

El fenotipo tumoral "basal like" (c-erb-B2 -, RE - y RP - negativo) define un subgrupo biológicamente muy agresivo de cáncer de mama en estadio postquirúrgico pT1

The "basal-like" (c-erb-B2 -, ER - and PR - negative) tumor phenotype defines a biologically highly aggressive subgroup of surgical pT1 stage breast cancers

"Basal like" fenotipo tumoralak (c-erb-B2 -, RE - eta RP - negatiboa) biologikoki oso erasokorra den bularreko minbiziaren azpitalde bat definitzen du, kirurgia ondoko pT1 egoeran

José Schneider (1-2), Armando Tejerina (1), Clemente Perea (1-3), Antonio Tejerina (1), Raúl Lucas (1), Jaime Sánchez (1-4)

(1) Fundación Tejerina-Centro de Patología de la Mama, Madrid. España. UE

(2) Universidad Rey Juan Carlos, Facultad de Ciencias de la Salud, Madrid. España. UE

(3) Hospital Santa Cristina, Madrid. España. UE

(4) Universidad de Alcalá, Madrid. España. UE

Resumen

Estudios recientes utilizando la técnica de "microarrays" han identificado un subgrupo de cánceres de mama con pésimo pronóstico. Se trata de tumores que no expresan receptores hormonales ni el oncogén c-erb-B2, y sí a cambio citoqueratinas propias de las células del estrato basal epitelial. Dicho fenotipo tumoral, en consecuencia, se denomina "basal".

En el presente trabajo hemos realizado una aproximación al fenotipo basal en una serie de cánceres de mama precoces, en estadio postquirúrgico pT1, utilizando para su clasificación la ausencia de receptores hormonales y del oncogén c-erb-B2, que son determinaciones que se realizan habitualmente de rutina como parte del estudio anatomopatológico.

Se han estudiado un total de 442 cánceres de mama unifocales de 2 cm o menos en la pieza histológica (pT1) operados entre enero de 1993 y diciembre de 2005. De ellos, 369 fueron carcinomas ductales infiltrantes NOS, y estos últimos han sido los únicos incluidos en el estudio. De los 369 casos, disponemos de datos inmunohistoquímicos completos (RE, RP, c-erb-B2, p53 y Ki67) correspondientes a 346, que son los que han entrado en el análisis final.

La aproximación al fenotipo "basal" definida según nuestros parámetros se correlacionó de manera altamente significativa con la expresión de p53 mutado ($p = 0.0001$), grado nuclear 3 ($p < 0.0001$) y un porcentaje de expresión de Ki67 igual o superior al 60% ($p < 0.0001$), y de manera apenas significativa con un grado histológico 3 ($p = 0.045$). No existió ningún grado de correlación con la invasión ganglionar ($p = 0.51$).

A falta de la determinación de citoqueratinas basales, la utilización de parámetros habitualmente presentes de forma rutinaria en los informes anatomopatológicos nos permite identificar un subgrupo de tumores "basal-like" ya en estadios muy precoces de la enfermedad, que se caracterizan por una elevada agresividad biológica.

Palabras clave: cáncer, mama, fenotipo basal

Correspondencia:

Jose Schneider

Fundación Tejerina

C/ José Abascal, 40

28003 Madrid. España UE.

Correo electrónico: jose.schneider@urjc.es

Enviado: 07/02/07 Aceptado: 07/09/07

Summary

Recent studies using microarray technology have identified a subgroup of breast cancers with an ominous prognosis. These tumors do neither express hormone receptors nor the c-erb-B2 oncogene, but do express cytokeratins which are characteristic of the basal epithelial layer. This tumor phenotype is designated, accordingly, as "basal".

In the present study we have approached the basal tumor phenotype in a series of early breast cancers in surgical pT1 stage, using for their classification the absence of hormone receptor and c-erb-B2 expression, which are routinely determined as part of the pathological workup.

We studied a total of 442 unifocal breast cancers with a histologically proven size of 2 cm or less (pT1), operated upon between January 1993 and December 2005. Of them, 369 were NOS ductal infiltrating carcinomas, which were the only ones included into the study. Of these 369 cases, complete immunohistochemical data (ER, PR, c-erb-B2, p53 and Ki67) were available for 346, which entered the final analysis.

The approach to the "basal" phenotype defined according to our parameters correlated in a highly significant way with mutant p53 expression ($p = 0.0001$), nuclear grade 3 ($p < 0.0001$), a Ki67 labelling index of 60% or higher ($p < 0.0001$), and in a barely significant way with histologic grade 3 ($p = 0.045$). There existed no significant correlation whatsoever with nodal invasion ($p = 0.51$).

