

ARTICOLE ORIGINALE

CARCINOMUL MAMAR LOBULAR INVAZIV: ARE COMPONENTĂ CELULARĂ OMOGENĂ?

Veaceslav Fulga^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,Lucian Rudico^{1,2} – asistent,Oxana Mazuru² – cercet. șt.,Valeriu David^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,Vitalie Mazuru¹ – dr. șt. med, asistent,Lilian Șaptefrați¹ – conf. univ., dr. hab. șt. med.,¹Catedra de histologie, citologie și embriologie, ²Laboratorul de morfologie,
IP USMF „Nicolae Testemițanu”tel.: +373-22-205-229, vmfulga@usmf.md

Rezumat

În pofida multiplelor realizări, rata înaltă a mortalității plasează carcinomul mamar în topul afecțiunilor maligne. Scopul acestui studiu a fost determinarea profilului molecular al carcinomului lobular invaziv prin interpretarea expresiei markerilor imunohistochimici surogați. Material și metode: tumori primare, netratate specific pre-operator a 18 paciente, diagnosticate morfologic drept carcinom mamar lobular invaziv. Prin metoda imunohistochimică a fost studiată expresia receptorilor pentru estrogen (ER), progesteron (PR), factorul de creștere uman epidermal (HER)-2, citokeratinei bazale CK5 și proteina nucleară Ki67. Rezultate: carcinomul lobular invaziv prezintă preponderent grad moderat (6 cazuri/33.33%) și scăzut (10 cazuri/55.56%) de diferențiere. Majoritatea cazurilor prezintă fenotip molecular Luminal, hormon-dependent (14 cazuri/77.78%), în care cea mai înaltă rată atinge subtipul Luminal B. Concluzii: carcinomul lobular invaziv este neomogen după componența celulară. După structura profilului molecular acest carcinom manifestă preponderent proprietăți specifice grupului Luminal, hormon-dependent.

Cuvinte-cheie: carcinom mamar lobular, subtipuri moleculare**Summary. Invasive lobular breast carcinoma: does it have a homogenous cell structure?**

Despite of multiple advances in histopathology, the incidence of breast cancer remains very high. Aim: to establish the molecular profile of lobular invasive breast carcinoma based on surrogate markers. Material and methods: primary tumors of 18 patients were immunostained for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor (HER)-2, basal cytokeratin CK5 and nuclear protein Ki67. Results: lobular invasive carcinoma has preponderantly moderate (6 cases/33.33%) and low grade (10 cases/55.56%) of differentiation. The majority of cases showed a hormone-dependent Luminal molecular phenotype (14 cases/77.78%), where Luminal B had the highest rate. Conclusions: lobular invasive breast carcinoma is heterogeneous by cell structure. Molecular profile most often determined in this type of cancer belongs to Luminal group, hormone-dependent.

Key words: breast lobular carcinoma, molecular subtypes**Резюме. Имеет ли инфильтрирующий рак молочной железы однородный клеточный состав?**

Вопреки многочисленным исследованиям рак молочной железы остается главной причиной смертности в структуре онкологических заболеваний у женщин. Цель исследования: определение молекулярного профиля долькового инвазивного рака молочной железы путем изучения экспрессии иммуногистохимических маркеров. Материалы и методы: первичные опухоли 18 пациенток, неподверженных химио/радиотерапии. Во всех случаях был диагностирован дольковый инфильтрирующий рак. Иммуногистохимическим методом было изучена экспрессия рецепторов для эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста человека-2 (Her2), базальный цитокератин CK5 и ядерный белок Ki67. Результаты: в большинстве случаев дольковый инвазивный рак имеет умеренную (6 случаев/33.33%) и низкую степень дифференциации (10 случаев /55.56%), с преобладанием Люминального В, гормон-зависимого молекулярного фенотипа (14 случаев /77.78%). Выводы: дольковый инвазивный рак неоднороден по клеточному составу. В большинстве случаев определяется молекулярный фенотип свойственный гормон-зависимой, Люминальной группе.

