

# Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea

*Molecular classification of breast cancer: a contemporary view*

Alfredo Carlos Simões Dornellas de Barros<sup>1</sup>, Kátia Ramos Moreira Leite<sup>2</sup>

## Descritores

Câncer de mama  
Neoplasias da mama  
Classificação  
Imuno-Histoquímica  
Biologia molecular  
Genética

## Keywords

Breast cancer  
Breast Neoplasms  
Classification  
Immunohistochemistry  
Molecular Biology  
Genetics

## RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea com comportamentos diferentes. O progresso da biotecnologia permitiu sua classificação molecular por perfis de expressão gênica, a saber: luminal A, luminal B, superexpressor de HER-2, basalóide, “normal like”, “claudin-low” e molecular apócrino. As características biológicas e moleculares dos subtipos são apresentadas e discutidas, assim como sua importância prognóstica. Existe uma forte correlação entre classificação dos tumores por “microarray” de DNA e reações imuno-histoquímicas, o que facilita seu uso na prática diária. Porém, um amplo espectro de neoplasias é incluído como triplo-negativo (com negatividade de receptores de estrogênio e progesterona e oncogene HER-2) e é possível discriminá-las em distintas formas genômicas.

## ABSTRACT

*Breast cancer is a heterogeneous disease with different evolutions. The progress of biotechnology allowed its molecular classification based in genetic expression profiles, as follows: luminal A, luminal B, HER-2 superexpressor, basal-like, normal-like, claudin-low and molecular apocrine. Biologic and molecular characteristics of the subtypes are presented, as well as their prognostic importance. There is strong correlation between the DNA microarray classification and immunohistochemistry, making easier ITS usage in the daily practice. There is a wide spectrum of triple-negative neoplasias (estrogen and progesterone negative receptors, and HER-2 oncogene negative) and it is possible to discriminate them in several genomic forms.*

O câncer de mama não é uma doença única, e sim uma doença heterogênea, com múltiplas formas histopatológicas, diferentes respostas à terapêutica e evoluções variáveis. Com efeito, sob o rótulo de câncer de mama parecem estar agrupados distintos tipos de neoplasia com origem nas células da mama<sup>1,2</sup>.

Apesar do acúmulo de conhecimento de biologia tumoral no século XX — aplicação de exames imuno-histoquímicos e morfológicos indicativos de ritmo da divisão e agressividade tumoral —, só na virada para o século XXI é que surgiu uma classificação tumoral mais precisa, baseada em perfis de expressão gênica<sup>3</sup>. Pode-se especular que cada tumor seja único e que seus conteúdos de DNA sejam individualmente distintos, mas métodos moleculares permitem agrupá-los em função de suas semelhanças genéticas, de modo a se estabelecer acurados parâmetros prognósticos e de orientação terapêutica.

Trabalho realizado no Hospital Sírio-Libanês – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup>Coordenador do Núcleo de Mastologia do Hospital Sírio-Libanês; Médico Pesquisador do LIM-02 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP); Professor Livre-Docente de Ginecologia pela Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Professora Associada do Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia Laboratório de Investigação Médica (LIM55) da Faculdade de Medicina da USP; Patologista do Hospital Sírio-Libanês – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Alfredo Carlos Simões Dornellas de Barros – Rua Dr. Renato Paes de Barros, 750, CJ 35 – CEP: 04530-001 – São Paulo (SP), Brasil – E-mail: clinab@terra.com.br

Recebido em: 21/07/2015. Aceito em: 29/07/2015

## Classificação em subtipos intrínsecos por microarray de DNA

O *microarray* de DNA é uma técnica que permite que todo o DNA genômico seja fixado em filtro e hibridizado com uma sonda, que reconhece determinada região de um gene ou um gene todo. Como cada sonda tem uma posição conhecida no filtro, o conjunto de sondas distribuídas forma um arranjo (*array*) e uma hibridização positiva indica as sequências presentes de DNA-alvo que se está buscando (nos atuais *chips* de DNA, o número de sondas pode cobrir todo o genoma). Em seguida, o RNA das células é extraído e convertido em fitas simples de DNA pela enzima transcriptase reversa, que são marcadas por dois corantes fluorescentes (vermelho e verde). Um programa de computador se encarrega de combinar as imagens.

Usando-se tal metodologia, 8.102 genes foram pesquisados em 65 espécimes tumorais, em trabalho que se tornou referência, por Perou et al.<sup>3</sup>, que classificaram os cânceres de mama em 5 subtipos intrínsecos conforme seu padrão de expressão gênica: luminal A, luminal B, superexpressor de HER-2, basaloide e *normal-like*.

Esses subgrupos tumorais apresentam similaridades e diferenças tanto em expressão de genes como em ritmo de crescimento, vias de sinalização, composição celular, prognóstico e sensibilidade à terapêutica.

### Luminal A

É forma tumoral com origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares, tipicamente com presença de RE e RPg em grande quantidade de células, e ausência de HER-2. Corresponde a cerca de 30 a 40% dos casos<sup>4</sup>. A avaliação de Ki 67 evidencia baixa taxa de proliferação (<14%).

São tumores bastante sensíveis à hormonioterapia.

### Luminal B

Também se originam em células epiteliais luminais ricas em RE. Os RPg, por seu lado, podem estar presentes tanto em alta como em baixa proporção de células. A proteína do oncogene HER-2 pode ser detectada e o ritmo de proliferação avaliado pelo Ki 67 é mais elevado (>14%).

Este tumor também é sensível à hormonioterapia e o trastuzumab pode ser empregado com sucesso se for HER-2 positivo. O subtipo luminal B corresponde a cerca de 20 a 30% dos carcinomas de mama<sup>4</sup>.

### Superexpressor de HER-2

Em média, são deste subtipo de 15 a 20% dos casos. O oncogene HER-2 está superexpresso por amplificação gênica, a qual foi descrita, em 1987, por Slamon et al.<sup>5,6</sup>.