In the absence of basal cytokeratin determination, the use of parameters usually present in the pathological reports allows us to identify a subgroup of "basal-like" tumors already in early stages of the disease, which are characterized by a high biological aggressiveness.

Key words: cancer, breast, basal phenotype

Laburpena

"Basal like" fenotipo tumoralak (c-erb-B2 -, RE - eta RP - negatiboa) biologikoki oso erasokorra den bularreko minbiziaren azpitalde bat definitzen du, kirurgia ondoko pT1 egoeran.

Ikerketa berriek, "micorarrays" teknika erabiliz, pronostiko txarra duen bularreko minbiziaren azpitalde bat hauteman dute. Tumore horiek ez dituzte hormona hartzaileak eta c-erb-B2 onkogenea adierazten; eta bai, ordea, epitelio basaleko geruzaren zelulei dagozkien kitokeratinak. Horren ondorioz, tumore fenotipo horri "basala" esaten zaio.

Lan honetan fenotipo basala aztertzen dugu, kirurgia ondoreko pT1 egoeran dauden bularreko minbizi goiztiarretan. Haien sailkapena egiteko hormona hartzaileen eta c-erb-B2 onkogenearen gabezia baliatu gara, ikerketa anatomopatologikoetan erabili ohi diren zehaztapenak direlako.

Guztira, foku bakarreko 442 bularreko minbizi aztertu dira, pieza histologikoan (pT1) 2 cm edo gutxiago dituztenak. Guztiak 1993ko urtarrilaren eta 2005eko abenduaren artean operatu ziren. Horien artetik, 369 NOS kartzinoma duktal iragazkorak izan ziren, eta horietatik baino ez dira aztertu. 369 horien artetik, berriz, 346 kasuei dagozkien datu immunohistokimiko osoak ditugu (RE, RP, c-erb-B2, p53 eta Ki67) eta horiek dira, hain zuzen ere, amaierako azterketan sartu ditugunak.

Gure parametroen arabera definitutako fenotipo "basala" korrelazioan jarri zen nabarmenki p53 mutatuaren agerpenarekin ($p = 0.0001$) 3. gradu nuklearra ($p < 0.0001$), eta %60 edo hortik gorako Ki67 agerpen ehunekoarekin; bestalde, korrelazioa oso txikia izan zen 3. gradu histologikoarekin ($p = 0.045$). Ganglioien inbasioarekin ($p = 0.51$) ez zen korrelazio gradurik hauteman.

Kitokeratina basalak zehaztu gabe daudenez, txosten anatomopatologikoetan erabili ohi diren parametroen bidez "basal-like" tumoreen azpitaldea hauteman dezakegu, gaitzaren egoera oso goiztiarrean. Azpitalde hori biologikoki oso erasokorra izan ohi da.

Hitz gakoak: minbizi, bularra, oinaldeko fenotipoa

Introducción

Estudios recientes utilizando la técnica de "microarrays" de cDNA, que permite analizar prácticamente la totalidad del genoma, han identificado un grupo de genes que subclasifica el cáncer de mama de un modo mucho más exacto desde el punto de vista pronóstico (1,2,3).

En concreto, el grupo de peor riesgo (independientemente de otros factores pronósticos clásicos, como puede ser la presencia de ganglios axilares invadidos) viene definido en estos trabajos por la ausencia de expresión de receptores de estrógenos (RE), la ausencia (!) de expresión del oncogén c-erb-B2, y la expresión de citoqueratinas características de las células epiteliales del estrato basal (CK 5/6, CK 17). Al mismo tiempo, estos tumores suelen presentar mutaciones en el gen oncosupresor p53 y sobreexpresar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr o c-erb-B1).

El fenotipo de estos cánceres de mama de pésimo pronóstico se denomina "basal" (por la expresión característica de citoqueratinas arriba referida), en contraposición con los de mejor pronóstico, que expresan receptores hormonales, no expresan tampoco c-erb-B2, y expresan un tipo de citoqueratinas característico de las células altamente diferenciadas que delimitan la luz de las glándulas mamarias (CK 8/18). Este fenotipo se denomina, en consecuencia, "luminal".

Finalmente existe un tercer tipo de cáncer de mama, de pronóstico intermedio, caracterizado por la expresión conjunta de receptores hormonales y el oncogén c-erb-B2, que suele ser más resistente al tratamiento hormonal, y un cuarto, en el que se expresa c-erb-B2 y no se expresan receptores hormonales, que presenta un pronóstico algo peor que el anterior (pero mejor que el de fenotipo "basal").