Ключевые слова: дольковый рак, молекулярные подтипы

Introducere. Implementarea programelor de screening şi profilaxie, precum şi a noilor scheme de tratament a micşorat mortalitatea cauzată de cancerul mamar. Însă rata înaltă a mortalităţii şi morbidităţii plasează acest tip de carcinom în topul afecţiunilor maligne. O explicaţie plauzibilă a fost considerată absenţa unei descrieri detaliate complexe privitor la eterogenitatea biologică a carcinomului mamar prin prisma evaluării combinate a alteraţiilor moleculare, compoziţiei celulare şi sensibilităţii la tratament. Carcinomul mamar posedă multiple expresii morfologice, diversificate în subtipuri după gradul histologic şi expresia receptorilor, ceea ce presupune după Weigelt şi coaut. etiologia diferită a acestor entităţi [1]. Dat fiind faptul, că modelul histologic are utilizare prognostică limitată şi este absolut lipsit de valoare predictivă, schiţarea “portretului” molecular al tumorii devenise o necesitate stringentă a contemporaneităţii. Procedeele moleculare au evidenţiat iniţial profilul genetic diferit, susţinut apoi şi de neomogenitatea receptorilor exprasaţi în cadrul aceluiaşi tip histologic [2]. Majoritatea lucrărilor de specialitate însă sunt consacrate tipului ductal invaziv, graţie frecvenţei înalte în structura morbidităţii (cca 80%). Particularităţile histologice ale carcinomului lobular invaziv sunt bine definite, însă datele privitor la profilul molecular al acestuia sunt contradictorii.

Astfel scopul acestei lucrări a fost în determinarea profilului molecular al carcinomului lobular invaziv în baza procedeelor imunohistochemice de evaluare a receptorilor pentru estrogen (ER), progesteron (PR), factorul uman de creştere epidermală 2 (Her2), a markerului nuclear de proliferare Ki67 şi citokeratinei bazale CK5.

Material şi metode

Pacienţi. În calitate de material de studiu au servit tumorile mamare a 18 paciente, cu vârsta cuprinsă între 45-78 de ani. În toate cazurile selectate s-a diagnosticat carcinom mamar lobular invaziv în stadii clinice avansate. Toate pacientele au fost supuse mastectomiei radicale, fără chimio-/radioterapie antecedentă. Materialul biologic a fost colectat pe parcursul anilor 2012-2013 de la IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova.

Procesarea tisulară. Materialul biologic a fost fixat în formalină neutră tamponată 10% şi ulterior inclus în parafină (Paraplast High Melt, Leica Biosystems). Studiul a inclus 5 markeri imunohistochemici: pentru ER (Er/6F11), PR (Pr16), factorul de creştere uman epidermal-2 (HER2 /polyclonal), markerul proliferării celulare Ki67 (Ki67/K2), citokeratina bazală CK5 (CK5/ XM26). Lamele au fost procesate automat utilizând Leica Bond-Max autostainer (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). În calita-

te de sisteme de demascare am folosit Bond Epitope Retrieval Solution 1, 2 (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) şi Dako Target Retrieval Solution, pH6 (Dako, Denmark). Pentru vizualizare în cazul markerului Her2 am utilizat sistemul EnVision-HER (Dako), în restul cazurilor sistemul Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems). Pentru contracolorarea nucleelor a fost folosită hematoxilina modificată după Harris (HHS32, SigmaAldrich).

Evaluarea microscopică. Receptorii pentru estrogen şi progesteron au fost cuantificaţi în funcţie de procentul celulelor pozitive la cel puţin 1000 celule tumorale în 10 câmpuri de vedere, urmând ghidul propus de Allred şi coaut [3]. Cazurile evaluate cu +1 - +3 au fost considerate pozitive. Pragul minim acceptat pentru interpretarea pozitivă a reacţiei a fost de 10%.

Pentru evaluarea markerului HER2 a fost utilizat sistemul LeicaBond Oracle HER2 IHC System (LeicaBiosystem). Statutul HER2 a fost interpretat în conformitate cu recomandările Societăţii Americane de Oncologie Clinică [4], precum: 0 – expresie slabă sau absentă, cu patern membranar abia perceptibil până la 10% din celule; +1 – în cazurile cu expresie membranară slabă a mai mult de 10% celule; +2 – în cazurile cu colorare membranară de intensitate slabă/moderată, circumferenţiară a mai mult de 10% celule sau expresie circumferenţiară intensă a mai puţin de 10% celule tumorale; +3 – în cazul expresiei membranare intense detectată la mai mult de 10% din celulele tumorale. Cazurile interpretate cu +2 şi +3 au fost considerate pozitive.

Markerul Ki67 a fost cuantificat în baza metodei propusă de Suci şi coaut. [5]. Pragul de 14% a fost folosit drept barem al pozitivităţii.

Citokeratina CK5 a fost interpretată în conformitate cu recomandările lui Azoulay şi coaut.: 0 – lipsa expresiei; +1 – colorarea a mai puţin de 10% din celulele tumorale; +2 – 10-50% celule tumorale pozitiv colorate; +3 – mai mult de 50% din celule colorate [6]. Cazurile identificate cu +1 şi +3 au fost considerate pozitive.

