

Aspectos biológicos del grado nuclear en los carcinomas mamarios

A. Ruibal, J. I. Arias¹

Facultad de Medicina. Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela.
¹Servicio de Cirugía General. Hospital Monte de Naranco. Oviedo

RESUMEN

Objetivo: estudiar cómo el grado nuclear (GN) influye en las características clínico-biológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama.

Material y métodos: se incluyeron 236 pacientes, de los cuales 87 eran GN1, 93 GN2 y 56 GN3. Hemos analizado las concentraciones citosólicas de receptor de estrógenos (RE), de progesterona (RP), pS2, cathepsina D y ácido hialurónico, así como las de este y el receptor del factor de crecimiento epidérmico en las membranas celulares. Hemos considerado, además, el tamaño, afectación axilar, metástasis a distancia, ploidía y fase de síntesis celular.

Resultados: los tumores grado 3 mostraron, en relación a los 1, mayores concentraciones de cathepsina D ($p = 0,021$) y menores de receptor de estrógenos ($p = 0,033$), siendo, asimismo, más frecuentemente proliferativos (Fase S $> 7\%$; $p = 0,001$). Al considerar los carcinomas mamarios en función de la hormonodependencia, pudimos ver, en los tumores RE+, que los GN3 fueron más frecuentemente proliferativos ($p = 0,052$), mientras que en los casos RE- cursaron con mayores concentraciones de cathepsina D ($p = 0,026$). Similares hallazgos obtuvimos al tener presente la afectación ganglionar axilar.

Conclusiones: a) el paso de GN 1 a 3 se asocia con menor hormonodependencia, mayor proliferación y superiores concentraciones de cathepsina D; b) estas diferencias biológicas difieren cuando los tumores se clasifican en función de la hormonodependencia y afectación ganglionar axilar: en los casos RE+ o N- la transición del GN se asocia preferentemente a la proliferación celular, mientras que en los casos RE- o N+ lo hace con la cathepsina D.

Palabras clave: Grado nuclear. Cáncer de mama. Proliferación celular. Cathepsina D. EGFR.

Recibido: 10-05-07.

Aceptado: 17-07-07.

Correspondencia: Álvaro Ruibal Morell. Facultad de Medicina. Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Clínico Universitario. C/ Choupana, s/n. 15706 Santiago de Compostela, A Coruña. e-mail: alvaro.ruibal.morell@sergas.es

ABSTRACT

Objectives: to study the association of nuclear grade (NG) with specific clinical and biological parameters which may influence the clinical behaviour of infiltrating ductal carcinomas of the breast (IDC)

Material and methods: we analyzed in 236 tissue samples the cytosolic concentrations of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), pS2, cathepsin D and hyaluronic acid (HA), as well as those of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and HA in the cell membrane fraction. Likewise, we considered size, ploidy, S-phase fraction and axillary node involvement and distant metastasis as variables of the study.

Results: the transition from NG1 to NG3 was accompanied by greater cellular S-Phase $> 7\%$ ($p = 0.001$), higher cathepsin D levels ($p = 0.021$) and lower ER concentrations ($p = 0.033$). When we considered the positivity for ER (> 10 fmol/mg prot.), we can observe that, in the IDC-ER+ tumors, NG3 was accompanied by greater SF+ ($p = 0.002$), whereas in the IDC-ER- cases it was associated with higher cathepsin D levels ($p = 0.026$). Similar features were observed when axillary nodal involvement was taken account

Conclusions: these results led us to consider that NG is associated with some clinical-biological changes (greater proliferation, higher cathepsin D levels) that may help to explain its value as a prognostic factor in breast carcinomas. Nevertheless, these biological associations depends on the hormonodependence or axillary nodal invasion of the tumors. In ER-positive or N-negative, NG3 was associated preferently with a greater cellular proliferation, whereas in ER-negative or N-positive it was associated with higher cathepsin D levels.

Key words: Nuclear grading. Breast cancer. Cellular proliferation. Cathepsin D. EGFR.