Este nuevo intento de clasificación basado en características puramente moleculares, de confirmarse en estudios clínicos más amplios que los estudios pioneros realizados hasta el momento, puede constituir una auténtica revolución en el enfoque no solo diagnóstico, sino también terapéutico de los cánceres de mama. Sería, además, la primera ocasión en que la aplicación de parámetros moleculares añade algo realmente significativo al manejo clásico del cáncer de mama, basado hasta ahora en parámetros como el tamaño tumoral, la invasión ganglionar, el grado histológico y la presencia o no de receptores hormonales.

En este contexto, se nos plantean dos retos fundamentales: dado que los estudios realizados hasta ahora lo han sido sobre series pequeñas de tumores, que abarcan varios tipos histológicos y cualquier estadio tumoral, el primero consiste en dilucidar si la adquisición del fenotipo "basal" por parte de los tumores es un evento tardío en su evolución, o si por el contrario, los tumores pertenecen ya a una de las cuatro categorías definidas anteriormente desde su inicio. Las implicaciones de este hecho serían fundamentales, ya que, de ser así, los tratamientos variarían de forma considerable, independientemente del tamaño del tumor, en incluso de la ausencia de invasión ganglionar. En segundo lugar, es imperativo definir una batería de pruebas diagnósticas mínima, pero suficiente, que sea capaz de deslindar la proporción de tumores

"basales" con exactitud del resto. De los tres parámetros que definen al fenotipo "basal" (ausencia de RE y de c-erb-B2, presencia de CK 5/6), en la mayoría de los hospitales se vienen utilizando de forma rutinaria dos (RE y c-erb-B2) desde hace más de una década.

En un intento de aproximación a las dos cuestiones que acabamos de exponer, hemos analizado una amplia población de tumores pT1 (tumores unifocales de menos de 2 cm de diámetro en la pieza histológica), definiendo un subgrupo "basal-like" (en ausencia de determinación de CK 5/6) caracterizado por la ausencia de expresión de RE, RP y c-erb-B2, y comparándolo con el resto en función de la presencia o no de otros parámetros pronósticos establecidos: grado histológico y nuclear, invasión ganglionar, expresión de p53 y Ki67.

Material y Métodos

Se han estudiado un total de 442 cánceres de mama unifocales de 2 cm o menos en la pieza histológica (pT1) operados entre enero de 1993 y diciembre de 2005. De ellos, 369 fueron carcinomas ductales infiltrantes NOS, y estos últimos han sido los únicos incluidos en el estudio. De los 369 casos, disponemos de datos inmunohistoquímicos completos (RE, RP, c-erb-B2, p53 y Ki67) correspondientes a 346, que son los que han entrado en el análisis final.

La inmunohistoquímica fue realizada de manera uniforme según protocolos extensamente detallados en trabajos anteriores de nuestro grupo (4-6), y para la valoración de las muestras, que fue llevada a cabo siempre por el mismo patólogo, se siguieron igualmente los criterios referidos en esos mismos trabajos, y que son los internacionalmente aceptados de manera más extensa: los tumores se consideraron positivos para receptores hormonales cuando al menos el 10% de los núcleos mostraron tinción específica, y ese mismo punto de corte se utilizó para p53, ya que estudios moleculares del mismo grupo arriba citado (7) y de otros (8) demuestran que cuando al menos un 10% de los núcleos expresan positividad para p53, invariablemente estamos detectando la proteína mutada. La positividad para Ki67 fue reflejada directamente como porcentaje de células tumorales reactivas (reactividad nuclear).

Cumplieron nuestros criterios de aproximación al fenotipo basal (ausencia de RE y RP, ausencia de expresión de c-erb-B2) 45 casos (13%), lo que se corresponde con las tasas referidas en los trabajos pioneros citados en la Introducción (1-3). Tras dicotomizar nuestros tumores según estos criterios en "basales" y "no basales", comparamos la correlación de dichos fenotipos con el resto de variables mediante el test de Spearman.

Para posibilitar el análisis estadístico, dicotomizamos a su vez las variables no dicotómicas: los grados nuclear e histológico fueron reagrupados en grado 3 frente al resto (1 y 2); en el caso de Ki67, analizamos los diferentes puntos de corte mediante el test "CRITLEVEL" (9), que identifica aquél que define un nivel de significación más alto, y que en nuestro caso se situó en una cifra de positividad del

60% o mayor. Se consideraron resultados significativos aquellos para los cuales p fue inferior a 0.05.

Resultados

La aproximación al fenotipo "basal" definida según nuestros parámetros se correlacionó de manera altamente significativa con la expresión de p53 mutado ($p = 0.0001$), grado nuclear 3 ($p < 0.0001$) y un porcentaje de expresión de Ki67 igual o superior al 60% ($p < 0.0001$), y de manera apenas significativa con un grado histológico 3 ($p = 0.045$). No existió ningún grado de correlación con la invasión ganglionar ($p = 0.51$).