Urmând recomandările lui Goldhirsch şi coaut. [7], subtipurile moleculare au fost identificate după cum urmează: ER⁺ şi/sau PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67<14% drept Luminal A; ER⁺ şi/sau PR⁺, HER2⁺, CK5⁻ Luminal B/HER2; ER⁺ şi/sau PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67>14% Luminal B/Ki67; ER⁺ şi/sau PR⁺, HER2⁺, CK5⁻, Ki67>14% Luminal B/HER2/Ki67; ER⁻, PR⁻, HER2⁺, CK5⁻ ca HER2-supraexprimat; ER⁻, PR⁻, HER2⁻ şi CK5⁺ denumit ca Basal-like; ER⁻, PR⁻, HER2⁻ şi CK5⁻ ca 5-NP (sau subtip 5 negativ).

Achiziţionarea imaginilor şi analiza statistică. Interpretarea histologică a fost efectuată folosind Ni-

kon Eclipse 80i microscop înzestrat cu camera Nikon DS-Fi1 și soft-ul de imagini Nis-elements BR 2.30 (Nikon Instruments Europe BV). Pentru interpretarea statistică și corelarea rezultatelor, a fost aplicat soft-ul WinStat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Valoarea $p \leq 0.05$ a fost considerată statistic semnificativă pentru toate rezultatele.

Aspecte etice. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova (numărul de omologare 21/13 din 31.03.2014).

Rezultate. În acest studiu majoritatea tumorilor au prezentat un grad de diferențiere celulară G3 (10 cazuri/55.56%), urmat în descrescere de cazuri cu grad G2 (6 cazuri/33.33%) și G1 (2 cazuri/11.11%).

Receptorii hormoni pentru ER și PR au concordat în ceea ce privește frecvența expresiei, fiind evaluați pozitiv în 14 cazuri similare (77.78%).

Markerul Her2 a fost evaluat pozitiv în 3 cazuri (16.67%), iar citokeratina bazală CK5 în 2 cazuri/11.11%. În 10 cazuri (55.56%) tumorile au fost considerate drept slab proliferante, iar în 8 cazuri/44.44% indicele de proliferare Ki67 a fost mai mare de 14%. În structura subtipurilor moleculare a dominat grupul Luminal (Tabelul 1).

Subtipurile moleculare au corelat statistic semnificativ cu receptorii pentru ER, PR, Her2 și gradul histologic (Tabelul 2).

Tabelul 1

Frecvența subtipurilor moleculare în carcinomul mamar lobular invaziv

Grupul	Subtip	Nr	%
Bazal, hormon-independent	5NP	1	5,56
	BasalLike	1	5,56
	Her2	2	11,11
Luminal, hormon-dependent	Luminal A	5	27,78
	Luminal B/Her2/Ki67	1	5,56
	Luminal B/Ki67	8	44,44
Total		18	100

Discuții. Definirea progresiei tumorale în cazul cancerului de sân n-a fost posibilă timp îndelungat datorită lipsei markerilor ce ar delimita clar hiperplaziile tipică și atipică de o tumoră malignă. Carcinomul mamar a fost clasificat în subgrupe având la bază tipul și gradul histologic [8]. Această tumoră posedă multiple expresii morfologice, diversificate în subtipuri după gradul histologic și expresia receptorilor, ceea ce presupune după Weigelt și coaut. etiologia diferită a acestor entități [1]. Inițial prin termenii de carcinom ductal și lobular s-a subînțeles histogeneza sau punctul de origine al tumorii în sistemul alveolar-ductal mamar. Ipoteza potrivit căreia tipurile morfologice de cancer mamar au drept sursă domenii microanatomice distincte ale glandei mamare a fost contestată de Wellings și coaut., care a demonstrat că vasta majoritate a cancerelor de sân invazive, precum

Tabelul 2

Markerii surogați raportați la subtipul molecular și gradul histologic de diferențiere. Corelație după Spearman

Marker		ER	PR	Her2	Ki67	CK5	Grad	Subtip
ER	r		0,776	-0,240	0,539	-0,411	0,149	0,509
	p		0,000	0,169	0,010	0,045	0,277	0,015
PR	r	0,776		-0,145	0,514	-0,074	0,086	0,431
	p	0,000		0,282	0,015	0,385	0,368	0,037
Her2	r	-0,240	-0,145		-0,102	-0,188	-0,026	-0,472
	p	0,169	0,282		0,343	0,228	0,460	0,024
Ki67	r	0,539	0,514	-0,102		-0,375	0,566	-0,064
	p	0,010	0,015	0,343		0,063	0,007	0,400
CK5	r	-0,411	-0,074	-0,188	-0,375		0,000	-0,036
	p	0,045	0,385	0,228	0,063		0,500	0,443
Grad	r	0,149	0,086	-0,026	0,566	0,000		-0,393
	p	0,277	0,368	0,460	0,007	0,500		0,053
Subtip	r	0,509	0,431	-0,472	-0,064	-0,036	-0,393	
	p	0,015	0,037	0,024	0,400	0,443	0,053	

ER – receptor pentru estrogen; PR – receptor pentru progesteron; HER2 – receptorul factorului de creștere uman epidermal 2; Ki67 – marker de proliferare; CK5 – citokeratina bazală; Subtip – subtip molecular; Grad – grad histologic de diferențiere; r – coeficient de corelație. Valorile statistic semnificative sunt indicate cu bold.

