



Biologia molecular do câncer de mama



Leonard Medeiros da Silva

Oncoclínicas Precision Medicine (OCPM), do Grupo Oncoclínicas em São Paulo



Jorge Sérgio Reis-Filho

*Astrazeneca, VP, Cancer Biomarker Development
Early Oncology, R&D Oncology Unit*



1. Introdução

O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa, exibindo uma grande variedade de características clínicas, morfológicas e moleculares¹. O câncer de mama é a neoplasia maligna de maior incidência entre mulheres no mundo, representando 24,2% do total de casos em 2018, com aproximadamente 2,1 milhões de casos novos. É a quinta causa de morte por câncer em geral (626.679 óbitos) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres².

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões. Para o ano de 2020, foram estimados 66.280 casos novos, o que representa uma taxa de incidência de 43,74 casos por 100 mil mulheres³.

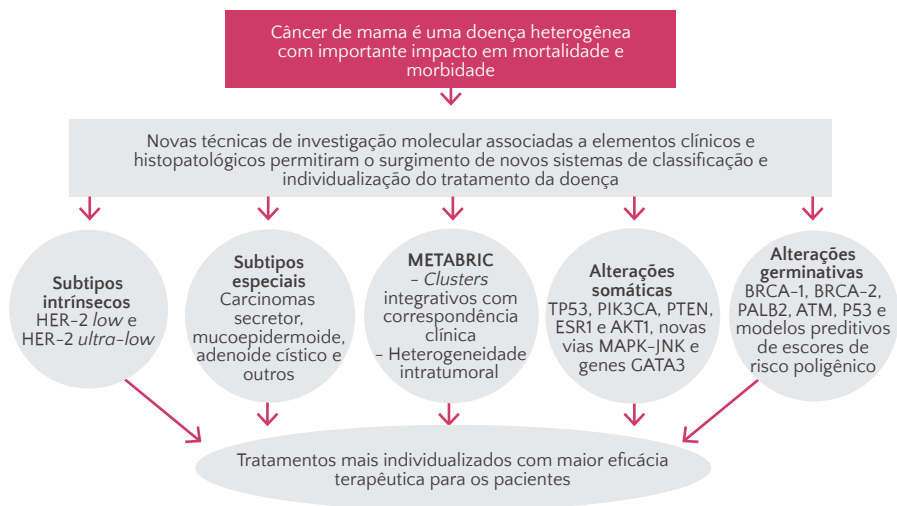
As classificações tradicionais para o câncer de mama incluem avaliação histopatológica e estadiamento clínico e são usadas para orientar o manejo clínico e cirúrgico dos pacientes com auxílio de testagem de biomarcadores, como receptores de estrogênio, progesterona e oncoproteína HER-2. Nos últimos anos, contudo, houve um progresso exponencial na análise molecular, com profundas implicações para a nossa compreensão da biologia do câncer de mama e, consequentemente, da sua classificação.

Existem agora modelos de classificação taxonômica ou clínica baseados em alterações genômicas para a categorização molecular do câncer de mama, incluindo o desenvolvimento de assinaturas prognósticas e preditivas que permitem a individualização do tratamento⁴, bem como mutações que podem orientar o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático.

Iniciativas recentes de análise molecular em grande escala conduzidas por consórcios, como o International Cancer Genome Consortium (ICGC), The Cancer Genome Atlas (TCGA) e o Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (METABRIC), para catalogar alterações somáticas e perfis de expressão gênica refletem o extenso trabalho realizado com o objetivo de refinar as classificações tradicionais usadas para orientar o manejo clínico e cirúrgico dos pacientes.

Neste capítulo, revisamos de forma breve o estado atual das classificações moleculares do câncer de mama, incluindo os subtipos histológicos especiais e suas inserções na prática clínica. A figura 1 faz um sumário dos tópicos abordados neste capítulo.

Figura 1. Classificações moleculares do câncer de mama



2. Os subtipos moleculares intrínsecos de câncer de mama

Os subtipos moleculares intrínsecos de câncer de mama surgiram como resultado dos trabalhos de Perou *et al*⁵ e de Sørli *et al*⁶ há cerca de duas décadas por meio de análise de expressão gênica em carcinomas de mama. De forma breve, esses estudos analisaram a expressão dos genes mais ativamente transcritos por meio da metodologia de *microarrays*. Genes que tiveram expressão mais semelhante entre duas amostras do mesmo paciente *versus* aqueles que variaram entre os tumores de diferentes pacientes foram selecionados para serem utilizados para classificação hierárquica. Com esses critérios, um total de cerca de 550 genes foram identificados e reunidos na chamada lista de genes intrínsecos, porque esses genes refletiriam o fenótipo de tumores individuais.

