y pronósticos en el cáncer de mama temprano. *Anales Sis San Navarra* 2001; 24: 99-110.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R et al. De la Sociedad Americana de Oncología Clínica de 2007. Actualización de las recomendaciones para el uso de marcadores tumorales en el cáncer de mama. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5827-5312.
- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relación del tamaño del tumor, estado de los ganglios linfáticos, y la supervivencia en 24,740 casos de cáncer de mama. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
- Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Los hallazgos anatomopatológicos de la Nacional de Cirugía Adyuvante del Seno en proyectos del Protocolo B-06: 10 años patológicos y clínicos discriminantes pronóstico. *Cancer* 1993; 71: 2507-2514.
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D et al. Factores pronósticos en el cáncer de mama. Collage of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 966-978.
- Gown AM. Problemas actuales de la ER y determinación de HER2 por IHC en el cáncer de mama. *Mod Pathol* 2008; 21: S8-S15.
- Allred C, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Los factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama mediante el análisis inmunohistoquímico. *Mod Pathol* 1998; 11: 155-168.
- Cáncer de Mama Precoc Trialist Collaborative Group. Tamoxifeno para el cáncer de mama: Una visión general de los ensayos aleatorios. *Lancet* 1998; 351: 1451-1467.
- Hayes DF, Thor AD. c-erbB-2 en el cáncer de mama: el desarrollo de un marcador clínico útil. *Semin Oncol* 2002; 29: 231-245.
- Shawver LK, Slamon DJ, Ullrich A. Smart drugs: inhibidores de la tirosina cinasa en el tratamiento del cáncer. *Cancer Cell* 2002; 1: 117-123.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. El uso de quimioterapia más un anticuerpo monoclonal contra el HER2 para el cáncer de mama metastático sobreexpresión de HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-792.
- Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D et al. Significativamente más alta tasa de remisión completa patológica tras la terapia neoadyuvante con trastuzumab, paclitaxel y quimioterapia epirubicina: resultados de un triasl aleatorios en humanos factor de crecimiento epidérmico 2-positivo de cáncer de mama operable. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3676-3685.
- Romond EH, Pérez EA, Bryant J et al. Trastuzumab más la quimioterapia adyuvante para el HER2 cáncer de mama operable positivo. *N Engl J Med* 2005; 353: 1673-1684.
- Massagué J. Clasificación Out-gen del cáncer de mama Firmas. *N Engl J Med* 2007; 356; 3: 294-297.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Retratos moleculares de los tumores de mama humanos. *Nature* 2000; 406: 747-752.
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. La evaluación fenotípica de la basal como subtipo de carcinoma de mama invasivo. *Mod Pathol* 2006; 19: 264-271.
- van de Vijver MJ, El YD, van 't Veer LJ et al. Un gen-firma de la expresión como un predictor de la supervivencia en el cáncer de mama. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009.
- Wang Y, Klijn JG, Zhang Y et al. Perfiles de expresión de genes para predecir la metástasis a distancia de la linfa-nodo negativo primaria del cáncer de mama. *Lancet* 2005; 365: 671-679.
- Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB et al. La robustez, escalabilidad, y la integración de una herida gen de la firma de expresión en la predicción de la respuesta de superviven-

