

ORIGINAL

Estudio mutacional de *EGFR* y *PIK3CA* y de hipermetilación del promotor del gen *BRCA1* en cáncer de mama tipo «triple negativo»



Esther Sanfeliu^{a,*}, Rubén Carrera^b, María Carmen Ramos^b, José Vazquez^b
y Francisco Javier Andreu^b

^a Servicio de Anatomía Patológica, Centro Médico Teknon-Quironsalud, Barcelona, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Consorcio Sanitario Parc Taulí, Hospital Universitario, Sabadell, España

Recibido el 24 de abril de 2017; aceptado el 21 de septiembre de 2017

Disponible en Internet el 27 de noviembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Mama;
Cáncer;
Mutaciones

Resumen

Introducción: El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea a nivel clínico, morfológico y biológico, que se clasifica en diferentes subgrupos. El tipo «triple negativo» representa el 10-20% de todos los cánceres de mama, frecuentemente muestra expresión de marcadores basales, afecta a mujeres jóvenes y tiene mal pronóstico, sin una terapia dirigida.

Material y método: Estudio retrospectivo de análisis de tres alteraciones moleculares (mutación de *EGFR* y *PIK3CA* e hipermetilación del promotor del gen *BRCA1*), mediante la técnica de pirosecuenciación, en 60 casos de cáncer de mama «triple negativo».

Resultados: Un 28,33% de las pacientes fueron diagnosticadas con 50 o menos años, y el 16,67% progresaron por diseminación vía hematogénea con metástasis viscerales y murieron (menos una) en un intervalo de entre 1-5 años desde el diagnóstico. En 5 de los 16 casos estudiados se encontró una mutación patogénica de *BRCA1*. Inmunohistoquímicamente la mayoría eran tumores con alto índice proliferativo de Ki67 y un 73,33% eran «basal-like» por expresión de CK5/6 y/o *EGFR*. A nivel molecular, no se encontraron mutaciones activadoras de *EGFR*, aunque el 53,33% de los casos mostraron sobreexpresión inmunohistoquímica de *EGFR*. La mutación de *PIK3CA* se detectó en un 10% de casos, con predominio en exón 20 y con coexpresión de receptores de andrógenos en la mitad de los casos. La hipermetilación de la región promotora del gen *BRCA1* estaba presente en un 25% de los casos, coexistiendo en un caso con hipermetilación del estroma no tumoral y en dos con mutación patogénica del gen *BRCA1*.

Conclusiones: El hallazgo de alguna alteración molecular específica, aunque sea infrecuente, puede plantear una posible diana terapéutica dirigida.

© 2017 SESPM. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lab32@hclaboratoris.com (E. Sanfeliu).

KEYWORDSBreast;
Cancer;
Mutations**Study of the *EGFR* and *PIK3CA* mutations and *BRCA1* promoter hypermethylation in «triple-negative» breast cancer****Abstract**

Introduction: Breast cancer is a clinically, morphologically and biologically heterogeneous disease. It is classified in distinct subtypes. Triple-negative breast cancers represent approximately 10-20% of all breast cancers and often express basal markers. This type preferentially affects young women and has no specific therapy.

Material and method: We conducted a retrospective study of three molecular alterations (the *EGFR* and *PIK3CA* mutations and *BRCA1* promoter hypermethylation) by pyrosequencing in a series of 60 patients with a diagnosis of triple-negative breast cancer.

Results: A total of 28.33% of patients were diagnosed at age 50 years or younger. Only 16.67% of patients had clinical progression due to haematological dissemination with visceral metastasis and all of them, except one, died from breast cancer between 1 and 5 years after diagnosis. The *BRCA1* mutation was studied in 16 patients and a known pathogenic mutation was found in 5. Immunohistochemical study showed a high Ki67 proliferative index and 73.33% of carcinomas were basal-like due to CK5/6 and/or *EGFR* expression. Although we found no *EGFR*-activating mutations, *EGFR* overexpression was present in 53.33% of patients. The *PIK3CA* mutation was identified in 10% of patients, predominantly in exon 20 and with androgen receptor expression in half of these patients. *BRCA1* promoter hypermethylation was observed in 25% of the patients. Only one of these patients exhibited *BRCA1* hypermethylation of non-tumoural stroma and two showed a pathogenic mutation of the *BRCA1* gene.

Conclusion: The finding of specific molecular alterations, although infrequent, could suggest a possible directed therapeutic target.

© 2017 SESPM. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en el sexo femenino. En 2012 en España representó el 28,99% de todos los cánceres diagnosticados, y la primera causa de muerte en mujeres adultas¹.

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea tanto a nivel histológico, molecular/genético, como clínico, con respuesta variable a los diferentes tratamientos. Si bien los patólogos han intentado desarrollar sistemas de clasificación relacionados con el pronóstico, y mayoritariamente basados en el exhaustivo estudio histológico del tumor, siguen existiendo limitaciones debido a la situación clínica y al comportamiento intrínseco de cada tumor.