Em sua evolução natural classicamente está associado a prognóstico ruim, panorama que foi mudado com a introdução da terapia-alvo anti-HER-2, pelo trastuzumab combinado com quimioterapia<sup>7</sup>.

Na maioria, estes tumores são RE negativos.

### Basaloide

Estima-se, também, que de 15 a 20% dos carcinomas de mama sejam basaloides<sup>4</sup>. São lesões pouco diferenciadas ou indiferenciadas (geralmente GIII), com alta taxa de proliferação. Na maior parte (80%), são tumores triplo-negativos por reação imuno-histoquímica, com negatividade de RE, RPg e HER-2; entretanto, definitivamente, os termos basaloide e triplo-negativo não são sinônimos: o primeiro é definido por expressão gênica em *microarray* de DNA, e o segundo, por critério imuno-histoquímico. O painel de marcadores proposto para a classificação do tipo basal seria a ausência de expressão de RE, RPg e HER-2, expressão de citoqueratinas de alto peso molecular/basais, CK5/6, 14 ou 17, e expressão de EGFR (HER-1).

O termo basaloide ou *basal-like* foi sugerido porque tal subtipo apresenta algumas características de células mioepiteliais, especialmente marcadores de superfície celular, como citoqueratinas 5, 6 e 14<sup>8</sup>. Porém, outras formas de citoqueratina (8, 18) estão presentes nos *basal-like*, e não nas células mioepiteliais, de localização basal (profunda) na unidade ducto-lobular. Embora a maioria dos tumores seja histologicamente do tipo SOE, de alto grau, com alto índice mitótico, alguns assumem um padrão de carcinoma medular com crescimento expansivo, acompanhado de infiltrado linfocitário intersticial intenso. O fenótipo basaloide pode ainda estar associado a carcinomas metaplásicos, mioepiteliais, medulares típicos e atípicos, secretores e adenoide-císticos.

Os tumores *basal-like* não se iniciam em células mioepiteliais, mas, com base no modelo hierárquico de carcinogênese, em células tipo tronco ou progenitoras luminais muito indiferenciadas<sup>9</sup>. A nomenclatura *basal-like* acabou gerando certa confusão porque leva à pressuposição equivocada de que sua origem venha das células basais mioepiteliais.

Interessante notar que entre os fatores de risco para carcinoma *basal-like* está a alta paridade (diferente das outras formas)<sup>10,11</sup>. Os basaloides tendem a ocorrer em idade mais jovem e apresentam maior taxa de metástases viscerais do que os outros subtipos.

Os tumores *basal-like*, apesar de exibirem maior agressividade, são mais responsivos à quimioterapia neoadjuvante<sup>12</sup>.

Existe ligação entre a mutação do gene BRCA1 e os tumores basaloides. A maioria dos tumores em mulheres carreadoras dessa mutação, especialmente antes dos 50 anos, apresenta morfologia semelhante aos *basal-like* não hereditários. São comuns semelhanças na expressão de citoqueratinas de alto peso molecular (5/6, 14 e 17) e nas alterações de genes reguladores do ciclo celular (baixos níveis de p27 e ciclina D1 e elevados níveis de ciclina E, SKPz e caspase 3)<sup>13,14</sup>. Cerca de 20% dos basaloides têm mutação germinativa ou somática de BRCA 1-2. Esta via de reparo do DNA parece estar ausente nos basaloides também por mecanismos epigenéticos do tipo hipermetilação<sup>15</sup>. A disfunção de BRCA1, ao que tudo indica, representa um mecanismo gerador de tumores basaloides e triplo-negativos; sendo assim, pode-se

inferir que pelo menos uma parte desses seja incompetente no mecanismo de reparo de DNA envolvido na via de recombinação homóloga; isso torna essas células mais dependentes das vias de reparo pelas enzimas da *poly ADP-ribose polymerase* (PARP). Em teoria, seriam células mais sensíveis a drogas citotóxicas, como a carboplatina, especialmente se forem usadas concomitantemente com agentes inibidores da PARP<sup>16,17</sup>.

### Normal-like

A existência do subtipo *normal-like* é controversa. O termo foi utilizado porque os genes nele expressos são normalmente compartilhados com o tecido epitelial normal; todavia, não está claro se existe mesmo este subtipo, ou se simplesmente a sua determinação deveu-se à contaminação com amostras de tecido normal<sup>2,3</sup>.

### Novos subtipos intrínsecos

Além desses subtipos clássicos, foram mais tarde descritos pela mesma metodologia outros dois, o *claudin-low* e o molecular apócrino.

#### Claudin-low

Reconhecidos em 2007, são tumores também triplo-negativos, com baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7, e perda de E-caderina<sup>18</sup>. Sua frequência é estimada em 5% de todos os carcinomas de mama e sua origem está vinculada a células muito próximas hierarquicamente às primitivas células tronco-mamárias<sup>4</sup>.

Claudinas são proteínas transmembrana (família de 24 membros) envolvidas na adesão entre as células, sendo que a *downregulation* de algumas delas está associada ao câncer de mama — ao que parece, por silenciamento epigenético —, facilitando a migração celular e a invasão tecidual.

Nos carcinomas *claudin-low* estão ausentes marcadores de diferenciação luminal; ao contrário, estas formas são ricas em marcadores de células-tronco, de células iniciadoras de câncer, de transição epitélio-mesênquima e de genes associados à resposta imune. É o tumor cujas células mais se assemelham às células-tronco<sup>19</sup>.

Histologicamente, costumam ser do tipo invasivo SOE, mas também podem ser medulares e/ou metaplásicos, e sobreviver em portadoras de mutação de BRCA1. Têm alto grau histológico, pouca diferenciação e mostram acentuado infiltrado linfocitário.