și precursorii “in situ” au origine în aceeași unitate terminală ductal-lobulară, indiferent de tipul histologic [9]. Deși, determinarea tipului histologic este recomandată de multiple consilii de specialitate, există date care susțin, că diferențierea tipului invaziv în ductal și lobular nu are nici o valoare clinică [10].

Gradul histologic este o evaluare a gradului de diferențiere (formarea de structuri tubulare, pleomorfismul nuclear) și activității proliferative (indicele mitotic) a tumorii, de fapt considerat de mulți un indice al agresivității carcinomului [11]. Gradarea histologică s-a stabilit a avea o valoare prognostică, pacienții cu gradul G1 având o rată de supraviețuire mult mai mare comparativ cu G2 și G3. Astfel rata medie de supraviețuire de 10 ani pentru G1 este de cca 45%, G2-27%, G3-18%. În studiul nostru majoritatea cazurilor au fost evaluate cu grad G2 și G3 (16 cazuri/88.89%), ceea ce confirmă caracterul agresiv al carcinomului lobular și presupune un pronostic rezervat. Însă eficiența utilizării gradării histologice este în mare măsură (28%) limitată de experiența morfopatologului.

În raport cu statutul hormonal, carcinomul lobular, este cel mai frecvent considerat hormon-dependent (ER⁺/PR⁺), deși sunt date care semnalează o posibilă expresie a citokeratinelor bazale CK5/6 de către tumorile în cauză [12]. Aceste rezultate corespund cu datele studiului nostru, în care 14 cazuri/77.78% au fost considerate hormon-pozitive. Totodată existența a 4 cazuri/22.22% hormon-negative pledează pentru neomogenitatea celulară a acestui carcinom.

Concluzii: carcinomul lobular invaziv este neomogen după componența celulară. După structura profilului molecular acest carcinom manifestă preponderent proprietăți specifice grupului Luminal, hormon-dependent.

Bibliografie

1. Weigelt B., Geyer F.C., Natrajan R., Lopez-Garcia M.A., Ahmad A.S., Savage, K., Kreike B., Reis-Filho J.S., *The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype matched invasive ductal carcinomas of no special type.* J. Pathol., 2010; 220:45-57.
2. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lonning P.E., Borresen-Dale A.L.,

Brown P.O., Botstein D., *Molecular portraits of human breast tumours.* Nature, 2000; 406:747-52.

3. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.* Mod. Pathol., 1998; 11:155-168.

4. Wolff A.C., Hammond M.E., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H., Allred D.C., Bartlett J.M., Bilous M., Fitzgibbons P., Hanna W., Jenkins R.B., Mangu P.B., Paik S., Perez E.A., Press M.F., Spears P.A., Vance G.H., Viale G., Hayes D.F., American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists, *Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update.*, J. Clin. Oncol., 2013; 31(31): 3997-4013.

5. Suciu C., Muresan A.M., Cornea R., Suciu O., Dema A., Raica M., *Semiautomated evaluation of Ki67 index in invasive ductal carcinoma of the breast.* Oncol. Lett., 2014; 7:107-114.

6. Azoulay S., Laé M., Fréneaux P., Merle S., Al Ghuzlan A., Chnecker C., Rosty C., Klijanienko J., Sigal-Zafrani B., Salmon R., Fourquet A., Sastre-Garau X., Vincent-Salomon A., *KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome.* Mod. Pathol., 2015; 18:1623-31.

7. Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J., Panel members., *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.* Ann. Oncol., 2013; 24(9):2206-23.

8. Malhotra G.K., Zhao X., Band H., Band V., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.* Cancer. Biol. Ther., 2010; 10(10):955 –960.

9. Wellings S.R., Jensen H.M., *On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast.* J. Natl. Cancer Inst., 1973; 50:1111–1118.

10. Sinha P.S., Bendall S., Bates T., *Does routine grading of invasive lobular cancer of the breast have the same prognostic significance as for ductal cancers?* Eur. J. Surg. Oncol., 2000; 26:733-737.

11. Lester S.C., Bose S., Chen Y.Y., Connolly J.L., de Baca M.E., Fitzgibbons P.L., *Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast.* Arch. Pathol. Lab. Med., 2009; 133:1515-38.

12. Fritz P., Klenk S., Goletz S., Gerteis A., Simon W., Brinkmann F., Heidemann E., Lüttgen E., Ott G., Alschner M.D., Schwab M., Dippon J., *Clinical Impacts of Histological Subtyping Primary Breast Cancer.* Anticancer. Res., 2010; 30(12):5137-44.