Aunque los estudios moleculares han permitido ampliar el conocimiento de las lesiones precursoras y han facilitado pruebas para dividir los tumores en diferentes grupos según su pronóstico, en la práctica clínica diaria los valores pronósticos y predictivos utilizados siguen siendo el estudio anatomopatológico y los resultados inmunohistoquímicos, que permiten la aproximación a la subdivisión intrínseca genética de los tumores, definida en el Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen^{2,3}.

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa el 10-20% de los cánceres de mama, y se define por la ausencia de expresión de receptores hormonales de estrógenos y progesterona, así como por la ausencia de sobreexpresión de Her2. A menudo, muestran expresión intrínseca y/o inmunohistoquímica de marcadores basales, así como un alto grado

histológico. Además, la mayoría son carcinomas ductales infiltrantes de tipo no específico con cierto predominio de tipos especiales y tienen mal pronóstico.

Su gran heterogeneidad intrínseca ha sugerido diferentes intentos de subclasificación para discriminar su comportamiento clínico. Uno de los primeros intentos fue descrito por Perou en 2000⁴, quien señaló que, aunque un 70-80% de los TNBC eran «basal-like», había un 20-30% de TNBC que eran de tipo no basal (Luminal y Her2). Cabe destacar la subclasificación descrita por Lehmann en 2011⁵ quien los dividía en 6 subtipos (basal-like 1, basal-like 2, inmunomoduladores, mesenquimales, mesenquimales «stem-like» y luminal receptores de andrógenos).

Como las subclasificaciones del TNBC no llegan a ningún consenso, hemos estudiado posibles biomarcadores, que, aunque no sean exclusivos, su presencia no es despreciable y pueden sugerir posibles dianas terapéuticas (*EGFR*, *PIK3CA* y metilación del promotor del *BRCA1*).

Material y métodos

Se trata de un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo, que incluye 60 casos (bloques de parafina) de TNBC, diagnosticados entre 2006 y 2011 en el servicio de Anatomía Patológica de un Hospital Universitario. El estudio consta de cuatro partes: 1) recopilación de datos clínicos; 2) revisión de las características histológicas; 3) revisión y realización de estudios inmunohistoquímicos, y 4) realización de pruebas moleculares.

Tabla 1 Descripción de las características de los anticuerpos utilizados para el estudio inmunohistoquímico

Anticuerpo	Casa comercial	Clona	Código	Tiempo incubación AC primario
RE	DAKO	SP1	IR084	15 min
RPG	DAKO	PRED	IR068	20 min
Her2	DAKO	SK001	Kit Herceptest	30 min
Ki67	Menarini NCL-Ki67-hM1	MM1	35178	25 min
CK5/6	DAKO	D5/16B4	IR780	20 min
EGFR	LEICA	EGFR.25	RTU-EGFR-384	15 min
RA	DAKO	AR441	M3562	20 min

Los estudios inmunohistoquímicos de receptores de estrógenos, receptores de progesterona, Her2, índice proliferativo de Ki67, citoqueratina 5/6, EGFR y receptores de andrógenos se determinaron mediante el equipo Autostainer de DAKO (Dakocytomation Autostainer Labelling) (tabla 1).

La valoración de los resultados inmunohistoquímicos utilizada ha sido para cada anticuerpo y con relación al porcentaje de células neoplásicas que los expresan de:

- Receptores hormonales de estrógenos y progesterona negativos: expresión nuclear menor o igual al 1% de las células neoplásicas.
- Her2/neu negativo (score 0 y 1+): ausencia o tinción de membrana débil e incompleta en menos de un 10% de las células neoplásicas.
- Índice proliferativo de Ki67 alto: mayor o igual al 14% de las células neoplásicas.
- CK5/6 positiva: positividad citoplasmática en >5% de las células neoplásicas.
- EGFR positivo: positividad citoplasmática >1% de las células neoplásicas.
- Receptores de andrógenos positivos: positividad nuclear >30% de células neoplásicas.

Los estudios moleculares realizados son las mutaciones de las regiones «hotspot» del gen *EGFR* (mutaciones puntuales en exones 18, 20 y 21; y deleciones y deleciones-inserciones en exón 19), las mutaciones de las regiones «hotspot» del gen *PIK3CA* (exones 9 y 20) y la hipermetilación de la región promotora del gen *BRCA1*, mediante la técnica de pirosecuenciación. Esta consiste en un estudio cuantitativo de secuenciación de ADN a tiempo real, basada en la síntesis de la cadena de ADN acoplada a una reacción quimioluminiscente, indicando el resultado en porcentaje de mutación presente en las muestras. Las ventajas de esta técnica son la mejora de la sensibilidad versus la secuenciación de Sanger y la posibilidad del análisis de múltiples variantes, no solo de mutaciones puntuales como con el estudio de PCR específica de alelos.

