

CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA Y RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P53.

MOLECULAR CLASSIFICATION OF BREAST CANCER AND RELATIONSHIP WITH THE EXPRESSION OF p53 PROTEIN.

José Gregorio López Añez¹; Andreina C. López Bitriaga²; Franklin Pacheco Coello³

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer and with the highest mortality in women from Venezuela and around the world. It is a heterogeneous disease with biological subtypes that influences the prognosis of patients. Its molecular classification is essential for proper treatment. We performed a descriptive, retrospective and cross-sectional study in the Institute of Breast-Health of Aragua state, with 97 female patients with Ductal Infiltrating Breast Carcinoma. They were classified by age, histology, immunohistochemistry profile, molecular classification was determined according to the Saint Gallen 2013 consensus, and the molecular type was related to the hyperexpression of the p53 protein. Results: Over 40 years and under 40 years, represented 88.7% and 11.3% respectively, the findings of Luminal A 12.4% and all tumors Her2 Positive 50.5% highlight. Additionally, Luminal B like Her2 Negative 20.6% and Triple Negative 16.4%, $p \leq 0.05$ was found when comparing the molecular class with the age range, Her2 Non-Luminal (Under 40 years): 23.8%; Triple Negative (Between 40 and 50 years): 44.8% and Luminal B Positive (Greater than 50 years): 71.4%. 70% of patients were positive for hyperexpression of the p53 protein, with $p > 0.05$ among those which tested positive and negative for p53 in the molecular class Luminal B Her2 Positive. The molecular classification of breast cancer and the determination of p53 are fundamental to understand the biological behavior of this pathology.

KEY WORDS: breast cancer, molecular classification, immunohistochemistry.

RESUMEN

El cáncer de mama es el más frecuente y de mayor mortalidad en mujeres de Venezuela y el mundo. Es una enfermedad heterogénea con subtipos biológicos que influyen en el pronóstico de los pacientes y su clasificación molecular es indispensable para el tratamiento adecuado. Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo y transversal, en el Instituto de Senología del estado Aragua, con historias de 97 pacientes femeninas con Carcinoma Ductal Infiltrante de mama, se clasificaron por edad, histología y perfil inmunohistoquímico; se determinó la clasificación molecular según el consenso de San Gallen 2013 y se relacionó el tipo molecular con la hiperexpresión de la proteína p53. Los resultados reportaron mujeres mayores de 40 años y menores de 40 años que representaron 88,7% y 11,3% respectivamente; resaltan los hallazgos de Luminal A like 12,4% y todos los tumores Her2 positivo 50,5%. Adicionalmente Luminal B like Her2 Negativo 20,6% y Triple Negativo 16,4%. Se encontró $p \leq 0,05$ al comparar la clase molecular con el rango de edad Her2 No Luminal (menor de 40 años): 23,8%; Triple Negativo (entre 40 y 50 años): 44,8% y Luminal B Positivo (mayor de 50 años): 71,4%. El 70% de los pacientes fue positivo para la hiperexpresión de la proteína p53, con $p > 0,05$ entre los que resultaron positivos y negativos al p53 en la clase molecular Luminal B Her2 Positivo. La clasificación molecular del cáncer de mama y la determinación del p53 son fundamentales para entender el comportamiento biológico de esta patología.

PALABRAS CLAVE: cáncer de mama, clasificación molecular, inmunohistoquímica.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer femenino más frecuente y constituye la primera causa de mortalidad por neoplasias en mujeres de Venezuela y el mundo¹. Es

considerada una enfermedad heterogénea debido a los subtipos biológicos identificados que causan gran variabilidad en su evolución clínica por lo cual en la actualidad, su análisis molecular es un elemento importante para su tratamiento y para mejorar su pronóstico^{2,3}.