O agrupamento hierárquico com base nos padrões de expressão desses genes em todas as amostras revelou dois *clusters* principais, estratificados principalmente de acordo com o status (positivo ou negativo) do receptor de estrogênio (RE), e um total de cinco *subclusters*, chamados de subtipos moleculares intrínsecos, que evidenciaram uma correlação com a evolução clínica da doença.

Dentro dos cinco subtipos intrínsecos, o maior *cluster* é dominado por tumores RE positivos, os quais têm frequentemente dois *subclusters*, ambos dominados pela expressão de genes normalmente expressos por células epiteliais lumbinais da mama (então chamados de cânceres lumbinais da mama). Um desses *subclusters* foi denominado de luminal B, por exibir geralmente uma expressão



maior de genes envolvidos com proliferação celular, e outro, em contrapartida, foi denominado de luminal A.

O segundo *cluster* principal é enriquecido para tumores RE negativos. Esse *cluster* tem dois *subclusters*. Um deles é representado por carcinomas de mama triplo-negativos, mostrando expressão de genes típicos de célula mioepitelial ou basal, como as citoqueratinas basais, e assim foram denominados como tumores do tipo basal ou *basal-like*. O segundo *subcluster* é frequentemente dominado por alta expressão de genes relacionados com o gene HER-2 e suas vias moleculares (chamados de HER-2 enriquecidos).

O quinto *subcluster* dos subtipos intrínsecos é representado por tumores que tiveram expressão gênica semelhante aos padrões encontrados em amostras de tecido mamário normal e, assim, foram chamados de *normal-like*. Números estudos subsequentes demonstraram que esse *subcluster* constitui um artefato de análise por *microarrays*, dado que simplesmente constitui um grupo de tumores cujas amostras continham uma quantidade substancial de tecido mamário normal.

Posteriormente, dentro dos tumores RE negativos dos subtipos intrínsecos do tipo basal ou *basal-like* e HER-2 enriquecido, outros subtipos surgiram, incluindo tumores com claudina baixa (*claudin-low*), dos quais 60% a 70% são de imunofenótipo triplo-negativo⁷, e os apócrinos moleculares, caracterizados pela expressão do receptor de andrógeno, ativação da via do receptor de andrógeno e desfecho clínico insatisfatório^{8,9}.

Mais recentemente, o câncer de mama triplo-negativo foi subclassificado em seis subtipos (basal I, basal II, mesenquimal, mesenquimal *stem-like*, imunomodulador e receptor de andrógeno luminal)¹⁰ ou quatro subtipos (receptor de andrógeno luminal, mesenquimal, imunossuprimido do tipo basal e imunoativado do tipo basal)¹¹. Estudos subsequentes demonstraram que o número de subtipos moleculares de tumores triplo-negativos é provavelmente quatro, dado que o subtipo mesenquimal *stem-like* constitui apenas amostras com uma quantidade desproporcional de células estromais, enquanto o subtipo imunomodulador apenas representava tumores triplo-negativos em que a quantidade de células inflamatórias era muito grande¹². Essas subclassificações suscitam a possibilidade de correspondência de subtipos da doença com terapias direcionadas específicas¹³. Além disso, a classificação de seis subtipos mostrou estar associada com respostas distintas à quimioterapia neoadjuvante¹⁴.

Em outro experimento, METABRIC usou uma abordagem combinada para a descoberta de *clusters*. Genes cuja expressão em tumores estava na condição cis (situação na qual, em um cromossomo, existem apenas alelos dominantes

– AB, enquanto no outro encontramos apenas alelos recessivos – ab) por alterações recorrentes no número de cópias (CNAs), que por definição enriquecem para *drivers* genômicos (oncogenes, aqueles cuja superexpressão está associada com ganhos ou ampliações de número de cópias, e tumores de genes supressores, aqueles cuja subexpressão está associada com perda de número de cópias), foram identificados pela primeira vez usando uma análise de expressão modificada quantitativa de *trait loci*.

Esses genes em cis foram então usados para agrupar os tumores em grupos chamados *clusters* integrativos¹⁵. A análise classificou os tumores em dez subtipos (*clusters* integrativos). De forma sucinta, esse experimento evidenciou que seis dos *clusters* integrativos (1, 2, 3, 6, 7 e 8) são dominados por amostras dos subtipos luminal A e luminal B, definidas pelo PAM50. As amostras no *cluster* integrativo 5 são RE positivas e RE negativas, e as alterações genômicas são dominadas pela amplificação de alto nível em 17q, centralizado e incluindo o gene HER-2. O grupo dominado por amostras RE negativas foi o *cluster* integrativo 10, englobando tumores com várias CNAs afetando a maioria dos cromossomos.