Para realizar estos estudios moleculares se ha extraído el ADN de las muestras que estaban fijadas en formol e incluidas en parafina, utilizando el «kit» QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, una PCR y la técnica de pirosecuenciación Therascreen KRAS/EGFR/BRAF Pyro Kit adaptada al laboratorio, junto con la máquina PyroMark Q24 y los Pyromark PCR kits.

Resultados

En nuestra cohorte de pacientes con TNBC el 28,33% tenían una edad menor o igual a 50 años en el momento del diagnóstico, y de estas solo el 10% eran menores de 40 años. Casi la mitad de las pacientes fueron intervenidas mediante cirugía y ganglio centinela, siendo el 75% de todos los estudios axilares negativos. La mayoría eran carcinomas ductales infiltrantes de tipo no específico, seguidos de carcinomas medulares en el 20% (fig. 1), y la mayoría con alto grado

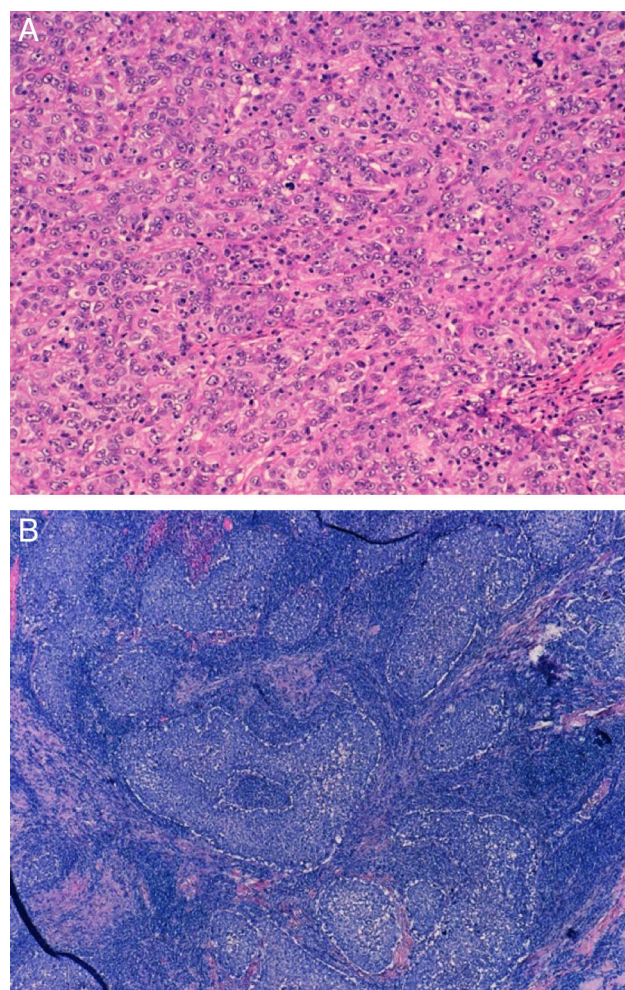


Figura 1 A) Carcinoma ductal infiltrante NOS (hematoxilina eosina, 20×). B) Carcinoma con rasgos medulares (hematoxilina eosina, 4×).

Tabla 2 Resultados histológicos desglosados de todos los casos de la serie (N = 60)