Estos resultados están resumidos en la **Tabla I**.

Discusión

El hallazgo de que la ausencia de expresión de receptores de estrógenos y de c-erb-B2 se asocia a un fenotipo celular más indiferenciado ("basal"), y esto a su vez a un pronóstico peor de las pacientes con cáncer de mama, independientemente de otros parámetros clínicos y biológicos manejados durante décadas en este tipo de tumor, inicialmente causó extrañeza, en especial por la negatividad para c-erb-B2 de dicha asociación.

Siendo c-erb-B2 el oncogén más frecuentemente activado en cáncer de mama, no parecía en principio congruente que su no expresión se asociara a un peor pronóstico. Sin embargo, nuestros datos, que son en principio incompletos, por carecer de información respecto de la expresión de citoqueratinas por parte de las células tumorales, parecen avalar completamente este hecho intuitivamente paradójico. En efecto, nuestros tumores RE-, RP- y c-erb-B2-negativos son más proliferativos que el resto, expresan p53 mutado y grado nuclear 3, y todo ello de una manera altamente significativa. Todo ello está plenamente de acuerdo con lo referido en trabajos anteriores, y viene a significar que probablemente tengamos la posibilidad de acotar un subgrupo de peor pronóstico simplemente utilizando los datos de laboratorio que forman parte de la rutina normal del estudio de cáncer de mama en la mayoría de los hospitales.

Lo que es todavía más interesante, hemos verificado este hecho en tumores muy pequeños, de menos de 2 cm de diámetro, lo cual indica que la adquisición del fenotipo "basal", "luminal" o intermedio (c-erb-B2-positivo) es un evento muy temprano en la oncogénesis mamaria, y su conocimiento, en principio, debería obligarnos a reorientar nuestro tratamiento.

Otro aspecto altamente interesante de nuestros hallazgos, y que de nuevo concuerda con lo referido en los trabajos preliminares al respecto, es que la presencia del fenotipo "basal" no guarda relación con el más importante factor pronóstico en cáncer de mama, la invasión ganglionar. El mal pronóstico de estos tumores, por tanto, no parece estar relacionado con su capacidad metastática intrínseca, sino con la proliferación, debido a su asociación con un

Tabla I. Correlación entre la expresión del fenotipo "basal-like" (RE-, RP-, c-erb-B2-) y parámetros clínicos y biológicos de 346 cánceres de mama unifocales pT1. Test de Spearman.

Parámetro	r	p
tamaño > 10 mm	0.10	0.06
GH3	0.11	0.045
GN3	0.30	< 0.0001
N+	0.03	0.51
Ki67 > 60%	0.47	< 0.0001
p53	0.20	0.0001

índice de Ki67 elevadísimo, y probablemente también con la apoptosis, por su asociación igualmente significativa con la expresión de p53 mutado. El gen oncosupresor p53 es un importante regulador de la proliferación, lo cual ya de por sí justificaría la asociación estadística encontrada, pero también es uno de los principales reguladores de la apoptosis, y este es un aspecto que merece ser estudiado en grupo de tumores.

Bibliografía

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406:747-52
2. Ma XJ, Salunga R, Tuggle T, et al. gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100:5974-9
3. Abd el-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004; 203:661-71
4. Schneider J, Rubio MP, Barbazan MJ, Rodríguez-Escudero FJ, Seizinger BS, Castresana JS. P-glycoprotein, HER-2/neu and mutant p53 expression in human gynecologic tumors. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:850-855
5. Schneider J, Pollan M, Jimenez E, Ruibal A, Lucas AR, Nuñez MI, Sanchez J, Tejerina A. Histologic grade and CD44 are independent predictors of axillary lymph node invasion in early (T1) breast cancer. *Tumor Biol* 1999; 20:319-330
6. Schneider J, Pollan M, Tejerina A, Sanchez J, Lucas AR. Accumulation of uPA-PAI-1 complexes inside the tumour cells is associated with axillary nodal invasion in progesterone-receptor-positive early breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:96-101
7. Schneider J, Rubio MP, Rodríguez-Escudero FJ, Seizinger BS, Castresana JS. Identification of p53 mutations by means of SSCP (single strand conformation polymorphism) analysis in gynaecologic tumours: comparison with the results of immunohistochemistry. *Eur J Cancer* 1994; 30A:504-8
8. Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. *Pathol Res Pract* 1998; 194:815-819
9. Abel U, Berger J, Wiebelt H. CRITLEVEL: an exploratory procedure for the evaluation of quantitative prognostic factors. *Methods Inf Med* 1984; 23:154-6