Em conjunto, esses experimentos demonstram que, independentemente de qual nível molecular é analisado, os carcinomas de mama podem ser estratificados em distintos subtipos de forma significativa em termos de biologia e aspectos clínicos. Em particular, esses estudos demonstraram que o transcriptoma dos tumores RE positivo é fundamentalmente diferente do transcriptoma dos carcinomas mamários RE negativos e que, entre os tumores com RE positivo, o nível de expressão dos genes relacionados à proliferação não apenas determina os subgrupos, mas também o prognóstico desses pacientes. Enquanto tumores luminais A têm baixa expressão de genes relacionados à proliferação e ao bom prognóstico, tumores luminais B têm alta expressão de genes relacionados à proliferação e ao prognóstico mais adverso¹⁶.

3. Assinaturas genômicas

O câncer de mama é heterogêneo em nível molecular, com diferentes padrões de expressão gênica levando a diferenças de comportamento e prognóstico¹. Nos últimos anos, tem havido um esforço considerável para caracterizar e classificar o câncer de mama em nível molecular, a fim de adequar o tratamento de maneira eficaz. No entanto, devido às restrições de tempo e custo, na grande maioria dos sistemas de saúde, a classificação molecular substituta do câncer de mama ainda é amplamente baseada na avaliação imuno-histoquímica de biomarcadores (RE, receptor de progesterona, HER-2 e Ki-67).



A análise de padrões globais de expressão gênica (especialmente de genes envolvidos na regulação de proliferação e outros aspectos importantes do comportamento celular, como invasão) resultou na identificação de subtipos moleculares intrínsecos de relevância biológica e clínica e de assinaturas genômicas preditivas de resultado ou de resposta à terapia, que podem contribuir para decisões terapêuticas. As assinaturas genômicas podem contribuir para a decisão sobre tratamentos após a cirurgia, especialmente a indicação de quimioterapia. No entanto, salienta-se que essas assinaturas não substituem a avaliação médica multidisciplinar.

Várias plataformas baseadas na expressão de genes foram desenvolvidas e estão comercialmente disponíveis, tais como OncoType DX¹⁷, MammaPrint¹⁸, Breast Cancer Index (BCI)¹⁹, PAM50²⁰ e EndoPredict²¹, sumarizadas na tabela 1. Essas plataformas têm sido implementadas no ambiente clínico para ajudar os médicos a decidirem quais pacientes não teriam necessidade de receber quimioterapia.

Tabela 1. Sumário de algumas assinaturas genômicas disponíveis

	EndoPredict	Mamma-Print	BCI	OncoType DX	PAM50
Genes	8	70	7	21	50
Tipo de amostra	FFPE	FFPE ou fresco-congelado	FFPE	FFPE	FFPE
Evidência clínica prospectiva	Não	Sim (MIN-DACT)	Não	Sim (TAILORx e RxPONDER)	Não
Cenário clínico de uso para decisão terapêutica	Câncer de mama RE positivo e HER-2 negativo. Usado para prever o risco de recorrência distante do câncer de mama	Estimar risco de recorrência como alto ou baixo, com o objetivo de evitar a quimioterapia	Estimar risco de câncer de mama RE positivo e HER-2 negativo recidivar após cinco anos	Estimar o risco de recorrência, em doença inicial, RE positivo e HER-2 negativo	Tomar decisões sobre o tratamento, baseado no risco de recorrência, de câncer RE positivo e HER-2 negativo

Essas assinaturas de genes de primeira geração são compostas de listas de genes diferentes. Todas identificam conjuntos de pacientes com câncer de mama com bom ou mau prognóstico com base nos níveis de expressão de genes,

em geral associados à proliferação celular^{22,23}. Além disso, essas assinaturas têm seu maior poder discriminatório na doença RE positiva. O valor prognóstico das assinaturas genômicas em tumores RE negativos é limitado, uma vez que mais de 95% dos tumores RE negativos têm altos níveis de expressão de genes relacionados à proliferação. Atualmente, o valor prognóstico oferecido por essas assinaturas genômicas tem sido considerado ser complementar às informações prognósticas fornecidas por parâmetros clínicos patológicos clássicos²⁴ e algumas têm recebido grande aceitação pela comunidade médica e de pesquisa²⁵.

A importância das assinaturas genômicas é enfatizada na mais nova atualização do sistema de estadiamento do câncer de mama da AJCC, de 2017. Nessa atualização, quando os dados moleculares estão disponíveis, eles podem influenciar na classificação prognóstica da doença, fornecendo informações adicionais à avaliação TNM tradicional.

4. Subtipos histológicos especiais de câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea que compreende várias entidades com distintos fenótipos, biologia celular, características moleculares, apresentações clínicas e respostas à terapia. A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para neoplasia da mama reconhece formas comuns da doença, os chamados carcinomas invasivos do tipo não especial (CINE), além de mais de 20 subtipos especiais de câncer de mama, que exibem características histopatológicas e/ou moleculares próprias. Esses últimos correspondem a cerca de 20% de todos os cânceres de mama invasivos¹.