Edad diagnóstico	Mama	Tipo tumoral	Grado histológico	Tamaño	Necrosis	Angiolinfática	Perineural
59	ME	Ca. adenoide quístico	II	20	NO	NEG	NEG
24	ME	CDI	II	33	EXT	NEG	NEG
43	MD	CDI	III	40	MIN	NEG	NEG
67	MD	CDI	III	15	NO	NEG	NEG
61	MD	CDI con rasgos medulares	III	30	NO	NEG	NEG
40	MD	Ca. medular atípico	III	17	MIN	NEG	NEG
65	MD	CD IN SITU papilar	nuclear 2	10	NO	NEG	NEG
80	ME	CDI + CID	III	6	NO	NEG	NEG
39	MD	CDI	III	15	NO	NEG	NEG
39	MD	Ca. medular atípico	III	23	EXT	NEG	NEG
76	ME	CDI	III	45	NO	POS	NEG
93	ME	CDI	III	60	NO	POS	POS
83	ME	Ca. metaplásico + CID	III	35	NO	NEG	NEG
61	ME	CDI + CID	III	23	EXT	NEG	NEG
60	ME	Ca. medular atípico	III	17	MOD	NEG	NEG
64	MD	CDI	III	12	NO	NEG	NEG
53	MD	CDI	III	22	EXT	POS	NEG
52	ME	CDI + CID	III	14	NO	NEG	NEG
51	MD	CDI	III	8	NO	NEG	NEG
68	MD	CDI	III	POST-QT	EXT	NEG	NEG
79	MD	CDI	III	50	EXT	NEG	NEG
56	ME	CDI	III	10	NO	NEG	NEG
60	ME	CDI	II	8	NO	NEG	NEG
82	MD	CDI con rasgos medulares	III	30	MOD	NEG	NEG
38	ME	CDI	III	25	MOD	NEG	NEG
50	ME	Ca. anaplásico	III	15	NO	NEG	NEG
57	ME	Ca. medular	III	22	MIN	NEG	NEG
42	ME	CDI medular	III	16	EXT	NEG	POS
62	MD	CDI	III	30	NO	NEG	NEG
38	ME	Ca. medular atípico	III	20	MOD	NEG	NEG
50	ME	CDI	III	18	NO	NEG	NEG
81	ME	CDI	III	13	NO	NEG	NEG
71	MD	CDI	III	BAG	NO	BAG	BAG
44	ME	Ca. metaplásico	III	28	MOD	NEG	NEG
71	MD	CDI	III	22	EXT	POS	NEG
53	MD	CDI	III	23	MIN	NEG	NEG
61	MD	CDI	III	24	NO	NEG	NEG
55	MD	CDI	III	12	NO	NEG	NEG
68	MD	CDI	III	8	NO	NEG	NEG
59	MD	CDI	III	POST-QT	NO	NEG	NEG
77	ME	CDI	III	25	NO	POS	NEG
72	ME	CDI micropapilar	II	30	NO	NEG	NEG
64	ME	Ca. lobelar infiltrante	II	3	MOD	NEG	NEG
51	ME	CDI + CID	III	22	NO	POS	NEG
44	ME	CDI + CID	II	11	NO	NEG	NEG
40	MD	CDI + CID	III	50	NO	POS	NEG
53	ME	CDI	III	18	MIN	NEG	NEG
40	MD	Ca. medular atípico + CID	III	31	MOD	NEG	NEG
83	ME	Ca. medular	III	45	MOD	NEG	NEG
65	MD	CDI + CID	III	15	NO	NEG	POS
70	ME	Ca. medular + CID	III	19	EXT	NEG	NEG
66	ME	CDI + CID	I	POST-QT	NO	POS	NEG
27	MD	Ca. medular	III	16	MOD	NEG	NEG
51	MD	CDI + CID	II	18	NO	NEG	NEG

Tabla 2 (continuación)

Edad diagnóstico	Mama	Tipo tumoral	Grado histológico	Tamaño	Necrosis	Angiolinfática	Perineural
90	ME	CDI + CID	III	28	MOD	NEG	NEG
77	MD	CDI + CID	III	10	MIN	NEG	NEG
40	ME	CDI + CID	III	POST-QT	EXT	NEG	NEG
69	MD	CDI + CID	III	13	NO	NEG	NEG
46	ME	CDI	III	POST-QT	MOD	NEG	NEG
72	ME	CDI + CID	III	62	EXT	NEG	NEG

Ca.: carcinoma; CDI: carcinoma ductal infiltrante; CID: carcinoma intraductal; EXT: extensa; MD: mama derecha; MI: mama izquierda; MIN: mínima; MOD: moderada; NEG: negativo; POS: positivo; POST-QT: posquimioterapia.

histológico (85%). Aproximadamente la mitad de los casos mostraron algún grado de necrosis.

La medida tumoral media fue de 22,68 mm, oscilando entre 3 y 62 mm; de estos, un 51,85% eran menores o iguales a 20 mm y un 48,15% eran mayores de 20 mm (tabla 2).

Solamente el 16,67% de los casos progresaron y todos, menos uno, murieron en un intervalo de entre 1-5 años desde el momento del diagnóstico, siendo la forma de diseminación más frecuente la vía hematológica con metástasis viscerales, principalmente en pulmón y cerebro (15,79%).

Se conoce la realización del estudio genético de mutaciones del gen *BRCA* en 16 de las 60 pacientes de la cohorte, entre las cuales en solo 5 casos se encontró una mutación patogénica de gen *BRCA*.

A nivel inmunohistoquímico, el 83% eran tumores con alto índice proliferativo de Ki67. Un 73,33% eran de tipo basal-like por la expresión de CK5/6 (55%) y/o EGFR (53,33%) (fig. 2), y coexpresión de los dos en un 35%. Solo el 11,67% mostró expresión de receptores de andrógenos.

A nivel molecular, no se han observado mutaciones activadoras de *EGFR* en las regiones «hotspot» estudiadas de los exones 18, 19, 20 y 21, a pesar de que el 53,33% de los casos muestran sobreexpresión inmunohistoquímica de EGFR.

En un 10% (6/60) de los casos se ha observado mutación de *PIK3CA* en alguna de las tres regiones «hotspot» estudiadas, con predominio (66,67%) en el dominio cinasa del exón 20 (H1047) versus el dominio hélix del exón 9 (E545 y E542). A la vez, tres de estos casos mostraron coexpresión de receptores de andrógenos, entre los 7 casos de la cohorte que los expresaban.

Se encontró hipermetilación del promotor del gen *BRCA1* en un 21,67% (13/60) de los casos, con un grado medio de hipermetilación del 38,67%, oscilando entre el 58,11 y el 20,67%. Solo en uno de los 11 casos estudiados coexistía con la presencia de hipermetilación del estroma no tumoral. La coexistencia de hipermetilación del tumor y mutación en línea germinal de *BRCA1* se encontró en dos casos, siendo estas mutaciones de tipo «nonsense» y de VSI (variante de significado incierto).

