

SUBTIPURILE MOLECULARE DEZVOLTATE DE CARCINOMUL MAMAR LOBULAR INVAZIV

Fulga Veaceslav^{1,2}, Carpenco Ecaterina^{1,2}, David Valeriu², Șaptefrați Lilian¹

¹Catedra de histologie, citologie și embriologie, IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova;

²Laboratorul de morfologie, IP Universitatea de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova
vmfulga@usmf.md

Abstract

MOLECULAR SUBTYPES DEVELOPED BY LOBULAR INVAZIVE BREAST CANCER

Background: Invasive lobular (ILC) and ductal (IDC) carcinoma are the two main histological subtypes of breast cancer. ILC are typically of low histological grade and mitotic index. It expresses estrogen and progesterone receptors (ER and PR) and rarely shows HER2 protein overexpression or amplification. These features suggest a good prognosis, yet some studies show that long-term outcomes of ILC are inferior to stage-matched IDC. Different molecular profiles developed by these two types of carcinoma, suggests different subtypes, which could have different outcomes. The aim of present study was the establishment of molecular subtypes developed by invasive lobular carcinomas.

Material and methods: there were examined primary tumors of 18 patients with lobular invasive carcinoma, using conventional histological and immunohistochemical techniques. By Leica Bond-Max (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer we determined the expression of ER, PR, HER2, CK5 and Ki67 receptors, which have been clustered into molecular subtypes in accordance with StGallen, 2013 recommendations.

Results: ILC developed Luminal subtypes in 14 cases/77,8%. Luminal B/Ki67 subtype was determined in 8 cases/44,4%, Luminal A in 5 cases/27,8% and single tumors showed Luminal B/HER2, 5NP and Basal-like characteristics. Two tumors were described as HER2 positive.

Conclusions: Luminal B/Ki67 subtype is the most frequent profile developed by invasive lobular carcinoma. These findings suggest high aggressivity and bad prognosis.

Key words: lobular breast carcinoma, immunohistochemistry, molecular subtypes.

Actualitatea. Tumorile invazive clasice de glandă mamară, cel mai frecvent diagnosticate și studiate în oncologie sunt carcinomul invaziv ductal (50-80%) de tip NST (no special type) și lobular (ILC) (5-15%) [1, 2].

Tumorile lobulare dezvoltă frecvent reacții desmoplazice severe și sunt caracterizate morfologic prin celule mici, discohesive, deseori aranjate într-un "șir indian", ce pot prezenta ocazional o vacuolă de mucus perinuclear. Comparativ cu carcinomul de tip NST, ILC este diagnosticat mai greu prin tehnici de rutină, cum ar fi mamografia. Astfel, afecțiunile neoplazice lobulare sunt mai frecvent întâlnite la persoane în vârstă și din păcate în stadii clinice avansate. Aceste entități nozologice au la bază terapia personalizată contemporană, care combină frecvent tratamentul hormonal și chimioterapia atât pentru tumori NST, cât și ILC. Totuși, ultimele reacționează mai slab la tamoxifen și tratamentul neoadjuvant. Mai mult, metastazele dezvoltate de ILC posedă afinitate pentru ovare și tractul gastro-intestinal, spre deosebire de tumorile NST care manifestă tropism pentru ficat, oase și creier. Studiile în domeniu au relatat că, tumorile în cauză se deosebesc și după profilul molecular [3]. Astfel majoritatea ILC nu expresează E-cadherina, relativ rar (cca 10%) prezintă HER2, și mai frecvent ca tumorile NST sunt estrogen și progesteron pozitive.

Cele relatate indică că între tumorile de tip NST și ILC sunt deosebiri morfologice, genetice, iar profilul molecular diferit sugerează că și subtipurile generate de aceste tumori ar putea fi diferite. Studiile în domeniu ar facilita rafinarea și ajustarea tratamentului personalizat. Scopul prezentei lucrări a constat în determinarea subtipurilor moleculare dezvoltate de carcinoamele mamare invazive lobulare. Drept urmare am determinat că, profilul molecular caracteristic ILC este Luminal B/Ki67, ceea ce presupune agresivitate înaltă și un pronostic nefavorabil pentru pacient.