Recibido: Marzo, 2019 Aprobado: Mayo, 2019

¹Departamento de Morfología Normal y Patológica, Escuela de Medicina "Dr. Witremundo Torrealba", Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. ²Escuela de Medicina "Witremundo Torrealba". Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. ³Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

Correspondencia: jlopez38@uc.edu.ve

Perou - Sorlie y col. fueron los primeros en mostrar que los carcinomas mamarios pueden subdividirse con base al análisis de la expresión génica^{4,5}. La mejor forma de realizar la clasificación molecular del cáncer de mama, mediante este análisis es por medio de técnicas de biología molecular como microarreglos de hibridación fluorescente in situ (FISH), e hibridación cromogénica in situ (CISH) entre otros; no

obstante, es la inmunohistoquímica (IHC) el método más utilizado debido a su relativo bajo costo y mejor disponibilidad⁶.

De acuerdo a la clasificación San Gallen 2013, se reconoce desde el punto de vista inmunohistoquímico, las siguientes clases moleculares: Luminal A: Receptores de estrógeno (RE) positivo, Receptores de progesterona (RP) mayor o igual 20% , Índice de genes de proliferación celular (KI-67) menor 14%; Factor de crecimiento epidérmico humano receptor- 2 (Her2) negativo; Luminal B like Her2 negativo: RE positivo, RP menor 20% o negativo, KI-67 mayor o igual a 14%, Her2 negativo; Luminal B like Her2 positivo: RE positivo , RP positivo o negativo, KI-67 cualquier valor, Her2 positivo; Her2 No Luminal: RE negativo, RP negativo, Her2 positivo ; Triple negativo (TN): RE negativo, RP negativo, Her2 negativo, KI-67 elevado o normal⁷.

Los tumores de tipo basal RE, RP negativos y Her2 negativo tienen intensa expresión de citoqueratinas, 5, 6, 14 y 17 y KI67 elevado, por el uso de IHC, esta clase también se ha llamado "Triple negativo" para los que no expresan RE, RP o Her2, sin que esto signifique que todos los tumores triple negativos son basales, ya que coinciden en un 80 % de los casos¹. Por otra parte el gen supresor tumoral p53 juega un papel importante en un gran número de neoplasias humanas, la proteína producto de la mutación del gen se relaciona con alteración en la reparación de lesiones del ADN, es más estable y de mayor vida media lo que la hace detectable por IHC⁸.

La expresión inmunohistoquímica de proteína p53 se ha comportado como un factor independiente de mal pronóstico en el cáncer de mama^{9,10}. El pronóstico y la sensibilidad a la quimioterapia es diferente en los distintos subgrupos moleculares del cáncer de mama, los tipos Luminales tienden a tener mejores pronósticos mientras el triple negativo y el Her2 son de peor pronóstico ya que están asociados a alta tasa de agresividad biológica; no obstante, los triple negativos tienen alta tasa de respuesta a la quimioterapia y los Her2 presentan resistencia a los agentes quimioterapéuticos convencionales pero responden a anticuerpos monoclonales antiHer2. Los luminal A like presentan una alta tasa de respuesta a la terapia endocrina mientras el Luminal B like la respuesta a esta es variable^{11,12,13}.

El objetivo de la investigación fue dirigido a determinar la clasificación molecular de pacientes con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama, y su relación con la edad, histología e hiperexpresión de la proteína p53 con el propósito de precisar las características biológicas del tumor, individualizar el tratamiento y mejorar