INTRODUCCIÓN

El grado nuclear es un parámetro histopatológico y consiste en la evaluación citológica de los núcleos de las células tumorales en comparación con los de las células epiteliales mamarias normales. Su conocimiento ha ad-

quirido un notable interés en el estudio del cáncer de mama, no sólo por estar incluido en ciertos índices pronósticos, sino también porque numerosos trabajos han demostrado su utilidad como factor indicador de la evolución, tanto en los carcinomas ductales *in situ* (1,2) como en los infiltrantes, ya sean considerados globalmente (3) como en ausencia de afectación ganglionar axilar (4,5). Asimismo, conocemos que se correlaciona directamente con una serie de parámetros biológicos como con la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el c-kit (6), la angiogenina, proteína de *shock* térmico y la quinasa focal de adhesión que regula las vías antiapoptóticas (7), e inversamente con la expresión de los receptores de estrógenos (8-10), ciertas metaloproteasas y el gen bcl-2 (11). Además, junto a la proliferación celular ayuda a establecer subgrupos de tumores con diferentes respuestas a determinados agentes quimioterapéuticos (12) y con la invasión linfovascular, tamaño tumoral y la palpación del tumor permite predecir la afectación ganglionar axilar (13). Merece destacarse que los carcinomas lobulillares infiltrantes de mama parecen cursar menos frecuentemente que los ductales infiltrantes con un grado nuclear avanzado (14).

Dado su atractivo histológico y su interés actual como factor pronóstico según algunos grupos, hemos querido en este trabajo analizar cómo el grado nuclear influye en las características clínico-biológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama, subtipo histológico más frecuente, tanto considerados globalmente, como cuando son clasificados en función de la positividad para los receptores de estrógenos o de la afectación ganglionar axilar, situaciones ambas de importancia práctica.

MATERIAL Y MÉTODOS

El grupo estudio incluyó 236 pacientes afectas de carcinoma ductal infiltrante de mama de edades comprendidas entre los 27 y 86 años (62,1±11,2; mediana 63), de los cuales 87 eran GN1, 93 GN2 y 56 GN3. Todas fueron diagnosticadas en el Hospital Monte del Naranco de Oviedo desde el año 1997. El grado nuclear (GN) fue definido por el Servicio de Anatomía Patológica del citado hospital asturiano.

Tras su obtención en el quirófano y transporte en un contenedor frío, las muestras fueron separadas de sus componentes grasos y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su utilización. Posteriormente, fueron pulverizadas con un microdesmembrador (OMNI 1000, Waterbury, CT. USA) a -70 °C y homogeneizadas en un potter de teflón-cristal en un buffer TRIS-CLH (TRIS 0,01 M, EDTA Na2 0,0015 M, 10% glycerol, 0,1 % monothioglycerol, pH 7,4). Los homogenizados fueron luego centrifugados a bajas revoluciones (800 g durante 10 minutos a 4 °C) y el sobrenadante obtenido ultracentrifugado a 100.000 g durante una hora a 4 °C. El nuevo sobrenadante (citosol) y el precipitado (membranas) se uti-

lizaron para los distintos análisis biológicos. Hemos dosificado las concentraciones citosólicas de receptor de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) mediante sendos ensayos inmunoenzimáticos de Abbott (USA), catepsina D (IRMA. CIS BioInternational. Francia), pS2 (IRMA. CIS BioInternational. Francia) y ácido hialurónico (AH; RIA. Pharmacia. Suecia), así como las del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; RLG. Viennlab. Austria) y ácido hialurónico en las membranas celulares. También se han considerado el tamaño patológico, afectación ganglionar (N), metástasis a distancia (M), ploidía y la fase de síntesis celular (FS) determinadas estas dos últimas mediante citometría de flujo (Becton Dickinson. Fascam. EE.UU.) en muestras en fresco. Los valores de los parámetros biológicos fueron expresados por mg de proteína determinada por el método de Bradford. Como las concentraciones de los parámetros biológicos no siguieron una distribución gaussiana, hemos empleado el test de MannWhitney, así como el Chi cuadrado (χ^2), con la corrección de Yates cuando fue necesaria, para la comparación de variables cualitativas. Los resultados han sido expresados mediante la mediana y el intervalo. Una diferencia se consideró estadística cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

RESULTADOS

Huyendo de la susceptibilidad del observador y en aras de obtener resultados más fiables, hemos considerado exclusivamente los GN 1 y 3, obviando los tumores intermedios o GN2. Al clasificar los CDI en función del grado nuclear, pudimos comprobar (Tabla I) que los GN3 (pobremente diferenciados) mostraron, en relación a los GN1 (bien diferenciados), mayores concentraciones de