Evidências da literatura demonstram que os subtipos especiais de câncer de mama exibem correlações genotípico-fenotípicas recorrentes. Em nível molecular, os subtipos histológicos especiais são mais homogêneos do que os CINEs. Existem novos genes *drivers* e/ou mutações *hotspots* comuns em um subtipo especial de câncer de mama mais infrequentes ou inexistentes em outros subtipos especiais ou entre os CINEs.

Para a ilustração deste capítulo, exemplificaremos as características de quatro subtipos histológicos especiais de câncer de mama: o carcinoma adenoide cístico, o carcinoma secretor, o carcinoma mucoepidermoide e o carcinoma de células altas com polaridade reversa. As características biológicas e clínicas desses quatro subtipos histológicos especiais de câncer de mama demonstram a importância do diagnóstico assertivo nesse cenário.

O carcinoma adenoide cístico (CAC) é um subtipo histológico raro de câncer de mama, representando menos de 0,1% dos carcinomas de mama. Esses tumores



são caracterizados por uma dupla população de células, incluindo um componente mioepitelial e um epitelial. Em contraste com CACs que surgem nas glândulas salivares, que muitas vezes apresentam um desfecho clínico insatisfatório, os CACs de mama geralmente têm um curso clínico indolente. CACs exibem rearranjo do gene MYB, resultando frequentemente no gene de fusão MYB-NFIB. Existe uma variante sólida do CAC com morfologia basaloide e composto predominantemente por células epiteliais. Essa variante demonstra rearranjos MYB em menos de 20% dos casos, exibe alterações que afetam a via e parece exibir um quadro clínico mais agressivo do que a forma clássica de CAC²⁶.

Os carcinomas secretores da mama exibem um fenótipo próprio, exibindo padrões arquiteturais tubular, sólido e/ou microcístico e abundante secreção intra e extracelular, semelhante a um coloide. A alteração genética característica dessa entidade é o gene de fusão ETV6-NTRK3²⁷. O diagnóstico de carcinoma secretor tem profundas implicações clínicas. Pacientes com recorrência ou carcinomas secretores metastáticos agora são elegíveis para tratamento com um dos inibidores de TRK aprovados para uso clínico pelo Food and Drug Administration (FDA), demonstrando respostas profundas e duradouras, mesmo no contexto de um comportamento clínico agressivo.

O carcinoma mucoepidermoide é frequentemente diagnosticado em tecido de glândula salivar, porém, raramente acomete a mama. Em virtude de sua raridade, muitas vezes não é diagnosticado como tal, sendo às vezes classificado erroneamente como carcinoma metaplásico com diferenciação escamosa. Esses tumores são histologicamente indistinguíveis, independentemente de sua origem anatômica, e são compostos por vários tipos de células, incluindo células mucinosas, escamosas e intermediárias²⁸. Os carcinomas mucoepidermoides com origem na glândula salivar frequentemente evidenciam a translocação t(11;19)(q14-21;p12-13)/t(11;15)(q21;q26), resultando no gene de fusão CRTC1-MAML2/CRTC3-MAML2²⁹ e exibem imunofenótipo triplo-negativo. O carcinoma mucoepidermoide da mama também exibe fusão CRTC1-MAML2³⁰ e, ao contrário de CINs triplo-negativos, exibe uma carga de mutação baixa e ausência de mutações em genes de câncer comumente alterados e tem perfis de número de cópia de gene simples³⁰.

O carcinoma de células altas com polaridade reversa (TCCRP), também conhecido como carcinoma papilífero sólido com polaridade reversa ou tumor de mama semelhante à variante de células altas do carcinoma papilífero da tireoide, é outro subtipo histológico raro de câncer de mama, com uma histologia única. TCCRPs exibem um fenótipo remanescente ao da variante de células altas do carcinoma papilífero da tireoide, visto que apresentam uma forma papilar sólida e arquitetura folicular e são compostas por altas células com núcleos

localizados no polo celular apical (polarização reversa), com núcleos com sulcos e clareamento. Mutações em TCCRP_s exibem *hotspots* recorrentes de IDH2 R172, que frequentemente ocorrem com alterações genéticas nos genes da via PI3K. Mutações IDH2 R172 podem ser detectadas por análise imuno-histoquímica usando anticorpos de mutação específicos (IDH2 R172S ou IDH1 ou IDH2 – R132 ou 172) de uma maneira sensível e específica, tanto em biópsia como no espécime cirúrgico^{1,31–36}.