#### Molecular apócrino

Farmer et al. descreveram este subtipo em 2005<sup>20</sup>. Nos primeiros casos reportados foi observada morfologia apócrina, daí esta terminologia. No entanto, achados apócrinos não foram mais encontrados com muita frequência por outros autores<sup>21</sup>.

Caracteristicamente, apresenta-se como triplo-negativo pela imuno-histoquímica, porém com quase 100% de expressão de receptores androgênicos (RA), os quais estão ausentes nos *basal-like* e *claudin-low*.

Existe alta atividade de autofagia nas células e foi proposta uma relação direta entre níveis de RA e mutações do gene codificador

da *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K), descortinando-se novas possibilidades terapêuticas para este subtipo<sup>22,23</sup>.

O tumor molecular apócrino foi chamado de luminal receptor de androgênio positivo por Lehman et al.<sup>24</sup>, que o encontraram em 10% do *pool* de carcinomas triplo-negativos.

### Prognóstico dos diferentes subtipos intrínsecos

Sorlie et al.<sup>25</sup> estudaram a evolução baseada em curvas de Kaplan-Meier dos quatro subtipos principais (exceto o *normal-like*) em duas fontes de dados: *Van't Veer data-set* e *Norway/Stanford data-set* (Figura 1). Observaram grande diferença evolutiva nos diferentes subtipos, sendo que os carcinomas basaloides e os superexpressores de HER-2 foram associados a sobrevidas mais curtas, mesmo diante de axila negativa.

Ademais, foi visto que os tumores luminais exibem prognóstico muito melhor, predominantemente o luminal A. Cerca de 90% das pacientes com neoplasias luminais A sobrevivem sem sinais de doença no período de 5 anos.

Esses dados prognósticos dos diferentes subtipos foram confirmados mais tarde por meio de sua classificação pela assinatura genética PAM 50<sup>26</sup>.

Com o reconhecimento do subtipo *claudin-low*, Prat e Perou<sup>4</sup> apresentaram dados comparativos de sobrevida livre de doença e sobrevida global que apontaram que essas neoplasias são agressivas, com prognóstico bem inferior aos luminais e discretamente melhor que o basalóide e o superexpressor de HER-2. Quanto ao molecular apócrino, seu prognóstico ainda não foi bem estudado; contudo, já foi referido que se aproxima dos luminais, com baixa capacidade de metastatização.

Alguns autores pesquisaram as taxas de recidiva local após cirurgia conservadora e radioterapia nos vários subtipos<sup>27-29</sup>. Esta classificação dos subtipos foi feita por critérios imuno-histoquímicos, em analogia com a classificação por *microarray* de DNA. Esses resultados são visualizados na Tabela 1 e reproduzem em termos locais o mesmo padrão da agressividade sistêmica.

A classificação por perfis de expressão de genes pode ser útil, inclusive, para a predição do sítio de metastatização<sup>30</sup>. O foco mais comum de metástase à distância é ósseo para luminais A e B ( $\pm 80\%$ ) e superexpressores de HER-2 ( $\pm 65\%$ ), e pulmonar para basaloides e *claudin-low* ( $\pm 50\%$ ). De outra parte, as metástases cerebrais são mais frequentes nos tumores não luminais, e as hepáticas, nos superexpressores de HER-2.

### Correspondência entre as classificações por *microarray* de DNA e por imuno-histoquímica

A classificação molecular por *microarray* de DNA é baseada em análise complexa de expressão gênica, o que dificulta sua implementação na prática. Uma classificação análoga, aproximada por

modelos imuno-histoquímicos, conquanto imprecisa, é bem mais factível. São usados para esse fim os seguintes marcadores: RE, RPg, HER-2, CK 5/6, EGFR (HER-1) e Ki 67.

Como regra geral, o tumor luminal A apresenta RE+, RPg+, HER-2- e Ki 67 baixo (<14%); o luminal B exibe RE+, RPg+, pode ser HER-2+ e tem maior atividade proliferativa (Ki 67>14%); o superexpressor de HER-2 é RE-, RPg- e HER-2+; o basaloide geralmente é RE-, RPg- e HER-2- (triplo-negativo), com expressão de CK5/6 e ou EGFR.

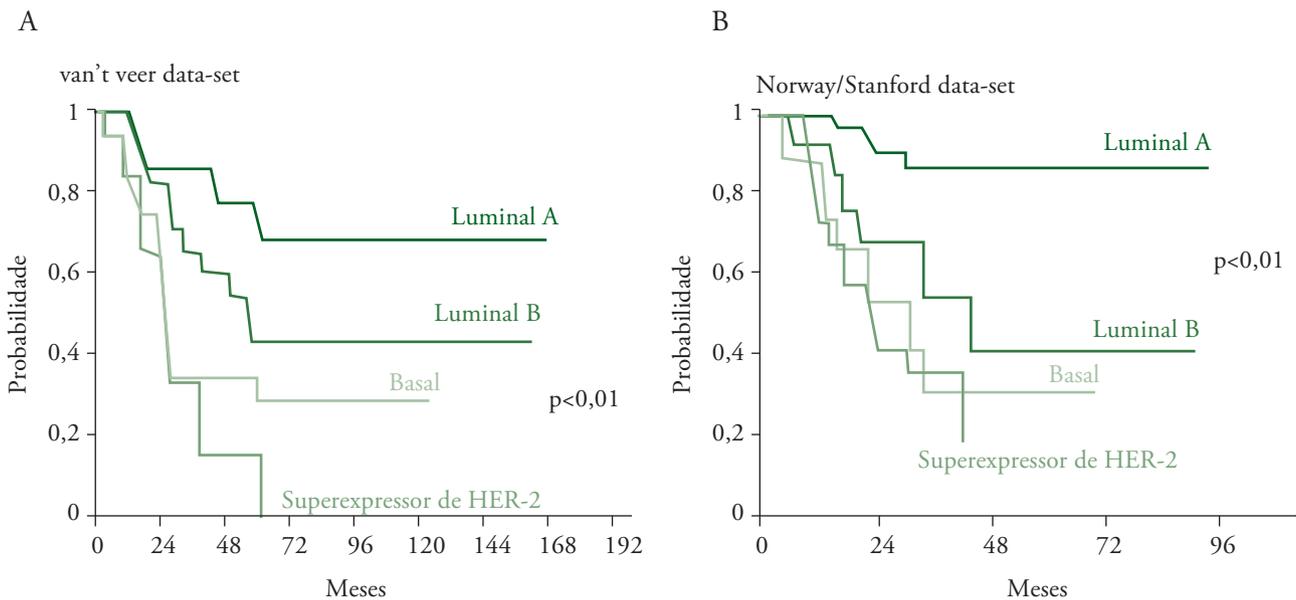
Subtipos intrínsecos por classificação molecular e subtipos imuno-histoquímicos aproximados não são iguais. Com efeito, a maior parte dos basaloídes é de triplo-negativos e a maior parte dos triplo-negativos é de basaloide. A estimativa de acerto de correspondência com o perfil basaloide aumenta quando os triplo-negativos exibem CK 5/6 e/ou EGFR e têm ausência de RA. Prat et al.<sup>31</sup> enfocaram especificamente esta questão — basaloídes e triplo-negativos — por critérios moleculares e imuno-histoquímicos, cujos resultados estão na Figura 2. Para eles, 78,6% dos triplo-negativos foram basaloídes e 68,5% dos triplo-negativos foram basaloídes.