Tabla I. Distribución de los valores [intervalo (mediana), porcentaje de positividad] de los diferentes parámetros clínico-biológicos en los carcinomas ductales infiltrantes de mama GN1 y GN3

| Parámetro | GN1 | GN3 | p |
|-------------|----------------------|--------------------|-------|
| RE* | 0,9-605 (11) | 0,1-176 (5,4) | 0,033 |
| RP* | 1-312 (5) | 0,1-263 (2,4) | ns |
| pS2** | 0,9-118 (6) | 0,1-63,5 (4,7) | ns |
| CATD*** | 4-137 (41) | 11-192 (55) | 0,021 |
| EGFR* | 1-1.575 (4) | 0,9-2.267 (7) | 0,094 |
| AHc** | 1.362-21.625 (3.849) | 957-30.561 (4.612) | ns |
| FS+ | 2-51 (7) | 2,1-48 (9,8) | 0,092 |
| Tamaño++ | 0,4-8 (2) | 0,3-8 (2,4) | ns |
| N+ | 40/87 | 35/56 | ns |
| M+ | 19/87 | 11/56 | ns |
| FS > 7% | 38/87 | 40/56 | 0,001 |
| Aneuploides | 46/87 | 32/56 | ns |

*: fmol/mg prot. **: ng/mg prot. ***: pmol/mg prot. +: %; ++: cm; N: afectación ganglionar axilar; M: metástasis a distancia.

catepsina D ($p = 0,021$) y menores de RE ($p = 0,033$), siendo, asimismo, más frecuentemente proliferativos ($p = 0,001$) tomando como dintel de positividad el valor del 7% para la fase de síntesis celular y que corresponde a la mediana obtenida en nuestro laboratorio en un grupo de 321 carcinomas ductales infiltrantes de mama.

Al considerar los carcinomas mamarios en función de la hormonodependencia, pudimos ver, en los tumores RE+ (> 10 fmol/mg prot.), que los GN3 fueron más proliferativos (FS), rozándose la significación estadística (i: 4-48, mediana 7,5 vs. i: 2-25, mediana 5%; $p = 0,088$), mientras que en los casos RE- aquellos cursaron, exclusivamente, con mayores concentraciones de catepsina D (i: 11-92, mediana 79,4 vs. i: 54-137, mediana 37 pmol/mg prot; $p = 0,026$).

Cuando los CDI fueron clasificados en función de la existencia de invasión ganglionar axilar, pudimos constatar en los N-, que los tumores GN3 mostraron mayores concentraciones de EGFR (i: 1-579, mediana 30,5 vs. i: 1-157,5, mediana 3 fmol/mg prot; $p = 0,005$) y fueron más frecuentemente proliferativos con el dintel del 7% para la FS (10/46 vs. 19/21; $p = 0,002$), mientras que en presencia de afectación axilar los tumores GN3 cursaron exclusivamente con mayores concentraciones de catepsina D (i: 24-192; mediana 66,9 vs. i: 10-132; mediana 42 pmol/mg prot; $p = 0,032$).

DISCUSIÓN

El grado nuclear, parámetro habitual en los informes anatomopatológicos, parece asociarse, de un modo más importante que otros indicadores histológicos, con el número y patrones de anormalidades genéticas en los tumores mamarios (15). Por ello, no debe extrañar que algunos grupos hayan constatado su valor como un importante factor pronóstico en estas neoformaciones. Continuando con nuestra línea de trabajo (16), hemos querido ver cómo el grado nuclear incidía sobre ciertas propiedades clínico-biológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama, subtipo más frecuente.

Cuando consideramos globalmente los CDI, pudimos comprobar que los GN3 cursaban con mayores concentraciones de catepsina D y menores de receptores de estrógenos, siendo, asimismo, más frecuentemente FS positiva ($> 7\%$). Quiere ello decir, que las diferencias se centran en tres aspectos: hormonodependencia, síntesis de proteasas y proliferación celular. Sin embargo, al clasificarlos en función de la positividad para los receptores estrogénicos, tomando como dintel 10 fmol/mg prot, pudimos ver, en los tumores RE-positivos, que los GN3 eran más frecuentemente FS+, mientras que en los RE-negativos cursaban con mayores concentraciones de catepsina D. Es decir, los hallazgos observados en el grupo global se dividían cuando la hormonodependencia era considerada. Este mismo comportamiento se apreció cuando los tumores fueron clasificados en función de la

afectación ganglionar axilar, asociándose el GN3 con la FS+ y el EGFR en los sin ganglios afectados y con mayores concentraciones de catepsina D cuando la axila estaba invadida.