As análises genômicas e transcriptômicas dos subtipos histopatológicos especiais estão contribuindo para refinar a taxonomia dos cânceres de mama, identificar novas alterações genéticas patognomônicas e melhorar a condução diagnóstica e terapêutica.

5. Genética germinativa do câncer de mama

A análise genética da predisposição familiar ao câncer de mama e das alterações dos genes estabelecidos e emergentes relacionados é tema de discussão frequente na prática clínica. Mutações germinativas no gene BRCA-1 humano são responsáveis por 40% a 50% dos casos em famílias com múltiplos cânceres de mama e conferem maior risco para o desenvolvimento de cânceres de ovário, cólon e próstata^{37,38}. Perda de BRCA-1 ou BRCA-2 leva a uma deficiência no reparo de quebras da dupla-fita de DNA (deficiência de recombinação homóloga), levando à instabilidade genômica e, portanto, à predisposição ao câncer³⁹. O gene PALB2 também é cada vez mais considerado um importante gene de predisposição. Todos os três seriam considerados para teste em pacientes com suspeita de câncer com predisposição familiar.

Mutações em outros genes (TP53, PTEN, CHEK2 e ATM) têm evidências limitadas de seu uso em testes de rotina – principalmente devido a dados limitados sobre penetrância e frequência na população e à falta de dados sobre variações étnicas. Em parte devido a essas limitações, variantes de significado desconhecido são comumente encontradas nesses genes, tornando o manejo do paciente um desafio.

Modelos preditivos (a citar, U-Penn, Myriad II, BODICEA, IBIS e Manchester) são usados atualmente para determinar elegibilidade para testes genéticos e, portanto, aconselhamento e prevenção. Uma vez que os portadores da mutação são identificados, o gerenciamento inclui vigilância intensificada usando uma variedade de métodos, inclusive imagem de ressonância magnética (MRI), quimioprevenção e cirurgia profilática. Esses métodos mostraram melhorar os resultados dos pacientes com cânceres associados a mutações BRCA⁴⁰.



O rastreamento da predisposição familiar também impacta a patologia. As características clínicas, morfológicas e imuno-histoquímicas dos tumores podem ser identificadas pelos patologistas como potencialmente relacionadas a algumas síndromes hereditárias. Por exemplo: síndromes hereditárias associadas a mutações BRCA-1 e BRCA-2 tendem a estar relacionadas a tumores bilaterais que surgem principalmente em uma idade jovem e, no caso de síndromes associadas a BRCA-1, a tumores bem demarcados compostos de ninhos sólidos e um infiltrado linfoplasmocitário, proeminente atipia nuclear, alto grau e alta atividade mitótica⁴¹.

O câncer de mama triplo-negativo pode ser um indicador adicional de mutações germinativas subjacentes associadas à deficiência de recombinação homóloga, sem história familiar, dado que 11% a 14% dos tumores triplo-negativos têm mutações germinativas do BRCA-1. Esse ponto enfatiza a importância para o patologista da identificação adequada e confiável daqueles pacientes com subtipos específicos de câncer de mama, nesse caso, câncer de mama triplo-negativo. A importância do patologista reside na identificação potencial desses pacientes com base em análises morfológicas e imuno-histoquímicas detalhadas.

Do ponto de vista de manejo clínico, pacientes com deficiência de recombinação homóloga, comumente associada a mutações germinativas e/ou somáticas em BRCA-1 e/ou BRCA-2, mostram sensibilidade aos inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP)⁴². Os patologistas podem auxiliar na identificação desses pacientes, conhecendo as situações em que esses biomarcadores são mais bem aplicados e o contexto de sua interpretação.

Recentemente, observamos um interesse crescente na suscetibilidade multigênica do câncer de mama e no uso de escores de risco poligênico. A magnitude do risco associado a cada alelo de suscetibilidade ao câncer de mama de baixa penetrância individual é muito baixa, mas esses riscos parecem se combinar de forma múltipla, de modo que o risco de câncer de mama associado ao transporte de uma grande proporção desses alelos pode ser substancial. Um escore de risco poligênico pode ser usado para identificar se as intervenções de redução de risco devem ser exploradas para todas as mulheres, mesmo na ausência de uma variante patogênica de alto risco⁴³.

6. Genética somática do câncer de mama

A genômica representa o estudo do genoma (a sequência inteira do DNA), a organização do material genético e as consequências funcionais das variações da sequência. O sequenciamento paralelo maciço de DNA permitiu uma visão

sobre frequências e distribuições de uma gama de tipos de mutação, incluindo substituições de bases, pequenas inserções e deleções, bem como rearranjos estruturais e CNAs. Essas séries de dados de mutação em grande escala apoiam o conceito de que alguns genes parecem ser *drivers* importantes na evolução de diferentes subtipos de câncer de mama e que existe uma associação entre esses *drivers* genômicos e os subtipos moleculares intrínsecos⁴.