El 90% de los casos con mala evolución clínica mostraban positividad para uno o los dos marcadores inmunohistoquímicos basales, y solo en dos de estos casos se estudió la posible presencia de mutación germinal del gen *BRCA*, encontrándose mutación en uno de ellos.

En nuestra serie de TNBC, la mayoría de tumores mostraron un nivel elevado de índice proliferativo de Ki67 ($p=0,6$), receptores de andrógenos negativos ($p=0,6$), pocas metilaciones de *BRCA* ($p=0,3$) y pocas mutaciones en *PIK3CA*

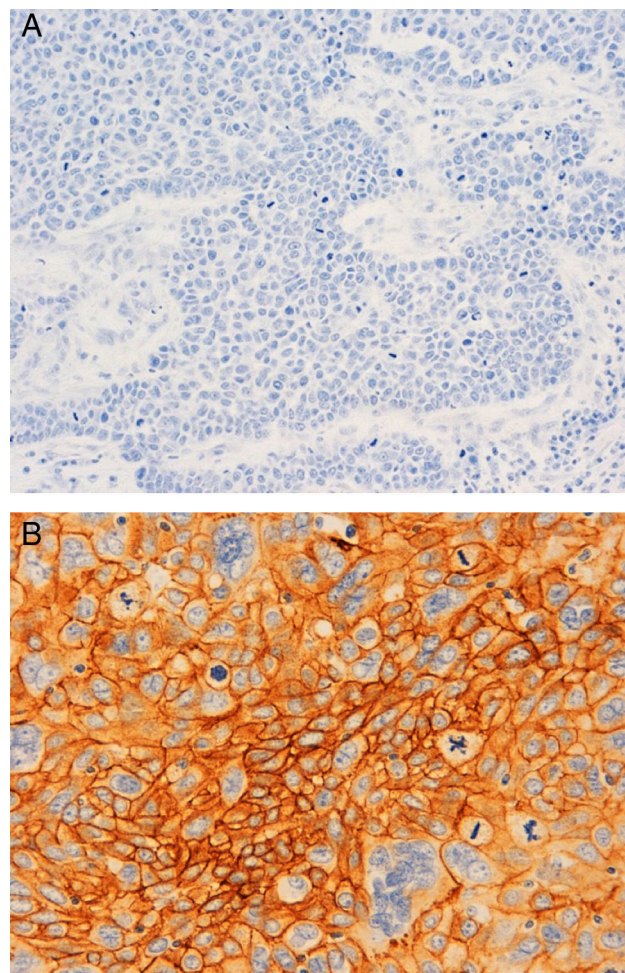


Figura 2 A) EGFR negativo (inmunohistoquímica, 20×). B) EGFR positivo (inmunohistoquímica, 40×).

($p=0,9$). No obstante, ninguno de estos factores, así como tampoco la positividad para CK5/6 ($p=0,4$) ni EGFR ($p=0,1$), mostró relación estadísticamente significativa con la supervivencia.

Entre los pocos casos con estudio y presencia de mutación patogénica conocida del gen *BRCA*, el 80% expresaban uno o los dos marcadores inmunohistoquímicos basales estudiados. Cabe destacar que el único caso que no mostró su expresión era un caso con mutación patogénica del gen *BRCA2*.

Discusión

El TNBC afecta frecuentemente a mujeres jóvenes (51,8% en menores de 50 años)⁶, siendo este valor en nuestra cohorte menor del esperado (28,33%). Cuando el tratamiento elegido del cáncer de mama es quirúrgico, normalmente es conservador⁶, con estudio ganglionar con resultado predominantemente negativo⁷, siendo estos hallazgos reproducibles en nuestra cohorte.

El TNBC es un tumor de alto grado (con gran tamaño tumoral, mayor indiferenciación, alto índice proliferativo y frecuente necrosis), con predominio del carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico, seguido de tipos especiales, como medular y metaplásico⁸⁻¹⁰, e infrecuentes imágenes de invasión angiolímfática y perineural. Todas estas características histológicas son reproducibles en nuestra cohorte. No obstante, existen discrepancias en la medida tumoral predominante^{8,11,12} y la necrosis, la cual es frecuente en aproximadamente la mitad de los casos^{6,7,12}.

El TNBC tiene un mal pronóstico con un corto tiempo entre la recaída, metástasis viscerales y muerte, sobre todo en los primeros años de diagnóstico¹³. Estas características están presentes en nuestros casos de la cohorte con progresión tumoral; 9/10 casos con progresión han muerto en los primeros 5 años tras el diagnóstico con metástasis a distancia, sobretodo viscerales en pulmón y cerebro.