La catepsina D, enzima ácida lisosomal, es un miembro de la familia de las aspartilproteasas e interviene en la diseminación de los tumores mamarios (17). Hoy en día sabemos que esta enzima actúa como una proteasa siguiendo su activación a pH ácido o como un ligando de diferentes receptores de membrana a pH neutro. Puede, asimismo, desplazar al factor de crecimiento insulínico tipo II (IGFII) de su receptor o activar otros. También ejerce su acción aumentando la proliferación celular y la angiogénesis, independientemente de su actividad catalítica, e inhibiendo la apoptosis sólo cuando se encuentra en su forma molecular completa. Además, se ha visto que inactiva total o parcialmente ciertas citoquinas inflamatorias de los macrófagos, lo cual conlleva modificaciones en el microambiente extracelular, un cambio en la respuesta inmune y la potenciación de la migración de las células tumorales (18). En cuanto a su valor como factor pronóstico y, a pesar de la controversia sobre su localización (celular o estromal), hoy día se acepta que en ambos lugares es indicadora de un peor comportamiento en los carcinomas mamarios considerados globalmente o en ausencia de invasión regional (19-22).

En relación con la proliferación celular, independiente de cómo es analizada, sabemos que se asocia positivamente con el grado histológico, tamaño, afectación ganglionar, topoisomerasa 2, la p53 y la supervivencia de las pacientes, especialmente en ausencia de invasión axilar (23-25), mientras que lo hace negativamente con el gen bcl-2 (26,27), todo lo cual define su utilidad en la clínica diaria como un parámetro de peor pronóstico.

La hormonodependencia, definida por los receptores de estrógenos y de progesterona, se correlaciona inversamente con la diferenciación celular y ello explica que las concentraciones de RE sean menores en los tumores GN3 vs. GN1. Sin embargo, de nuestro estudio se desprende que la hormonodependencia parece jugar un papel discreto sobre el grado nuclear, pues su influencia se pierde cuando clasificamos los tumores en función de la invasión ganglionar axilar.

Merece destacarse que sólo en los tumores sin afectación ganglionar axilar los casos GN3 mostraron mayores concentraciones de EGFR que los GN1, lo que sugiere un importante papel de este receptor en la fisiopatología del grado nuclear. Sabemos que el receptor del factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores de membrana con actividad intrínseca tirosínquinasa y desde hace años constituye un parámetro biológico de uso rutinario, pues se ha visto que se correlaciona con el grado histológico, índice mitótico, la afectación ganglionar axilar y la supervivencia libre de enfermedad (28-31), siendo su expresión menor en los carcinomas mamarios de mujeres con edad avanzada (32).