De forma mais específica e extensamente revisado por Ng *et al*⁴, os estudos de sequenciamento paralelo maciço de DNA revelaram que as frequências de mutação encontradas nos cânceres de mama são semelhantes aos carcinomas de células claras de ovário ou renais, mas inferior aos de bexiga urotelial (8,03 mutações somáticas/Mb) ou aos carcinomas de células escamosas do pulmão (9,92 mutações somáticas/Mb). Dependendo da seleção dos casos, do tamanho da amostra e de ferramentas de análise utilizadas, diferentes estudos revelaram conjuntos distintos de genes significativamente mutados de câncer de mama. No entanto, é importante ressaltar que PIK3CA, TP53, GATA3, MAP3K1, AKT1 e CBFB foram evidenciados em múltiplos estudos independentes^{44,45} como genes significativamente mutados e provavelmente constituem *drivers* da doença.

No geral, os genes significativamente afetados por mutações incluíram genes e vias conhecidas por serem aberrantes em cânceres de mama, incluindo TP53 ou a via PI3K (por exemplo, PIK3CA, PTEN e AKT1). No entanto, estudos de sequenciamento paralelo maciço de DNA também revelaram vários genes significativamente mutados de processos funcionais ou celulares, que anteriormente não eram considerados atores importantes na biologia do câncer de mama, incluindo a via MAPK-JNK (por exemplo, MAP3K1, MAP2K4 e NF1), fatores de transcrição e reguladores (por exemplo, GATA3, RUNX1 e CBFB), fatores de *splicing* (por exemplo, SF3B1) e remodeladores de cromatina (por exemplo, MLL3 e ARID1A)^{44,45}.

Outra faceta do câncer de mama, evidenciada pelos recentes estudos de sequenciamento, refere-se à heterogeneidade intratumoral. Por exemplo: hoje sabemos que vários graus de heterogeneidade genética intratumoral são evidentes na maioria dos carcinomas de mama triplo-negativos, com aproximadamente dois terços destes sendo compostos de clones geneticamente distintos no momento do diagnóstico⁴. Em termos práticos, o diagnóstico de câncer de mama em um paciente pode significar em algumas circunstâncias a presença de várias doenças clonalmente distintas.

Em relação à progressão clínica da doença, evidenciamos um paralelo com o observado em nível molecular. A literatura evidencia que alguns cânceres de mama primários exibem múltiplos clones geneticamente diversos no momento do diagnóstico e que as lesões metastáticas podem apresentar alterações genéticas somáticas diferentes quando comparados com seus respectivos tumores



primários. Em parte, essas evidências ajudam a entender melhor as razões pelas quais pacientes com uma doença clinicamente semelhante demonstram respostas clínicas e prognósticos diferentes uma vez instituída uma linha de tratamento.

Tal como acontece com outras terapias, a resistência intrínseca e adquirida à terapia hormonal em câncer de mama está relacionada à recorrência da doença e ao benefício clínico limitado. Estudos genômicos têm evidenciado possíveis vias de resistência e alternativas de manejo clínico de pacientes resistentes à terapia hormonal em câncer de mama avançado. Por exemplo: mutações em ESR1 (em *hotspots*), ERBB2 e NF1 demonstraram diferença na frequência mutacional entre os cânceres de mama RE positivos e HER-2 negativos pré e pós-terapia hormonal, além de serem mutualmente excludentes. Tais achados abrem caminho para a seleção de pacientes e tratamentos alternativos para pacientes potencialmente resistentes à terapia hormonal em câncer de mama⁴⁶.

A disseminação metastática é a principal causa de morte em câncer de mama. O aumento na carga mutacional e na diversidade clonal tem sido observado quando comparamos o câncer metastático com o câncer de mama inicial. O metastático é enriquecido em alterações genômicas clinicamente relevantes e mais complexas do que o inicial. Por exemplo: hoje existem cenários clínicos em que é necessário o sequenciamento do gene PIK3CA para definição sobre a possibilidade de uso do inibidor de PI3K alpelisibe (aprovado pelo FDA em 2019 para tratamento do câncer de mama RE positivo metastático ou localmente avançado). Acredita-se que a identificação de alterações genômicas associadas a desfechos desfavoráveis permitirá a seleção mais precoce e melhor dos pacientes que necessitam de tratamentos de forma mais precoce no curso da doença⁴⁷.

7. HER-2 *low* e HER-2 *ultra-low*

No câncer de mama, as diretrizes de testagem de HER-2 se baseiam na identificação da superexpressão da oncoproteína HER-2 ou na amplificação do gene HER-2 para identificar pacientes que podem se beneficiar de tratamentos que inibem a sinalização de HER-2⁴⁸.