Aunque, actualmente, el único tratamiento para el TNBC es la quimioterapia sistémica, se ha observado una peor supervivencia en aquellos casos que después de neoadyuvancia queda enfermedad residual versus aquellos casos con respuesta patológica completa¹⁴. En nuestra serie, solo 5 casos han recibido quimioterapia previa con respuesta parcial (probablemente la baja tasa de incidencia de neoadyuvancia está influida por ser un estudio retrospectivo).

En relación con los estudios inmunohistoquímicos, el alto valor del índice proliferativo de Ki67 es muy útil como factor de mal pronóstico y en la toma de decisiones terapéuticas. Sin embargo, el hecho de que este índice esté sujeto a gran variabilidad intra e interobservador (es patólogo-dependiente) en los valores intermedios ha hecho que en los últimos consensos de cáncer de mama se recomiende ajustar su valor a cada laboratorio o incluso se desaconseja su uso como biomarcador¹⁵. En nuestra serie, se ha encontrado un alto índice proliferativo de Ki67 (mayor del 14% de las células neoplásicas) en la gran mayoría de los casos.

Existe un gran solapamiento entre los TNBC y basal-like desde el punto de vista clínico, morfológico e inmunohistoquímico. No obstante, su diferenciación es importante ya que en aquellos tumores triple negativos que expresan marcadores basales tienen una supervivencia libre de enfermedad sensiblemente más corta¹⁶. De ahí la pregunta de cuáles deben ser los marcadores inmunohistoquímicos (citoqueratinas basales, EGFR, vimentina o marcadores mioepiteliales, como actina de músculo liso y CD10, entre otros) utilizados para diferenciarlos.

Dada la gran diversidad en sus resultados, el poco conocimiento de su significado y la ausencia de acuerdo en su utilización y lindares de valoración cualitativos y cuantitativos, el término patológico definido inmunohistoquímicamente «fenotipo basal-like» no impacta en la decisión clínica terapéutica. En nuestra cohorte, casi tres

cuartas partes de los casos muestran expresión de alguno de los dos marcadores inmunohistoquímicos basales utilizados, siendo estos valores aproximados a los descritos en varias series^{17,18}. Ocho de las 9 pacientes muertas por cáncer de mama tenían expresión de alguno o de los dos marcadores basales, reflejando así el factor de mal pronóstico que tienen estos marcadores.

Se describe la expresión de receptores de andrógenos en un tercio de los TNBC, asociándose a una mejor supervivencia libre de enfermedad en estadios precoces, a pacientes con mutaciones *BRCA1/2* y a mayor edad de diagnóstico^{8,19}. En nuestra cohorte, la expresión de receptores de andrógenos es menor que la descrita en la literatura, siendo la edad media de diagnóstico de estas pacientes de 67 años y solamente en una de ellas se ha estudiado la posible presencia de mutación del gen *BRCA1* siendo su resultado no informativo (ausencia de mutación patogénica conocida).

Una minoría de cánceres de mama se consideran hereditarios (5-10%) y de estos aproximadamente una cuarta parte son debidos a genes susceptibles de cáncer como son *BRCA1/2*, siendo estos pacientes posibles candidatos a beneficiarse de tratamientos con inhibidores de PARP y/o quimioterapias con platinos²⁰. Tanto los cánceres triple negativos como con mutación en línea germinal *BRCA1* son frecuentemente de tipo basal y se asocian a mal pronóstico (más del 15% de TNBC tienen mutación germinal del gen *BRCA1*)²¹. En nuestra cohorte, se observa expresión de marcadores basales en el 80% (4/5) de los casos de TNBC con mutación conocida en línea germinal del gen *BRCA1*.

La proteína EGFR se expresa entre un 30-52% de los TNBC, y puede ascender hasta un 60% en el tipo basal-like, asociándose a mal pronóstico^{22,23}. No obstante, la respuesta a terapias anti-EGFR (como los inhibidores de la tirosinacinas) no depende de la expresión inmunohistoquímica sino de la presencia de mutación activadora y/o de la amplificación del gen. A pesar de que en nuestra cohorte el 53,33% de casos muestran expresión inmunohistoquímica de EGFR, en ningún caso se ha detectado mutación activadora de EGFR en los exones estudiados, siendo estos hallazgos equiparables a otros grupos europeos, caucásicos y japoneses publicados^{17,23-27}, pero no con los resultados de un grupo de Singapur, que encuentra hasta un 11,4% de mutaciones potencialmente patogénicas²⁵, planteando así si esta discrepancia en diferentes grupos podría ser debida a la influencia de factores genéticos y ambientales (sobre todo geográficos y étnicos), tal y como pasa en el cáncer de pulmón no célula pequeña.