Los resultados anteriores nos inducen a las siguientes consideraciones: a) el paso de GN1 a GN3 se asocia con una menor hormonodependencia, mayor proliferación y superiores concentraciones de catepsina D; b) estas diferencias biológicas difieren cuando los tumores se clasifican en función de la hormonodependencia (RE+) y afectación ganglionar axilar (N), de tal modo que en los casos RE+ o N- la transición del GN se asocia preferentemente a proliferación celular, mientras que en los RE- o N+, lo hace con una mayor concentración de catepsina D, evidenciando distintos mecanismos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Boland GP, Chan KC, Knox WF, Roberts SA, Bundred NJ. Value of the Van Nuys prognostic index in prediction of recurrence of ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery. *Br J Surg* 2003; 90: 426-32.
- Roka S, Rudas M, Taucher S, Dubsy P, Bachleitner-Hofmann T, Kandioler D, et al. High nuclear grade and negative estrogen receptor are significant risk factors for recurrence in DCIS. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 243-7.
- Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 147-59.
- Nikoloc-Vukosavljevic D, Kanjer K, Markicevic M, Todorovic-Rakovic N, Vukotic D, Nestkovic-Konstatinovic Z. Natural course of node-negative breast cancer: High risk-related subgroups. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 543-9.
- Trudeau ME, Pritchard KI, Chapman JA, Hanna WN, Kahn HJ, Nurray D, et al. Prognostic factors affecting the natural history of node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Trat* 2005; 89: 35-45.
- Tsuda H, Morita D, Kimura M, Shibto E, Ohtsuka Y, Matsubara O, et al. Correlation of kit and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid-tubular subtype, nuclear grade 3 and mesenchymal or myoepithelial differentiation. *Cancer Sci* 2005; 96: 48-53.
- Lark AL, Livasy CA, Dressler L, Moore DT, Millikan RC, Geradts J, et al. High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. *Mod Pathol* 2005; 29: 1289-94.
- Baqai T, Shousha S. Oestrogen receptor negativity as a marker for high grade ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology* 2003; 42: 440-7.
- Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AH, Pinder SE, et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: A review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol* 2005; 18: 26-35.
- Nadji M, Gómez-Fernández C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: Experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 21-7.
- Martínez Arribas F, Álvarez T, del Val G, Martín Garabato E, Núñez Villar MJ, Lucas R, et al. Bcl-2 expression in breast cancer: A comparative study at the mRNA and protein level. *Anticancer Res* 2007; 27: 219-22.
- Page DL, Gray R, Allred DC, Dressler LG, Hatfield AK, Martino S, et al. Prediction of node-negative breast cancer outcome by histologic grading and S-phase analysis by flow cytometry: An Eastern Cooperative Oncology Group Study (2192). *Am J Clin Pathol* 2001; 24: 10-8.
- Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ: Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinomas. *World J surg* 2001; 25: 767-72.
- Cristofanilli M, González Angulo A, Sneige N, Kau SW, Broglio K, Theriault RL, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: Response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 41-8.
- Simpson PT, Reis_Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205: 248-54.
- Ruibal A, Arias JI, del Rio MC, Lapeña G, Schneider J, Tejerina A. Histological grade in breast cancer: Association with clinical and biological features in a series of 229 patients. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 56-61.
- Brechem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, et al. Cathepsin D affects multiple tumor progression steps in vivo: Proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 5951-5.
- Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. Cathepsin D specifically claves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am J Pathol* 2003; 162: 1183-90.
- Foekens J, Look MP, Nolt de Vries J, Meijer van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin D in primary breast cancer: Prognostic evaluating involving 2,810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-7.
- Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factor in node-negative breast cancer: A review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 2002; 235: 10-26.
- Gaci Z, Bouin Pineau MH, Gaci M, Daban A, Ingrand P, Metaye T. Prognostic impact of cathepsin D and c-erbB2 oncoprotein in a subgroup of node negative breast cancer patients with low histological grade tumors. *Int J Oncol* 2001; 18: 793-800.
- Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, Batsis Ch, Karavasilis V, Charchanti A, et al. Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast* 2003; 12: 111-9.
- Bilir A, Ozmen V, Kecer M, Eralp Y, Cabioglu N, Ahishai B, et al. Thymidine labelling index: Prognostic role in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2004; 27: 400-6.
- He Q, Mao Y, Wu J, Decker C, Merza M, Wang N, et al. Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumor marker for breast carcinomas. *Int J Oncol* 2004; 25: 945-53.
- Koren R, Rath-Wolfson L, Ram E, Itzhac OB, Schachter B, Klein B, et al. Prognostic value of topoisomerase II in female breast cancer. *Oncol Rep* 2005; 12: 915-9.
- González Vela MC, Garijo F, Fernández F, Val-Bernal JF. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma: Comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. *Histol Histopathol* 2001; 16: 399-406.
- Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 2005; 18: 374-81.
- Okamura K, Kobayashi I, Matsuo K, Kiyoshima T, Yamamoto K, Miyoshi A, et al. Immunohistochemical localization of cathepsin D, proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor in human breast carcinoma analysed by computer image analyser: Correlation with histological grade and metastatic behaviour. *Histopathology* 1997; 31: 540-8.
- Losch A, Tempfer C, Kohlberger P, Joura EA, Denk M, Zajic B, et al. Prognostic value of cathepsin D expression and association with histomorphological subtypes in breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 205-9.
- Dabrosin C, Johansson AC, Ollinger K. Decreased secretion of cathepsin D in breast cancer in vivo by tamoxifen: Mediated by the mannose-6-phosphate/IGF-II receptor? *Breast Cancer Res Treat* 2004; 85: 229-38.
- Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65 (1): 338-48.
- Eppenberger-Castiri S, Moore DH jr, Thor AD, Adgerton SM, Kueng W, Eppenberger U, et al. Age-associated biomarker profiles of human breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1318-30.