- cia del cáncer de mama. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3738-3743.
21. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM et al. Los genes que intervienen en la metástasis del cáncer de mama a pulmón. *Nature* 2005; 436: 518-524.
 22. Paik S, Shak S, Tang G et al. Ensayo de múltiples genes para predecir la recurrencia de las tratadas con tamoxifeno, el nodo negativo cáncer de mama. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-2826.
 23. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E et al. Los perfiles de expresión génica obtenidos a partir de las aspiraciones con aguja fina de cáncer de mama de forma fiable de identificar los marcadores pronósticos de rutina y en gran escala revelan diferencias moleculares entre el estrógeno-negativos y tumores positivos al estrógeno. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2406-2415.
 24. Grubberger S, Ringner M, Chen Y et al. Estado de los receptores de estrógeno en el cáncer de mama se asocia con patrones de expresión muy diferentes de genes. *Cancer Res* 2001; 61: 5979-5984.
 25. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. La clasificación de cáncer de mama y el pronóstico sobre la base de perfiles de expresión génica de un estudio basado en población. *Proc Natl Acad Sci EE.UU* 2003; 100: 10393-10398.
 26. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Patrones de expresión génica de los carcinomas de mama, distinguir subclases tumor con implicaciones clínicas. *Proc Natl Acad Sci EE.UU* 2001; 98: 10869-10874.
 27. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. La observación repetida de los subtipos de tumor de mama independiente de los datos conjuntos de la expresión génica. *Proc Natl Acad Sci EE.UU* 2003; 100: 8418-8423.
 28. Liu R, Wang X, Chen GY et al. El papel pronóstico de una firma de genes de mama tumorigénico-las células cancerosas. *N Engl J Med* 2007; 356: 217-226.
 29. Iwao Koizumi K, Matoba R, Ueno N et al. La predicción de la respuesta de docetaxel en cáncer de mama humano por perfiles de expresión génica. *J Clin Oncol* 2005; 23: 422-431.
 30. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Subtipos de cáncer de mama molecular responden de manera diferente a la quimioterapia preoperatoria. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-5685.
 31. Hess KR, Anderson K, Symmans WF et al. Farmacogenómica, predictor de la sensibilidad a la quimioterapia preoperatoria con paclitaxel y fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida en cáncer de mama. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4236-4244.
 32. Glinsky GV, Higashiyama T, Glinskii AB. Clasificación del cáncer de mama humano usando perfiles de expresión génica como un componente del algoritmo de predicción de supervivencia. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2272-2283.
 33. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Perfil de expresión genética, predice los resultados clínicos de cáncer de mama. *Nature* 2002; 415: 530-536.
 34. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al. Perfiles de expresión genética en el cáncer de mama: la comprensión de las bases moleculares de grado histológico para mejorar el pronóstico. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 262-272.
 35. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Clasificación molecular y pronóstico molecular del cáncer de mama: listo para su aplicación clínica? *J Clin Oncol* 2005; 23: 7350-7360.
 36. Wooster R, Weber BL. Cáncer de mama y de ovario. *N Engl J Med* 2003; 348: 2339-2347.
 37. Buyse M, Loi S, Van 't Veer L, Viale G et al. La validación y la utilidad clínica de un 70-gen firma de pronóstico de las mujeres con cáncer de mama con ganglios negativos. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1183-1192.
 38. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y et al. Multicéntrico de validación de una expresión genética basada en la firma de mal pronóstico en los ganglios linfáticos negativos de cáncer de mama primario. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1665-1671.
 39. Cronin M, Pho M, Dutta D et al. Medición de la expresión génica en parafina de archivo tejidos embebidos: el desarrollo y ejecución de un 92-gen de la transcriptasa inversa-reacción en cadena de polimerasa. *Am J Pathol* 2004; 164: 35-42.
 40. Paik S, Shak S, Tang G et al. Expresión de los 21 genes en la prueba de Puntuación de Recurrencia y el beneficio clínico tamoxifeno en el estudio NSABP B-14 de ganglios negativos, el cáncer de mama receptor de estrógeno positivo. *J Clin Oncol* 2005; 23: (Suppl): abstr 510.
 41. Habel LA, Shak S, Jacobs MK et al. Un estudio basado en población de la expresión génica del tumor y el riesgo de muerte del cáncer de mama entre los pacientes con ganglios linfáticos negativos. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R25.
 42. Paik S, Tang G, Shak S et al. Expresión de genes y beneficio de la quimioterapia en mujeres con nodo negativo, receptor de estrógeno cáncer de mama positivo. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3726-3734.
 43. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K et al. Dificultades en el uso de datos de microarreglo de ADN para la clasificación diagnóstica y pronóstica. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 14-18.
 44. Ransohoff DF. Reglas de evidencia molecular para el cáncer de marcador de descubrimiento y validación. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 309-314.
 45. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Predicción de los resultados de cáncer con las matrices de micro. *Lancet* 2005; 365: 1684-1685.
 46. Eden P, Ritz C, Rose C et al. "Buenos tiempos", marcadores clínicos tienen una potencia similar en el pronóstico del cáncer de mama como el micro de perfiles de expresión génica matriz. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1837-1841.
 47. Ein-Dor L, Kela I, Getz G et al. Final de la firma genes en el cáncer de mama: ¿Existe un conjunto único? *Bioinformatics* 2005; 21: 171-178.
 48. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Predicción de los resultados de cáncer con microarreglos: una múltiple estrategia de validación al azar. *Lancet* 2005; 365: 488-492.

Correspondencia:

Dr. Horacio Astudillo de la Vega.

Laboratorio de Investigación Traslacional y Terapia Celular, UIMEM, Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 67620, México, D.F., México.

Teléfono: +52 55 5627 6900 ext 22154.

E-mail: hastud2@aol.com.