Material și metode. În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumora primară) prelevat postoperatoriu în incinta IMSP Institutul Oncologic din RM pe parcursul anilor 2013-2014 de la 18 paciente cu vârsta cuprinsă între 33-86 ani. Au fost selectate cazurile diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip lobular, fără chimio- sau radioterapie premergătoare. Țesăturile prel-

evate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4. Materialul a fost inclus în *Paraplast High Melt* (Leica Biosystems). Secțiunile seriate (realizate cu microtomul *Shandon, HM355S Automatic Microtome*, Thermo Scientific, USA) cu grosimea de 3-5 microni au fost etalate pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark). Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică, cu hematoxină-eozină utilizând hematoxină *Harris* (HHS32, SigmaAldrich) și eozină *CS701* (Dako, Denmark). Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat automat, utilizând *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer: deparafinarea în 2 băi de *Bond Dewax Solution* (cod AR9222) a 5 minute fiecare, urmată de 3 băi în alcool de 100%, 90% și 70% de 2 minute fiecare, finisate cu rehidratare de 5 minute în apă. Pentru blocarea activității peroxidazei endogene secțiunile au fost tratate timp de 5 minute cu Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, ScyTek Laboratories, Inc.). Ulterior piesele histologice au fost deshidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xylen și montate. Pentru montarea pieselor am folosit soluția *Leica CV Mount* (Leica Biosystems, cod 14046430011). În studiu au fost utilizați anticorpii: Er/6F11 (cod PA0151), Pr/16 (cod PA0312), HER2/Polyclonal rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein (cod A0485), Ki67/K2 (cod PA0230), CK5/XM26 (cod PA0468), 3 sisteme de demascare (Bond Epitope Retrieval Solution 1, 2 (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min/RTU, Dako EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH/20 min/97 °C) și un sistem de vizualizare (Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min/RTU).

Cuantificarea celulelor marcate cu ER, PR și Ki67 s-a efectuat în baza metodei propuse de Suciuc et al. [4]. Evaluarea numerică a markerilor hormonalni pentru ER și PR s-a finalizat prin calcularea scorului Allred [5]. Procedeele imune pentru HER2 au fost efectuate automat cu LeicaBond Oracle Her2 IHC System (LeicaBiosystem). Statusul HER2 a fost interpretat în baza recomandărilor Societății Americane a Oncologilor Cliniciști (ASCO) [6].

La clasificarea subtipurilor moleculare s-au luat în considerație recomandările lui Goldhirsch et al. (2013), delimitând următoarele entități nozologice: Luminal A, Luminal B, HER2 pozitiv, Basal-like și 5NP (cu fenotip 5 negativ) [7].

Rezultatele studiului au fost stocate și grupate în baza de date MS Access 2007 (Microsoft Office 2007). Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului Winstat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Pentru evidențierea gradului de asociere dintre valorile markerilor utilizați în studiu am efectuat teste de corelație a rangurilor (coeficient Spearman (r_s)). Pentru separarea cazurilor după activitatea proliferativă, marcată (>14) sau redusă (<14) am utilizat pragul de 14 celule tumorale Ki67 pozitive. Pentru toate procedeele statistice valoarea de prag pentru rezultatele semnificativ statistice a fost stabilită la un $p < 0,05$.

Rezultate și discuții. În studiul de față carcinoamele lobulare cel mai frecvent au dezvoltat profiluri moleculare de tip Luminal – 14 cazuri/77,8%. Stratificarea acestor cazuri a pus în evidență că tumorile lobulare cel mai frecvent dezvoltă caracteristici moleculare de tip Luminal B (9 cazuri/50%), dintre care subtipurile Luminal B/Ki67 a constituit majoritatea (8 cazuri/44,4%). Subtipul Luminal A a fost determinat în 5 cazuri/27,8%, iar tumorile Luminal B/HER2, Basal-like, 5NP au fost determinate în cazuri unitare. Profilul HER2 a fost pus în evidență în 2 cazuri.

Eseul statistic a pus în evidență corelații pozitive, credibile dintre subtipul molecular al tumorii și valorile expresiei ER ($r_s = 0,51$, $p = 0,015$), PR ($r_s = 0,43$, $p = 0,037$). Aceasta presupune că, odată cu diferențierea Luminală a carcinomului, celulele tumorale preferă să expreseze ER și PR, totodată tind să piardă HER2 ($r_s = -0,47$, $p = 0,024$) și dezvoltă un grad histologic slab de diferențiere ($r_s = -0,39$, $p = 0,053$).

Vârsta medie a pacientelor care au dezvoltat tumori Luminale A a constituit $55,8 \pm 3,2$ ani. Aceste tumori au evoluat în exclusivitate cu grad G1 și G2 de diferențiere histologică. În cazul dat tabloul morfologic a fost complementat de rezultatele imunohistochimice, indicele de proliferare Ki67 înregistrat cu mult sub pragul pozitivității ($5,6 \pm 1,7$). Impropru definiției clasice de tumoare Luminal A a fost depistat un singur caz de expresie simultană de rând cu ER, PR și a citokeratinei bazale CK5, ceea ce impune diversificarea acestui subtip drept BasoLuminal.