el tiempo libre de enfermedad y supervivencia global por esta patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo y transversal, previa aprobación del Comité de Ética del Instituto de Senología del Estado Aragua, Venezuela. La información se obtuvo de un universo de historias clínicas de pacientes atendidas en dicha institución, pertenecientes al lapso comprendido desde Enero 2008 hasta Diciembre de 2016. Fue seleccionada una muestra no probabilística de tipo intencional, constituida por 97 historias de estos pacientes femeninas considerando los siguientes criterios: edad de la paciente, resultado de biopsia con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama, resultados de inmunohistoquímica (IHC) para receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), índice de genes de proliferación celular (KI-67), factor de crecimiento epidérmico humano receptor- 2 (Her2) y la hiperexpresión de proteína p53 (p53), procesados en el Laboratorio de Anatomía Patológica, ubicado en el Centro Médico Maracay de la misma entidad federal. Las historias de las pacientes fueron clasificadas de acuerdo a: edad, tipo y grado histológico del tumor. Se determinó el perfil inmunohistoquímico de los tumores y la clasificación molecular de cáncer de mama de acuerdo al consenso de San Gallen 2013, luego se relacionó la clase molecular con la hiperexpresión de proteína p53. Los datos fueron agrupados en tablas y gráficos y para el análisis se fueron calculadas medidas descriptivas y pruebas de X² y Kruskal Wallis para su inferencia. Se utilizó el programa Statistix 9.0 bajo ambiente Window.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las historias pertenecientes a 97 pacientes, con diagnóstico de carcinoma infiltrado de mama e inmunohistoquímica se clasificaron de acuerdo a las clases moleculares de carcinoma de mama. Luminal A like : 12 pacientes (12,4%), Luminal B like Her2 Negativo: 20 pacientes (20,6%), Luminal B like Her2 Positivo: 28 pacientes (28,9%), Her2 No Luminal: 21 pacientes (21,6%) y Triple Negativo: 16 pacientes (16,4 %) (tabla 1).

Fueron agrupados los pacientes por rango de edad, 57,7% mayores de 50 años (n= 56) , seguidos por el grupo de edad comprendida entre 40 y 50 años (n= 30), 31% y en el grupo de menores de 40 años se reportó 11,3% (n= 11). Se encontró diferencia significativa (p<0,05) al comparar la clase molecular con el rango de edad para Her2 No Luminal (menor de

40 años): 23,8%; Triple Negativo (entre 40 y 50 años): 44,8 % y Luminal B Positivo (mayor de 50 años): 71,4% (tabla 2).

El tipo histológico de carcinoma infiltrante de mama más frecuente fue Ductal con 86 pacientes (88,7%), seguido por Lobulillar y Ducto-Lobulillar con 4 pacientes cada uno (4,1%) y Medular, Ductal-Mucinoso e Inflamatorio con 1 paciente cada uno (1%). De acuerdo al tipo histológico, 75% de las muestras con clasificación molecular Luminal A like fueron Ductal y 25% Ducto-Lobulillar, con clasificación Luminal B like Her2 Negativo 85 % fueron Ductal, 10% Lobulillar y 5% Medular, Luminal B like HER 2 Positivo 89,3 % Ductal, 7,1 Lobulillar y 3,6% Ducto-Lobulillar, Her2 No Luminal 90,4% Ductal, 4,8 Inflamatorio y 4,8 Ductal-Mucinoso y todas las muestras con clasificación molecular Triple Negativo resultaron ser Ductal.

El grado histológico 2 fue el más reportado con 66 casos (68%), seguido de grado histológico 1 con 22 casos (22,7%) y por último el grado histológico 3 con 9 casos (10,3%). Los grados histológicos se distribuyeron de la siguiente manera: Luminal A like con 9 casos grado histológico 2; 2 casos grado histológico 1 y 1 caso grado histológico 3; Luminal B like Her2 Negativo 11 casos grado histológico 2; 3 casos grado histológico 3 y 1 caso grado histológico 1; Luminal B like Her2 Positivo 18 casos grado histológico 2 y 10 casos grado histológico 1, Triple Negativo 12 casos grado histológico 2 con 2 casos para grado histológico 1 y 3 y Her2 No Luminal 16 casos grado histológico 2; 3 casos grado histológico 3 y 2 casos grado histológico 1 (Figura 1).