A classificação imuno-histoquímica tem a limitação de deixar uma série de casos sem catalogação, devido à mistura de marcadores (exemplo: RE+ e RPg- ou RE- e RPg+). Uma força-tarefa de peritos (*The Impact 2012 Working Group*) adotou como critério RE e/ou RPg+ para aproximação com luminal A ou B e subdividiu os luminais B em HER-2 negativos e HER-2 positivos, criando o perfil triplo-positivo por imuno-histoquímica<sup>32</sup>.

Rivenbark et al.<sup>2</sup> realizaram as classificações por imuno-histoquímica e expressão gênica nos mesmos 381 tumores e os compararam. Os resultados estão dispostos na Figura 3 e na Tabela 2. Pode-se notar claramente que a classificação imuno-histoquímica prediz a molecular, porém não a substitui.

## Heterogeneidade intratumoral

As classificações dos carcinomas de mama são prejudicadas pela heterogeneidade tumoral. O câncer tem origem unicelular clonal, a doença evolui em decorrência do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que modificam a linhagem primitiva.



Fonte: Sorlie et al.<sup>25</sup>

**Figura 1.** Prognóstico dos diferentes subtipos intrínsecos. (A) Tempo até a metástase à distância; (B) sobrevida

**Tabela 1.** Frequência de recidivas locais após cirurgia conservadora nos diversos subtipos tumorais

	Luminal A (%)	Luminal B (%)	HER-2 (%)	Basaloide (%)
Nguyen et al. <sup>27</sup> (5 anos)	0,8	1,5	8,4	7,1
Millar et al. <sup>28</sup> (5 anos)	1,0	4,3	7,7	9,6
Voduc et al. <sup>29</sup> (10 anos)	8	10	21	14

O perfilamento dos genes permitiu a observação de que na mesma neoplasia existem linhagens celulares distintas, as quais podem determinar áreas biologicamente diferentes<sup>33</sup>.

A diversidade fenotípica tumoral é resultado da evolução clonal, das mutações, da influência epigenética e das alterações no microambiente tumoral<sup>1,34</sup>. A partir da iniciação em única célula (provavelmente tipo tronco), causada por algumas *driver-mutations* — essenciais porque conferem vantagens de crescimento e multiplicação celular —, sobrevivem centenas ou milhares de mutações passageiras, que modificam o clone celular<sup>35</sup>. Stratton acredita que haja entre 1.000 e 10.000 substituições somáticas no genoma do câncer humano<sup>36</sup>.

Desse modo, por exemplo, tumores considerados RE+ podem ter porções RE negativas, assim como em um mesmo tumor podem ocorrer áreas HER-2+ e partes HER-2-, de tal sorte que o fenótipo imuno-histoquímico seja quase sempre misto e não uniforme. Compartimentos celulares com pequenas e diferentes subpopulações, inclusive de células-tronco, com sensibilidades distintas à terapia, têm condições de promover recorrências em médio ou longo prazo<sup>37</sup>.