Subtipul Luminal B a fost descifrat la 9 paciente cu vârsta cuprinsă în limitele 68,8±1,9 ani. Caracteristic acestui subtip ia fost agresivitatea înaltă: 8 din 9 cazuri au fost cuantificate cu grad histologic G3, 1 caz – G2. Aceste date au fost complementate imunohistochimic prin indicele de proliferare Ki67 înalt, statistic înregistrat la cote de 41,8±5,4 și mediana 36. Eseul de corelare a pus în evidență legătura inversă dintre gradul histologic de diferențiere și expresia HER2 ($r_s = -0,75$, $p = 0,01$). Astfel, tumorile Luminale B, odată cu creșterea agresivității tind să piardă receptorul epidermal 2. O altă corelație statistică, dar pozitivă după sens s-a determinat dintre ER și PR ($r_s = 0,75$, $p = 0,01$).

Subtipurile HER2 și Triplu negativ nu au fost descrise statistic din motivul numărului mic de cazuri: unitar pentru 5NP, Basal-like și 2 cazuri HER2.

Carcinomul mamar invaziv lobular prezintă particularități histologice și moleculare distinctive comparativ cu tumorile ductale, cum ar fi absența proteinei de adeziune E-cadherina. O caracteristică importantă a acestei tumori, sunt și recurențele tardive frecvente. Recent, Ciriello et al. (2015) au descris 3 subtipuri moleculare, care conform autorilor sunt caracteristice carcinomului lobular: reactive-like, imun și proliferativ. Aceasta susține afirmația lui Zhu et al. (2019) precum că tumorile lobulare posedă o heterogenitate vădită, care necesită studii adiționale în domeniu [8].

Ipoteza potrivit căreia tipurile morfologice de cancer mamar au drept sursă domenii microanatomice distincte ale glandei mamare a fost contestată de Wellings et al. (1975), care au demonstrat că vasta majoritate a cancerelor invazive de sân, precum și presursorii “in situ”, au origine în unitatea terminală ductal-lobulară, indiferent de tipul histologic [9]. După Visvader J.E. (2009) multitudinea subtipurilor tumorale reflectă atât diverse profiluri mutaționale, cât și originea celulară diferită [10]. Însă în cazul ILC acestea implică combinații comune cu tumorile NST, dar diversifică problemele de diagnostic și tratament prin propriile variații moleculare, genetice, morfologice. Sorlie et al. (2003) au evidențiat valoarea pronostică diferită a fiecărui subtip, totodată punând bazele unui tratament personalizat. Totuși variațiile de profil molecular și subtip dezvoltate de ILC indică necesitatea continuării studiilor în acest domeniu. Implementarea programelor de screening și profilaxie, precum și a noilor scheme de tratament a micșorat mortalitatea cauzată de cancerul mamar. Însă rata actuală a incidenței și mortalității oricum plasează acest tip de cancer în topul afecțiunilor maligne, iar tumorile lobulare sunt lideri ai acestei statistici nefaste.

Concluzii. Carcinomul mamar lobular invaziv manifestă cel mai frecvent un profil molecular caracteristic subtipului Luminal B/Ki67, ceea ce presupune agresivitate înaltă și un pronostic nefavorabil.

Bibliografie:

1. Ellis M.J. et al. Neoadjuvant comparisons of aromatase inhibitors and tamoxifen: Pretreatment determinants of response and on-treatment effect. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003, vol. 86, nr. 3-5, p. 301-307.
2. Li C.I., Uribe D.J., Daling J.R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. In: *Br J Cancer*. 2005, vol. 93, nr. 9, p. 1046-52.
3. Ciriello G. et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. In: *Cell*. 2015, 163, 506–519.
4. Suciu C. et al. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. In: *Oncol Lett*. 2014, vol. 7, nr. 1, p. 107-114.
5. Allred D.C. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. In: *Mod Pathol*. 1998, vol. 11, nr.2, p. 155-168.
6. Wolff A.C. et al. 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. In: *J Clin Oncol*. 2013, vol. 31, nr. 31, p. 3997-4013.
7. Goldhirsch A. et al. Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. In: *J Clin Oncol*. 2003, vol. 21, nr. 17, p. 3357–3365.
8. Zhu Z. et al. Molecular subtypes of invasive lobular breast cancer in the I-SPY2 TRIAL. In: Abstracts: 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 4-8, 2018; San Antonio, Texas, DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS18-PD7-06 Published February 2019.
9. Wellings S.R., Jensen H.M., Marcum R.G. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. In: *J Natl Cancer Inst*. 1975, vol. 55, nr. 2, p. 231-73.
10. Visvader J.E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. In: *Genes Dev*. 2009, vol. 23, nr. 22, p. 2563-77.
11. Sorlie T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; vol. 100, nr. 14, p. 8418-23.