En relación a p53, se encontró que 68 casos (70,1%) de los 97 pacientes resultaron positivos y 29 casos (29,9%) fueron negativos, siendo la clase molecular Her2 No Luminal (18,6%), la que presentó mayor cantidad de positivos a p53, seguido por Luminal B like Her2 Positivo (16,5%), Luminal B Her2 negativo (15,4%), Triple Negativo (13,4 %) y Luminal A like (6,2%). La prueba de Kruskal-Wallis arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre los que resultaron positivos y negativos a p53 en la clase molecular Luminal B Her2 Positivo (tabla 3).

DISCUSIÓN

En los resultados de este trabajo se mantiene lo observado en estadísticas tanto nacionales como internacionales en cuanto a la edad de los pacientes, donde las mayores y menores de 40 años, representan 88,7% y 11,3% de los casos con diagnóstico de

carcinoma infiltrante de mama respectivamente.¹ Esto ratifica el énfasis de la pesquisa mamográfica de esta patología a partir de los 40 años y hacer hincapié en los factores de riesgo, con los diferentes métodos de identificación de riesgo elevado, para detectar en etapas precoces esta patología en pacientes menores de 40 años¹³.

Se observó en la clasificación molecular de cáncer de mama una diferencia importante, en cuanto a las estadísticas nacionales y mundiales, entre 2 clases moleculares y las encontradas en esta investigación; en otros trabajos se ha reportado para Luminal A entre 50% y 60%; no obstante, en este trabajo solo se encontró en 12,4% de los casos. Estos resultados son preocupantes ya que pertenecen a pacientes con mejores factores pronóstico por ser tumores de menor agresividad y que responden adecuadamente a la hormonoterapia. Se caracterizan por ser pacientes con mayor tiempo libre de enfermedad y mayor supervivencia global; por otra parte, hay poca diferencia en el Luminal B donde se reportan entre 15 y 20 % a nivel internacional y en este estudio se encontró un 20, 6%; sin embargo, en los pacientes con Her2 positivo es reportado mundialmente entre 15 - 20% y en el presente trabajo se evidenciaron hallazgos de 50,5%. Este hecho es relevante ya que estos son pacientes con tumores con comportamiento clínico y biológico muy agresivo y se han asociados a resistencia a las drogas quimioterapéuticas pero con buena respuesta a terapias antiHer2. Igualmente se evidenció poca diferencias en los casos triple negativo donde a nivel mundial se ha reportado entre 12 y 17% y en este trabajo se encontró 16,4%.

Se presentan diferencias significativa ($p \leq 0,05$) al comparar la clase molecular con el rango de edad para Her2 No Luminal (menor de 40 años): 23,8%; Triple Negativo (entre 40 y 50 años): 44,8 % y Luminal B Positivo (mayor de 50 años): 71,4%. A pesar que en la mayoría de los casos es de tipo histológico Ductal y de grado histológico 2 se ratifica con estos hallazgos la gran heterogeneidad del tumor y la importancia de la expresión genética y molecular de estas lesiones para la terapéutica y el pronóstico de los pacientes^{1, 14-19}.

Es igualmente resaltante los hallazgos que se encontraron en el p53 con 70% de los pacientes positivos para la hiperexpresión de esta proteína, lo que indica mutaciones en el gen supresor p53, evidenciando una diferencia importante de acuerdo a la literatura revisada que reporta cifras entre 23% y 48% en las mutaciones de este gen. El gen supresor p53 no mutado

Tabla 1. Clasificación molecular de carcinoma infiltrante de mama.

Clase Molecular	n	%
Luminal A like	12	12,4
Luminal B like Her2 Negativo	20	20,6
Luminal B like Her2 Positivo	28	28,9
Her 2 No Luminal	21	21,6
Triple Negativo	16	16,4
Total	97	100

Tabla 2. Clases moleculares de carcinoma infiltrante de mama y su relación con la edad.