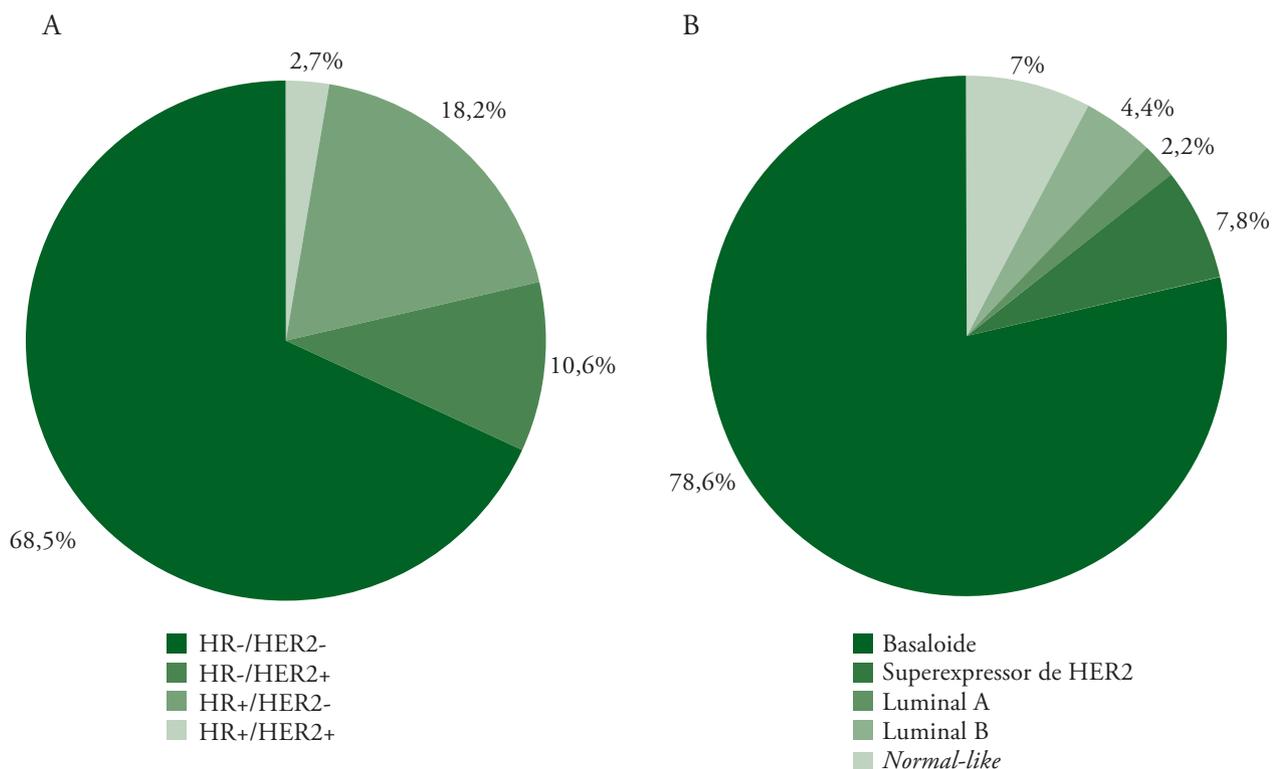
Hipermetilação de determinados genes, hipometilação global, modificações no complexo histonas-cromatina e microRNAs contribuem para a disfunção da expressão gênica e para a heterogeneidade intra e extratumoral.

Um amplo estudo de sequenciamento gênico (*Cancer Genome Atlas Network*) demonstrou que o câncer de mama é entidade

extremamente heterogênea, subsequente a diferentes mecanismos de ativação e inativação de genes<sup>38</sup>. Ao estudar 825 tumores usando 6 plataformas (arranjos de número de cópias do DNA, metilação do DNA, sequenciamento exômico, arranjos de RNAm, sequenciamento de microRNAs e arranjos de proteínas *reverse-phase*), Koboldt et al. procuraram discriminar geneticamente os 4 subtipos intrínsecos clássicos<sup>38</sup>. Essa análise molecular integrada produziu um perfil dos genes *drivers* nos diferentes subtipos. Além disso, comprovou que muitas alterações genéticas e epigenéticas convergem para a formação dos quatro subtipos<sup>38</sup>.

Os tumores luminais A e B foram considerados os mais heterogêneos em termos de expressão gênica, espectro de mutações, alterações de número de cópias e prognóstico. Nestes, contudo, os achados mais comuns foram uma alta expressão de RNAm e das proteínas ESR<sub>1</sub>, GATA3, FOXA1, XBP1 e MYB, que caracterizaram uma assinatura luminal, além de alta taxa de mutação nos genes PIK3CA, MAP3K1 e MAP2KY. O gene TP53 apareceu mutado em 12% de luminais A e em 29% de luminais B.

Existem tipos diferentes de tumores considerados como HER-2+ de acordo com a superexpressão do RNAm e proteínas detectados, respectivamente, por técnicas moleculares e de imuno-histoquímica. O tipo HER-2 RNAm mostra amplificação de DNA associada a superexpressão de outros genes relacionados ao HER-2-amplicon. Entretanto, nem todo HER-2+ por estudo imuno-histoquímico é do subtipo HER-2 RNAm. Quando existe simultaneamente aumento do número de cópias