La vía de señalización de PiK3/AKT es la vía más frecuentemente alterada en el cáncer de mama. Aunque la mutación de *PIK3CA* es más prevalente en el cáncer de mama receptores hormonales positivos (35%) y Her2 positivo (23%), en el triple negativo oscila entre un 5-13%¹⁹; siendo la segunda mutación más frecuentemente descrita en el TNBC, después de p53 (68%)²⁸. El 80% de las mutaciones somáticas del gen *PIK3CA* suceden en tres «hotspot», dos situados en los codones 542 y 545 del dominio hélice del exón 9 y uno en el codón 1047 del dominio cinasa del exón 20²⁹, con predominio en H1047R, siendo alrededor del 70, 90 y 40% en diferentes series^{17,19,28}. Algunos autores comentan la posible relación con mejor pronóstico y supervivencia, otros no ven efectos significativos y otros indican que las mutaciones

en exón 9 son independientes del pronóstico y que las del exón 20 tienen mejor pronóstico^{30,31}. Aunque los resultados en nuestra cohorte de 10% de mutaciones en *PIK3CA*, con predominio en exón 20, son similares a los descritos en la literatura, su relación con el pronóstico es dudosa, pues el 50% han tenido un buen pronóstico y el otro 50% con mal pronóstico muestran variabilidad en la localización de la mutación, probablemente influido por el pequeño número de casos.

La coexistencia de expresión de receptores de andrógenos y mutación de *PIK3CA* observada en el 42,86% de la cohorte es similar a la descrita en la literatura, donde el TNBC con receptores de andrógenos positivos muestra mutación de *PIK3CA* hasta en un 40% versus el 4% de receptores de andrógenos negativos³².

Se observa mayor incidencia de metilación de *BRCA1*: en cánceres de alto grado histológico y con fenotipo triple negativo; se correlacionan con expresión de citoqueratinas basales; y juegan un papel significativo en la patogénesis del cáncer de mama basal-like esporádico. Además, la similitud genética con el cáncer de mama portador de mutaciones germinales *BRCA1* plantea si la terapéutica utilizada en estos casos podría ser útil en el cáncer esporádico metilado, introduciendo así el concepto de «BRCAness». La presencia de metilación en el promotor del gen *BRCA1* se ha descrito en entre el 11-32% de cánceres de mama esporádicos³³, alrededor del 30-35% si son triples negativos³⁴ y puede aumentar hasta un 60% en TNBC de tipo medular y metaplásico con fenotipo «basal-like»^{13,35}.

En nuestra cohorte la presencia de hipermetilación del promotor del gen *BRCA1* (21,67%) es menor que la descrita en la literatura, siendo el 23,1% de los casos metilados de tipo medular; estos resultados probablemente están influidos por la metodología utilizada. Solo en uno de los casos estudiados hemos encontrado metilación del estroma mamario no neoplásico, siendo su grado similar al del tumor. En la literatura se describe la presencia de hipermetilación en entre el 8,3-22% de los parénquimas mamaros normales de pacientes con cáncer de mama metilado^{36,37}.

La coexistencia de hipermetilación del promotor del gen *BRCA1* con mutación del *BRCA1* se ha descrito en ocasionales casos, normalmente en relación con mutaciones de variante de significado incierto o *BRCA1x*. No se sabe si la metilación del promotor, que es muy heterogénea en las células tumorales, influye de la misma manera que la mutación patogénica en línea germinal²¹.

Conclusiones

En conclusión, en nuestra cohorte de TNBC se ha podido determinar: (1) la ausencia de mutaciones en *EGFR*, independientemente de la sobreexpresión inmunohistoquímica presente; (2) la mutación de *PIK3CA* en un 10% de casos, con coexpresión de receptores de andrógenos en la mitad de los casos, permitiendo plantear una posible terapia dirigida, y (3) la hipermetilación de la región promotora del gen *BRCA1* en un 25% de los casos, sugiriendo la posibilidad de establecer una correlación con la terapéutica utilizada en los cánceres «BRCAness».

La información aportada por estas técnicas moleculares, así como por las recientes incorporaciones de plataformas

genómicas para el estudio del cáncer, permiten ampliar el conocimiento de posibles dianas terapéuticas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. SEOM -Sociedad Española de Oncología Médica. (2016) Las cifras del cáncer en España 2016. [Internet], enero 2016 [consultado 27 Feb 2016]. Disponible en: <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105460-el-cancer-en-espana-2016#content>
2. Glodhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22:1736-47.
3. Glodhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebbart M, Thürlimann B, 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;24:2206-23.
4. Perou CM, Sortie T, Eisen MB, Rijn MV, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2000;406:747-52.
5. 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 Inv.* 2011;121:2750-67.
6. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Montagna E, Luini A, et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: Prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116:317-28.
7. El Sawaf Z, Sinn HP, Rom J, Bermejo JL, Schneeweiss A, Aulmann S, et al. Biological subtypes of triple negative breast cancer are associated with distinct morphological change and clinical behaviour. *Breast.* 2013;22:986-92.
8. Riccardi GR, Adamo B, Leni A, Licata L, Cardia R, Ferraro G, et al. Androgen receptor (AR) E-cadherin, and Ki67 as emerging targets and novel prognostic markers in triple negative breast cancer (TNBC) patients. *PLoS One.* 2015;10:e01238368.
9. Zhang J, Wang Y, Yin Q, Zhang W, Zhang T, Niu Y, et al. An associated classification of triple negative breast cancer: The risk of relapse and the response to chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6:1380-91.
10. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone

- receptor (PR)-negative, and Her2-negative invasive breast cancer, the so-called Triple-Negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer*. 2007;109:1721–8.
11. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: Clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the south of Switzerland. *Ann Oncol*. 2009;20:628–35.
 12. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan HP. Triple-negative breast cancer: Clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2010;23:123–33.
 13. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: A critical review. *Histopathology*. 2008;52:108–18.
 14. Schneider BP, Winer E, Foulkes WD, Garber J, Perou CM, Richardson A, et al. Triple-negative breast cancer: Risk factors of potential targets. *Clin Cancer Res*. 2008;14:8010–8.
 15. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. 2015;26:1533–46.
 16. GEICAM. Boletín del Grupo Español de Investigación del Cáncer de Mama. 2010, 27. San Sebastián de los Reyes: Fundación GEICAM.
 17. Tilch E, Seidens T, Cocciardi S, Reid LE, Byrne D, Simpson PT, et al. Mutations in *EGFR* *BRAF* and *RAS* are rare in triple-negative and basal-like breast cancers from Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;143:385–92.
 18. Sood N, Nigam JS. Correlation of *CK5* and *EGFR* with clinicopathological profile of triple-negative breast cancer. *Pathol Res International*. 2014;2014:141864.
 19. Cossu-Rocca P, Orrù S, Muroi MR, Sanges F, Sotgiu G, Ena S, et al. Analysis of *PIK3CA* mutations and activation pathways in triple negative breast cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0141763.
 20. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galvan P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implication of the intrinsic molecular subtypes of breast. *Breast*. 2015;24 Suppl. 2:S26–35.
 21. Flower KJ, Shenker NS, El-Bahrawy M, Goldgar DE, Parsons MT, Investigators KCF, et al. DNA methylation profiling to assess pathogenicity of *BRCA1* unclassified variants in breast cancer. *Epigenetics*. 2015;10:1121–32.
 22. Siziopikou KP, Cobleigh M. The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from *EGFR*-targeted therapies. *Breast*. 2007;16:104–7.
 23. Martin V, Botta F, Zanellato E, Molinari F, Crippa S, Mazzucchelli L, et al. Molecular characterization of *EGFR* and *EGFR*-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features. *Histol Histopathol*. 2012;27:785–92.
 24. Jacot W, Lopez-Crapez E, Thezenas S, Senal R, Fina F, Bibeau F, et al. Lack of *EGFR*-activating mutations in European patients with triple-negative breast cancer could emphasise geographic and ethnic variations in breast cancer mutation profiles. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R133.
 25. Teng YH, Tan WJ, Thike AA, Cheuk PY, Tse GMK, Wong NS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene in triple negative breast cancer: Possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R35.
 26. Grob TJ, Heilenkötter U, Geist S, Paluchowski P, Wilke C, Jaenicke F, et al. Rare oncogenic mutations of predictive markers for targeted therapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134:561–7.
 27. Toyama T, Yamashita H, Kondo N, Okuda K, Takahashi S, Sasaki H, et al. Frequently increased epidermal growth factor receptor (*EGFR*) copy numbers and decreased *BRCA1* mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer*. 2008;8:309.
 28. Lehmann BD, Pietsenpol JA, Tan AR. Triple-negative breast cancer: Molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Edu Book*. 2015:e31–9, http://dx.doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e31.
 29. Baker CK, Vaughn CP, Samowitz A. *PIK3CA* pyrosequencing based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn*. 2012;14:56–60.
 30. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. *PIK3CA* mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α PR and ERBB2-based subgroup. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R28.
 31. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, del Grammasiro M, et al. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the *PIK3CA* gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6064–9.
 32. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KL, et al. *PIK3CA* mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2014;16:406.
 33. Bal A, Verma S, Joshi K, Singla A, Thakur R, Arora S, et al. *BRCA1*-methylation sporadic breast cancer are *BRCA*-like in showing a basal phenotype and absence of ER expression. *Virchow Arch*. 2012;461:305–12.
 34. Sharma P, Stecklein SR, Kimler BF, Sethi G, Petroff BK, Phillips TA, et al. The prognostic value of *BRCA1* promoter methylation in early triple negative breast cancer. *J Cancer Ther Res*. 2014;3:1–11.
 35. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancer a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011;24:157–67.
 36. Otani Y, Miyake T, Kagara N, Shimoda M, Naoi Y, Maruyama N, et al. *BRCA1* promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor of *BRCA1*-methylated breast cancer. *Cancer Sci*. 2014;105:1369–76.
 37. Cai F, Chen S, Wang MH, Lin XY, Zhang L, Zhang JX, et al. Pyrosequencing quantified methylation level of *BRCA1* promoter as prognostic factor for survival in breast cancer patient. *Oncotarget*. 2016;7:27499–510, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8355>.