Rango de edad (años)	Luminal A like		Luminal B like Her2 Negativo		Luminal B like Her2 Positivo		Her2 No Luminal		Triple Negativo		Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Menor de 40	0	0	2	10	1	3,6	5	23,8*	3	18,8	11	11,3	* 0,01
Entre 40 y 50	3	25	7	35	7	25	6	28,6	7	44,8*	30	31	* 0,02
Mayor de 50	9	75	11	55	20	71,4*	10	47,6	6	36,4	56	57,7	* 0,001

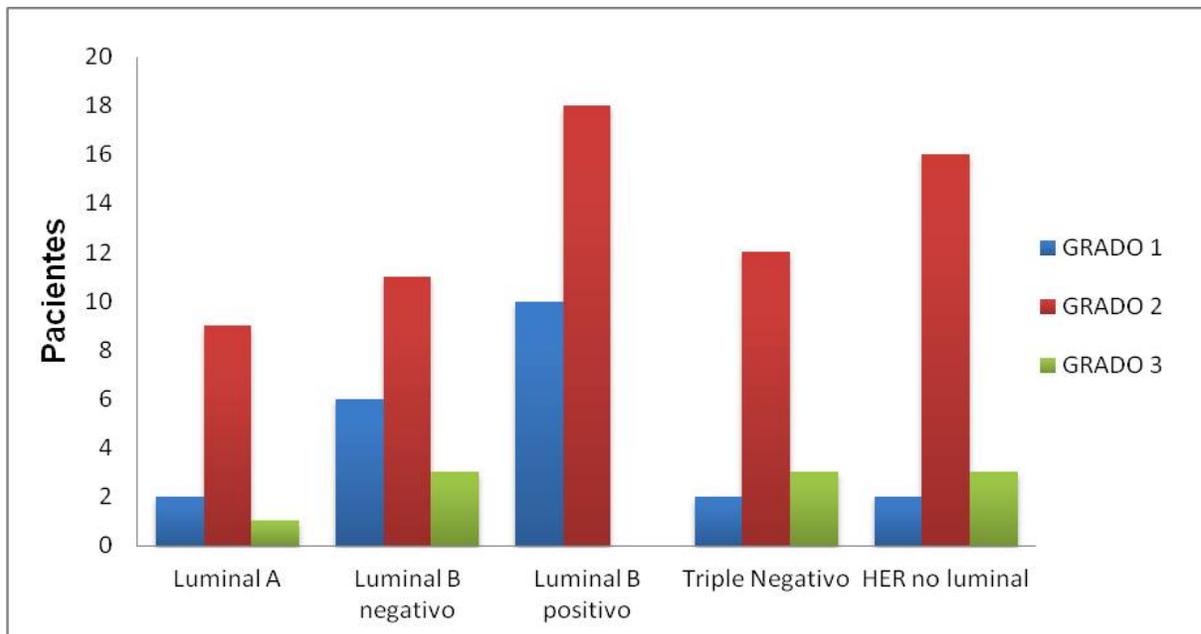
Significativo: $p < 0,05$.

Tabla 3. Clasificación molecular del carcinoma infiltrante de mama según la expresión de la proteína p53

Clase Molecular	p53						p
	Positivo		Negativo		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Luminal A like	6	6,2	6	6,2	12	12,4	
Luminal B like Her2 Negativo	15	15,5	5	5,1	20	20,6	
Luminal B like Her2 Positivo	16	16,5	12	12,4	28	28,9	0,02*
Triple Negativo	13	13,4	3	3,1	16	16,5	
HER 2 No Luminal	18	18,6	3	3	21	21,8	
Total	68	70,1	29	29,9	97	100	

Significativo: $p < 0,05$.