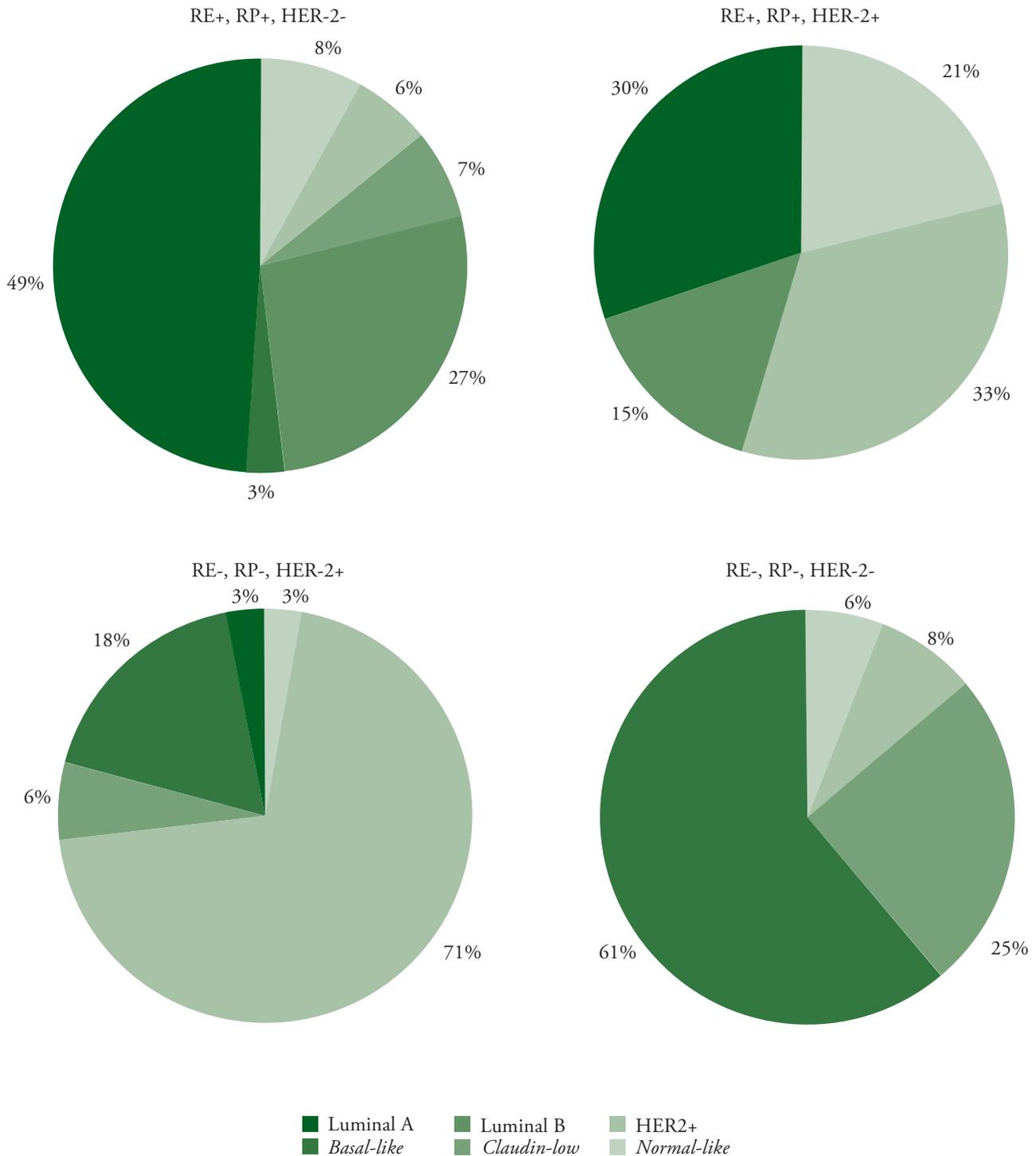


Fonte: Prat et al.<sup>31</sup>

**Figura 2.** Distribuição de subtipos moleculares e imuno-histoquímicos nos tumores basaloides (A) (n=473) e triplo-negativos (B) (n=412)

do gene e alta expressão imuno-histoquímica, ocorre uma superexpressão concomitante de outros receptores tirosina quinase, como EGFR e FGFR4, maior instabilidade genômica, maior número de mutações somáticas incluindo p53 e maior aneuploidia. Apenas metade dos casos HER-2+ corresponde clinicamente a esse padrão de expressão, os demais corresponderiam ao tipo

luminal por análise de expressão de RNAm e estão associados à mutação de GATA3, BCL2 e ESR1. Acredita-se que essa distinção entre os dois grupos de tumores HER-2 seja interessante na busca de marcadores de resposta terapêutica. O encontro de outras mutações associadas aos dois tipos também pode trazer novos alvos terapêuticos



Fonte: Rivenbark et al.<sup>2</sup>

**Figura 3.** Correspondência entre as classificações imuno-histoquímica e molecular

Como já mencionado, 25% dos tumores triplo-negativos não são do tipo basal e existe um esforço para a melhor caracterização desse tipo. A mutação de TP53 foi identificada em 80% dos tumores *basal-like* associada à perda de função de RB e BRCA1. A mutação de PIK3CA ocorreu em 9% dos casos associada a outras alterações que levam a uma superatividade da via PI3K/AKT, como a perda de função de PTEN e a amplificação de PI3K. A via RAS-RAF-MEK também se mostrou amplificada em aproximadamente um terço dos casos, além de superatividade da via HIF1 $\alpha$ /RNT. A questão crítica em relação aos tumores triplo-negativos é o encontro de alvos terapêuticos. Como aproximadamente 20% dos tumores apresentam mutação germinativa ou somática de BRCA1 e BRCA2, sugere-se que possa haver benefício com o uso de inibidores PARP e ou de compostos baseados em platina. Outros potenciais alvos seriam o PTEN e os inibidores da via do PI3K, além de inibidores da via RAS-RAF-MEK e inibidores de angiogênese visando a via HIF1 $\alpha$ .

Apenas três genes aparecem mutados somaticamente em pelo menos 10% dos tumores: GATA3, PIK3CA e TP53. O PIK3CA está envolvido com transdução enzimática, crescimento e sobrevivência celular e sinalização insulínica; o TP53 é gene supressor regulador do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose; o GATA3 é codificador de fatores de transcrição gerenciadores da diferenciação de células luminais. A Tabela 3 discrimina a frequência de mutação desses genes nos distintos subtipos intrínsecos. De forma indiscriminada, considerando-se todos os cânceres de mama, PIK3CA e TP53 aparecem mutados em torno de 30% dos tumores, e o GATA3, em cerca de 10%<sup>39</sup>.

A tal ponto a heterogeneidade tumoral pode ser clinicamente relevante, que quando o exame imuno-histoquímico é realizado em amostras pequenas, como as obtidas em fragmentos de biópsia, recomenda-se a sua repetição na peça cirúrgica final<sup>40</sup>.