As diretrizes de 2023 da American Society of Clinical Oncology (ASCO) e do College of American Pathologists (CAP) para análise do estudo imuno-histoquímico para pesquisa de expressão da oncoproteína HER-2 recomendam a utilização de três categorias de interpretação: negativo (escores 0 e 1+), equívoco (2+) e positivo (3+)⁴⁸.

Em 2022, o estudo DESTINY-Breast04 observou que um grupo de pacientes com câncer de mama avançado ou metastático e HER-2 escores 1+ e 2+ com

FISH negativo tiveram benefício clínico com terapia anti-HER-2 (trastuzumabe-deruxtecano – TDxd) e, assim, foram rotulados como HER-2 *low* para simplificação da terminologia⁴⁹.

Mais recentemente, no estudo DESTINY-Breast06, observou-se que um subgrupo de pacientes com câncer de mama avançado ou metastático e HER-2 com escores maiores que 0 e menores que 1+ também tiveram benefício clínico com terapia anti-HER-2 (TDxd). Assim, foram rotulados como HER-2 *ultra-low*, para simplificação da terminologia⁵⁰. No DESTINY-Breast06, a metodologia para pesquisa de expressão da oncoproteína HER-2 se baseou em estudo imuno-histoquímico em laboratório central utilizando anticorpo monoclonal de coelho Ventana Pathway anti-HER-2/*neu* 4B5 em instrumento BenchMark Ultra.

O subgrupo HER-2 *ultra-low* engloba os pacientes com HER-2 com escores maiores que 0 e menores que 1+ que são assim diagnosticados quando é observada coloração membranar fraca ou pouco perceptível e incompleta em um percentual de células neoplásicas maior que 0% e menor que 10% da amostra, verificado por meio de estudo imuno-histoquímico e seguindo as recomendações de 2023 da ASCO e do CAP para pesquisa de expressão da oncoproteína HER-2.

8. Conclusão

Os novos métodos de análise de expressão e de sequenciamento gênico possibilitaram a análise do câncer de mama em uma resolução sem precedentes. Em suma, observamos que:

- Em nível molecular, os cânceres de mama positivos e negativos para receptor de estrogênio são doenças completamente diferentes.
- Existe heterogeneidade genética intratumoral dentro dos grandes grupos de cânceres de mama positivos e negativos para receptor de estrogênio.
- O diagnóstico correto de subtipos especiais de câncer de mama é importante para a condução terapêutica.
- O uso de assinaturas genômicas e de modelos preditivos de mutações germinativas vem sendo incorporado à prática clínica.
- Evidenciamos: que existem poucos genes com mutações altamente recorrentes, como TP53, PIK3CA e GATA3; que não há dois cânceres de mama que exibam um repertório idêntico de alterações genéticas



somáticas em resolução de pares de bases; e que pode não haver um único gene mutado altamente recorrente que caracterize cada um dos subtipos moleculares intrínsecos (a citar, os subtipos basal ou *basal-like*, HER-2 enriquecido, luminal A e luminal B).

Ressaltamos que a taxonomia derivada do incremento das novas técnicas moleculares na prática clínica deverá ser dinâmica, possibilitando a inclusão de novos conhecimentos, procedimentos de diagnóstico ou modalidades de tratamento que emergem frequentemente. Essa classificação com evolução dinâmica pode ser exemplificada com a introdução da definição do subgrupo de pacientes HER-2 *low* e HER-2 *ultra-low* com potencial importância clínica em termos de predição de reposta terapêutica^{49,50} e, também, com a recente utilização do marcador Ki-67 em diretrizes do National Comprehensive Cancer Network (NCCN)⁵¹.

O processo atualmente em prática de tentar classificar o câncer de mama em nível molecular tem o potencial de adequar ou individualizar o tratamento de forma mais assertiva. Além disso, informações originadas de forma multidisciplinar e em larga escala (*big data*) ajudarão os médicos e demais membros do time da equipe de saúde a tomar decisões de tratamento mais eficazes e a selecionar subgrupos de pacientes para ensaios clínicos e de pesquisa translacional mais bem direcionados.

Referências

1. World Health Organization (WHO). Breast tumours: WHO classification of tumours, 5ª ed. WHO Classification Editorial Board; 2019.
2. World Health Organization (WHO); International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory – Cancer causes. [Internet] Acesso em: 3 ago 2024. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/en>>.
3. Instituto Nacional do Câncer (Inca). Estimativa 2020 – Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2019.
4. Ng CK, Schultheis AM, Bidard FC et al. Breast cancer genomics from microarrays to massively parallel sequencing: paradigms and new insights. J Natl Cancer Inst. 2015;107(5):djv015.
5. Perou CM, Sørli T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(6797):747–52.
6. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(19):10869–74.
7. Prat A, Parker JS, Karginova O et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res. 2010;12(5):R68.
8. Doane AS, Danso M, Lal P et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. Oncogene. 2006;25(28):3994–4008.
9. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. Oncogene. 2005;24(29):4660–71.

10. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-67.
11. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1688-98.
12. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157368.
13. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014;232(2):142-50.
14. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5533-40.
15. Curtis C, Shah SP, Chin SF et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
16. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011;378(9805):1812-23.
17. Paik S, Shak S, Tang C et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.
18. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
19. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE et al. Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin Cancer Res*. 2013;19(15):4196-205.
20. Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
21. Filipits M, Rudaš M, Jakesz R et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6012-20.
22. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(6):560-9.
23. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX®) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier™ in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist*. 2012;17(4):492-8.
24. Azim HA Jr, Michiels S, Zagouri F et al. Utility of prognostic genomic tests in breast cancer practice: the IMPAKT 2012 Working Group consensus statement. *Ann Oncol*. 2013;24(3):647-54.
25. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
26. Pareja F, Weigelt B, Reis-Filho JS. Problematic breast tumors reassessed in light of novel molecular data. *Mod Pathol*. 2021;34(suppl.1):38-47.
27. Skalova A, Vanecek T, Sima R et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:599-608.
28. Foschini MP, Morandi L, Asioli S et al. The morphological spectrum of salivary gland type tumours of the breast. *Pathology*. 2017;49(2):215-27.
29. Nakayama T, Miyabe S, Okabe M et al. Clinicopathological significance of the CRTC3-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol*. 2009;22(12):1575-81.
30. Bean GR, Krings G, Otis CN et al. CRTC1-MAML2 fusion in mucoepidermoid carcinoma of the breast. *Histopathology*. 2019;74(3):463-73.
31. Colella R, Guerriero A, Giansanti M et al. An additional case of breast tumor resembling the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2015;23(3):217-20.
32. Masood S, Davis C, Kubik MJ. Changing the term "breast tumor resembling the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma" to "tall cell variant of papillary breast carcinoma". *Adv Anat Pathol*. 2012;19(2):108-10.



33. Eusebi V, Damiani S, Ellis IO et al. Breast tumor resembling the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: report of 5 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(8):1114-8.
34. Cameselle-Teijeiro J, Abdulkader I, Barreiro-Morandeira F et al. Breast tumor resembling the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: a case report. *Int J Surg Pathol*. 2006;14(1):79-84.
35. Foschini MP, Asioli S, Foreid S et al. Solid papillary breast carcinomas resembling the tall cell variant of papillary thyroid neoplasms: a unique invasive tumor with indolent behavior. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(7):887-95.
36. Chiang S, Weigelt B, Wen HC et al. IDH2 mutations define a unique subtype of breast cancer with altered nuclear polarity. *Cancer Res*. 2016;76(24):7118-29.
37. Thompson D, Easton DF. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(18):1358-65.
38. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(23):2339-47.
39. Venkিতaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002;108(2):171-82.
40. Domchek SM, Eisen A, Calzone K et al. Application of breast cancer risk prediction models in clinical practice. *J Clin Oncol*. 2003;21(4):593-601.
41. Vos S, Elias SC, van der Groep P et al. Comprehensive proteomic profiling-derived immunohistochemistry-based prediction models for BRCA1 and BRCA2 germline mutation-related breast carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(9):1262-72.
42. Lyons TG, Robson ME. Resurrection of PARP inhibitors in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(9):1150-6.
43. Sawyer S, Mitchell G, McKinley J et al. A role for common genomic variants in the assessment of familial breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4330-6.
44. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-9.
45. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495-501.
46. Razavi P, Chang MT, Xu G et al. The genomic landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers. *Cancer Cell*. 2018;34(3):427-38.
47. Bertucci F, Ng KY, Patsouris A et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature*. 2019;569(7757):560-4.
48. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2023;147(9):993-1000.
49. Modi S, Saura C, Yamashita T et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(7):610-21.
50. Curigliano G, Hu X, Dent RA et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) vs physician's choice of chemotherapy (TPC) in patients (pts) with hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-low or HER2-ultralow metastatic breast cancer (mBC) with prior endocrine therapy (ET): Primary results from DESTINY-Breast06 (DB-06). *J Clin Oncol*. 2024;42(suppl.17):LBA1000.
51. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN guidelines for breast cancer v.1.2022 – interim on 10/18/21. [Internet] Acesso em: 3 ago 2024. Disponível em: <www.nccn.org/guidelines/guidelines-process/transparency-process-and-recommendations//GetFileFromFileManager?fileManagerId=13080>.