Figura 1. Distribución de los pacientes según la clase molecular y el grado histológico



permite, ante un daño celular, acumulación de proteína p53 no alterada, esto causa un bloqueo transitorio del ciclo celular en la fase G1, justo antes de iniciar la duplicación del ADN, dicho bloqueo a continuación del daño del ADN, da tiempo a la célula para inducir una respuesta y reparar las lesiones. Hay suficientes evidencias que las células con expresión de una p53 mutada no presenta este fenómeno, estas células no dejan de dividirse después del daño del ADN, ocurriendo una gran proliferación celular, lo que se traduce en los pacientes en una disminución en el tiempo libre de enfermedad y disminución en la supervivencia global, además se observó diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre los que resultaron positivos y negativos al p53 en la clase molecular Luminal B Her2 Positivo^{9,10,20,21}.

Los pacientes que acuden al Instituto de Senología del Estado Aragua provienen en su mayoría de esta entidad federal pero también acuden de los Estados vecinos como Carabobo, Guárico, entre otros. Los resultados del Luminal A like, de todos los tumores Her2 Positivo y de p53 obliga a realizar un estudio con mayor cantidad de pacientes y adicionalmente con técnicas de biología molecular para ratificar tan importantes hallazgos.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Instituto de Patología Mamario del Estado Aragua en especial a su Directora Ing. Karelis Lugo y al personal de historias médicas, particularmente a Merlys Aguilera, Noris Hortelano y Silvia Moucot por toda su colaboración y paciencia durante la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Aponte M. Guía para el cáncer de mama en Venezuela. ISBN: 978-980-7773-00-3, Caracas, Venezuela. 2015, p. 34.
- 2) Carey L, Dees E, Sawyer L, Gatti L, Moore D, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2329-2334.
- 3) Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans W. Molecular classification of breast cancer: limitation and potential. *Oncologist* 2006; 11: 868-877.
- 4) Perou C, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-752.
- 5) Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869-10874.
- 6) Zepeda E, Recino E, Cuéllar M, Robles C, Maafs E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cirugía y Cirujanos* 2008; 76:87-93.
- 7) Goldhirsch A, Winer E, Coates A. 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. *Annals of Oncology* 2013;24(9):1-18.
- 8) Quintela D, López J, Senra A. La proteína p53 y el cáncer de mama. Revisión crítica *Rev Senología y Patol Mam* 2001; 14(2): 71-77.
- 9) Requena J, Palomo M, Baena J, Córdoba J, Alonso E, Escolar A, Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el cáncer de mama *REV ESP PATOL* 2002; Vol 35, n.º 3: 315- 324.
- 10) Uribe J, Hernández C, Menolascino F, Rodríguez J, Istúriz L, Márquez M. Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Rev Venez Oncol* 2010; 22:109-116.
- 11) Wright S. Immunotherapy of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12:479-490.
- 12) Ross J, Fletcher J. The Her-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998; 3:237-252.
- 13) López J, López O, Lopez A, Focos de atención en la prevención del cáncer de mama en Venezuela. *Comunidad y Salud* 2016; 14 (2), Jul-Dic.
- 14) Yersal O, Barutca S. *Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications* **World J Clin Oncol** 2014 August 10; 5(3): 412-424.

- 15) Rebolledo V, Ferri N, Reigosa A. Perfil Inmunohistoquímico y la Caracterización Molecular del Carcinoma de Mama en una Población Venezolana. *Rev Venez Oncol* 2012;24(1):42-51.
- 16) Uribe J, Hernández C, Menolascino F. Clasificación Molecular del Cáncer de Mama y su Correlación Clínica. *Rev Venez Oncol* 2010;22(2):109-116.
- 17) Coates A, Winer E, Goldhirsch A, Gelber R, Gnant M, Piccart M, & Panel Members Annals of Oncology. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 00:114,2015doi:10.1093/annonc/mdv221.
- 18) Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete M, Fonfach C. Clasificación molecular del cáncer de mama *Cuad. Cir.* 2011;25:67-74.
- 19) Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi O. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1109-1114.
- 20) Kastan M, Onyekwere O, Sidransky D. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11.
- 21) Lane D. p53, Guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6