## Novas classificações pela segunda geração de técnicas de sequenciamento

O consórcio internacional METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) analisou de forma

**Tabela 2.** Expressão dos receptores estrogênicos nos diferentes tipos moleculares

	RE+	RE-
	(%)	(%)
Luminal A	98	2
Luminal B	99	1
HER-2	56	44
Basaloide	17	83
<i>Claudin-low</i>	35	65
<i>Normal-like</i>	80	20

Fonte: Rivenbark et al.<sup>2</sup>

integrada o genoma e o transcriptoma de aproximadamente 2.000 cânceres de mama seguidos por 15 anos. Resultou uma nova estratificação da neoplasia em 10 diferentes categorias, com evoluções clínicas distintas, baseadas nas alterações no número de cópias (*copy number aberrations* — CNAs)<sup>41</sup>. Demonstraram com essa abordagem que existe um grupo limitado de genes *drivers* envolvidos no comportamento do câncer de mama. Descreveram um grupo de tumores que não exibem CNAs e estão relacionados a anormalidades na resposta imune adaptativa como a deleção de TCR. As deleções do cromossomo 5 estão relacionadas a alterações no controle do ciclo celular e caracterizam o tipo intrínseco basal. Alterações no gene ZNF703 e deleções de subunidades do complexo holoenzimático PP2A e MTAP seriam específicas do tipo luminal B. Essa abordagem também permitiu a identificação de eventos significativos, como a amplificação dos genes KRAS, IGF1R e EGFR, assim como deleções de CDKN2B, BRCA2, RB1, ATM, SMAD4, NCOR1 e UTX, que mesmo quando não muito frequentes poderiam ter implicações na previsão da resposta terapêutica, principalmente a relacionada aos inibidores tirosina quinase. Foram identificados sete subtipos de tumores RE+ e pelo menos duas formas de tumores triplo-negativos. Ficou patente no longo seguimento que existem categorias tumorais hormoniodependentes com evolução natural favorável — a maioria —, mas existem categorias RE+ com prognóstico pior.

## O espectro de tumores classificados como triplo-negativos

Já é clássico afirmar que os tumores triplo-negativos, que correspondem a 10–15% dos casos de câncer de mama<sup>42</sup>, são agressivos. Uma pesquisa canadense (comparação de 180 triplo-negativos com 142 não triplo-negativos) estimou o risco relativo em 5 anos para os triplo-negativos de 4,0 e 1,4, para as metástases visceral e óssea, respectivamente<sup>43</sup>. Em seguimento médio de 9 anos, 43% dos triplo-negativos evoluíram para óbito, contra 30% das outras

**Tabela 3.** Frequência aproximada das mutações genéticas mais comuns nos subtipos de câncer de mama

	Luminal A	Luminal B	HER-2	Basaloide
	(%)	(%)	(%)	(%)
PIK3CA	40–45	29	39	9
TP53	12	29	72	80
GATA3	14	15	2	2
MAP3K1	13	5	4	–
MLL3	8	6	7	5
CDH1	10	5	5	–

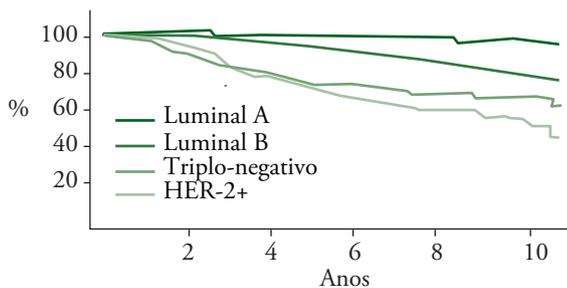
Fonte: Baird e Caldas<sup>39</sup>

lesões. Em média, apenas cerca de 30% das pacientes metastáticas com esses tumores sobrevivem 5 anos.

No Instituto Europeu de Oncologia, usando-se classificação tumoral por critérios imuno-histoquímicos, também se evidenciou o prognóstico desfavorável em triplo-negativos (Figura 4), apenas superado em agressividade pelos superexpressores de HER-2<sup>44</sup>. Foi observada a influência das diferentes morfologias neoplásicas triplo-negativas: o prognóstico é bom nos carcinomas adenoide-císticos e medulares; intermediário nos papilares e apócrinos; ruim nos ductais, lobulares e, principalmente, metaplásicos.

Entretanto, Lehmann et al.<sup>24</sup> mostraram que os triplo-negativos são uma doença heterogênea e que nem todos são desfavoráveis, englobando-se sob esse rótulo um amplo espectro de tumores. A técnica de *cluster analysis* permitiu o reconhecimento de seis subtipos de triplo-negativos com aspectos biológicos peculiares: *basal-like 1*, *basal-like 2*, imunomodulatório, mesenquimal, mesenquimal *stem-like* e luminal com receptores de androgênios (LRA)<sup>24</sup>.

A Tabela 4 ilustra as principais expressões gênicas nesses subtipos. *Basal-like 1* apresenta elevada expressão de genes reguladores do ciclo celular e de resposta ao dano ao DNA que



Fonte: Montagna et al.<sup>44</sup>

**Figura 4.** Sobrevida global nos diferentes subtipos de carcinoma de mama, por classificação imuno-histoquímica

**Tabela 4.** Expressão gênica nos seis subtipos de carcinomas triplo-negativos

Subtipos	Expressão gênica
<i>Basal-like 1</i>	Genes de proliferação (RNA polimerase, MYC, NRAS) - <i>Checkpoints</i> (CHEK1, RADS1, MSH2)
<i>Basal-like 2</i>	EGF, IGF1R, glicolise/gliconeogênese
Imunomodulatório	Processo imunitário (NK, IL, citoquina)
Mesenquimal	Motilidade (ECM, Wnt, catenina) Diferenciação (TJFP, mTOR,...)
Mesenquimal " <i>stem</i> "	Transição epitélio-mesênquima (TWIST, CDH1, - claudinas 3, 4, 7...)
Luminal receptor de androgênio	Genes luminais (FOX A1, XRP1...)

Fonte: Lehman et al.<sup>24</sup>

seriam responsáveis pela alta taxa de proliferação e de expressão de Ki 67 nesse subtipo; o *basal-like 2* tem alteração nas vias envolvendo fatores de crescimento, como EGF, NGF, MET, Wnt/ $\beta$ Catenina e IGF1R. De modo interessante esse tipo tem características de origem basal/mioepitelial com expressão de TP63 e CD10. Os dois mesenquimais são ricos em genes de transição epitélio-mesênquima (TEM), associados a motilidade e diferenciação das celular. Prevalcem as alterações nas vias de sinalização TGF- $\beta$  e em genes relacionados a TEM, como diminuição de expressão de E-caderina e superexpressão de ZEB1, ZEB2, MMP2, ACTA2, TWIST1, etc. No tipo MSL existe um enriquecimento dos genes envolvidos na angiogênese, como o VEGFR2, TEK e TIE1. De modo interessante esse tipo difere do tipo mesenquimal por ter menor expressão dos genes relacionados a proliferação e pela subexpressão das claudinas 3, 4 e 7 consistente com o novo subtipo intrínseco descrito, *claudina-low*. O tipo imunomodulatório está ligado à expressão de genes de resposta imune celular, como vias TH1/TH2, células NK, receptores de células B, dendríticas e células T, e citocinas, IL-7 e IL-12. Os LRA são classicamente RE, porém expressam citoqueratinas luminais e outros genes, como o FOXA1 e XBP1, além de genes relacionados às vias de regulação hormonal, incluindo síntese de esteroides e metabolismo de andrógeno e estrógeno. O RA é expresso nove vezes mais nesse subtipo, quando comparado aos demais (Figura 4), tem bom prognóstico, menor sensibilidade à quimioterapia neoadjuvante e, na teoria, poderá vir a ser tratado com hormonioterapia antiandrogênica (bicalutamida, por exemplo)<sup>45,46</sup>. Interessante foi a observação de que o estímulo androgênico pode ter efeitos paradoxais: com a via da MAP quinase ativada leva a bloqueio do ciclo celular, e com a mesma via inativada, à proliferação celular<sup>47</sup>. Assim, pode ser que a indicação de hormonioterapia antiandrogênica deva se restringir a casos com inativação desta via de sinalização.

A terapia-alvo nos triplo-negativos é extremamente promissora. A mutação de TP53 está presente na grande maioria desses tumores (é a alteração genômica mais comum), e diversas substâncias inibidoras de *checkpoints* G2/M parecem ser mais letais, havendo essa mutação<sup>48</sup>. Estão sendo estudados também inibidores da PARP em BRCA1-2 mutados, de PI3K e de histona desacetilases<sup>49</sup>.

## Referências

1. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 2007;117:3155-63.
2. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer. *Challenges for personalized Medicine.* *Am J Pathol.* 2013;183:1113-24.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-52.

4. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5:5-23.
5. Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ulrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplifications of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
6. Tafe LJ, Tsongalis GJ. The human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2). *Clin Chem Lab Med*. 2012;50:23-30.
7. Carey LA. Breast cancer: HER-2 a good addiction. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;33:637-45.
8. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367-74.
9. Prat A, Perou C. Mammary development meets cancer genomics. *Nature Med*. 2009;15:842-4.
10. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109:123-39.
11. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295:2492-502.
12. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678-85.
13. Foulkes WD, Smith I, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938-48.
14. Turner NC, Reis-Filho JS, Russel AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA 1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2007;26:2126-32.
15. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:564-9.
16. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathol*. 2011;24:157-67.
17. Wu YM, Hu W, Wang Y, Wang N, Gao L, Chen ZZ, et al. Exploring novel targets of basal-like breast carcinoma by comparative gene profiling and mechanism analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;141:23-32.
18. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8:R76.
19. Prat A, Parker JS, Karginava O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Plenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R68.
20. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005;24:4660-71.
21. Lehman-Che J, Hamy A-S, Porcher R, Barrिताult M, Bouhidel F, Habelleh H, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER-2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res*. 2013;15:R 37.
22. Kim S, Jung W, Koo SJ. Differences in autophagy - related activity by molecular subtype in triple-negative breast cancer. *Tumor Biol*. 2012;33:1681-94.
23. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, Carey M, Agarwal R, Meric-Berstam F, et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:2472-8.
24. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750-67.
25. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418-23.
26. Parker JS, Mullins M, Cheang M, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27:1160-7.
27. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Raad RFA, Boon WL, et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and Her-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:2373-8.
28. Millar EK, Graham PH, O'Toole SA, McNeil CM, Browne L, Morey AL, et al. Prediction of local recurrence, distant metastasis, and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel. *J Clin Oncol*. 2009;27:4701-8.
29. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of a local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28:1684-91.
30. Harrel JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132:523-35.
31. Prat A, Adamo B, Cheang M, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18:123-33.
32. Guiu S, Michels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPACT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol*. 2012;23:2997-3006.
33. Garlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366:883-92.
34. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol*. 2012;13:e178-e185.
35. Volgenstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-58.
36. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*. 2011;331:1553-8.
37. Potts SJ, Krueger JS, Landis ND, Eberhard DA, Young GD, Schmechel SC, et al. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue. *Lab Invest*. 2012;92:1342-57.
38. Kobaltd DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-veizer J, McMichael JF. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2012;490:61-70.
39. Baird RD, Caldas C. Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine? *BMC Medicine*. 2013;11:151.
40. Greer LT, Rosman M, Mylander WC, Hooke J, Kovatich A, Sawyer K, et al. Does breast tumor heterogeneity necessitate further immunohistochemical staining on surgical specimens? *J Am Coll Surg*. 2013;216:239-51.
41. Curtis C, Shah SP, Chin S, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486:346-52.

42. Lehman BD, Pietenpol J. Identifications and use of biomarkers in treatment strategies for triple negative breast cancers subtypes. *J Pathol.* 2014;232:142-50.
43. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA, et al. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115:423-8.
44. Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, Canello G, Iorfida M, Balduzzi A, et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. *Clin Breast Cancer.* 2013;13:31-9.
45. He J, Peng R, Yuan Z, Wang S, Peng J, Lin G, et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol.* 2012;29:406-10.
46. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darbi-Esfahani, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130:477-87.
47. Garay JP, Park BH. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2012;2:434-45.
48. Hirshfield KM, Ganesan S. Triple negative breast cancer: molecular subtypes and targeted therapy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2014;26:34-40.
49. Mayer IA, Abramson VG, Lehman BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer – deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res.* 2014;20:782-9.