



Identificación de nuevos marcadores citogenéticos con valor pronóstico en cáncer de mama

New cytogenetic prognostic markers in breast cancer

M.I. Zudaire¹, M.D. Otero¹, M.C. Caballero², C. Valenti², J.M. Martínez-Peñuela², M.J. Calasanz¹

1. Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona.

2. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Navarra. Pamplona.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres de los países del mundo occidental. En España, representa el 34% de las neoplasias femeninas, con tasas de incidencia que oscilan entre los 33 y 53 casos por cada 100.000 mujeres¹. En Navarra, el incremento de la incidencia en los últimos quince años ha sido de un 60%, pasando de presentar una tasa de incidencia de 42,2 casos por 100.000 habitantes en el periodo 1980-1984 a 67,7 en el periodo 1990-1994².

A pesar de los factores de riesgo conocidos en cáncer de mama, menos de la mitad de las pacientes no pertenecen a ninguno de los grupos de riesgo³. Ante esta situación, resulta imprescindible la identificación de nuevos marcadores que permitan predecir la evolución de la enfermedad. Rasgos morfológicos como el tamaño tumoral, el grado y la afectación ganglionar son considerados de forma unánime como los principales factores pronósticos en cáncer de mama. Muchos marcadores biológicos como la expresión de los receptores hormonales, Bcl-2, ErbB-2, la acumulación de p53 y otros rasgos como la proliferación celular, fase del ciclo celular, angiogénesis, invasión vascular, contenido en ADN, etc. han sido descritos como posibles factores pronósticos y predictivos⁴. Sin embargo, pocos han sido aceptados en la rutina diagnóstica de los servicios de anatomía patológica, debido a las importantes discrepancias encontradas entre las distintas series publicadas⁵.

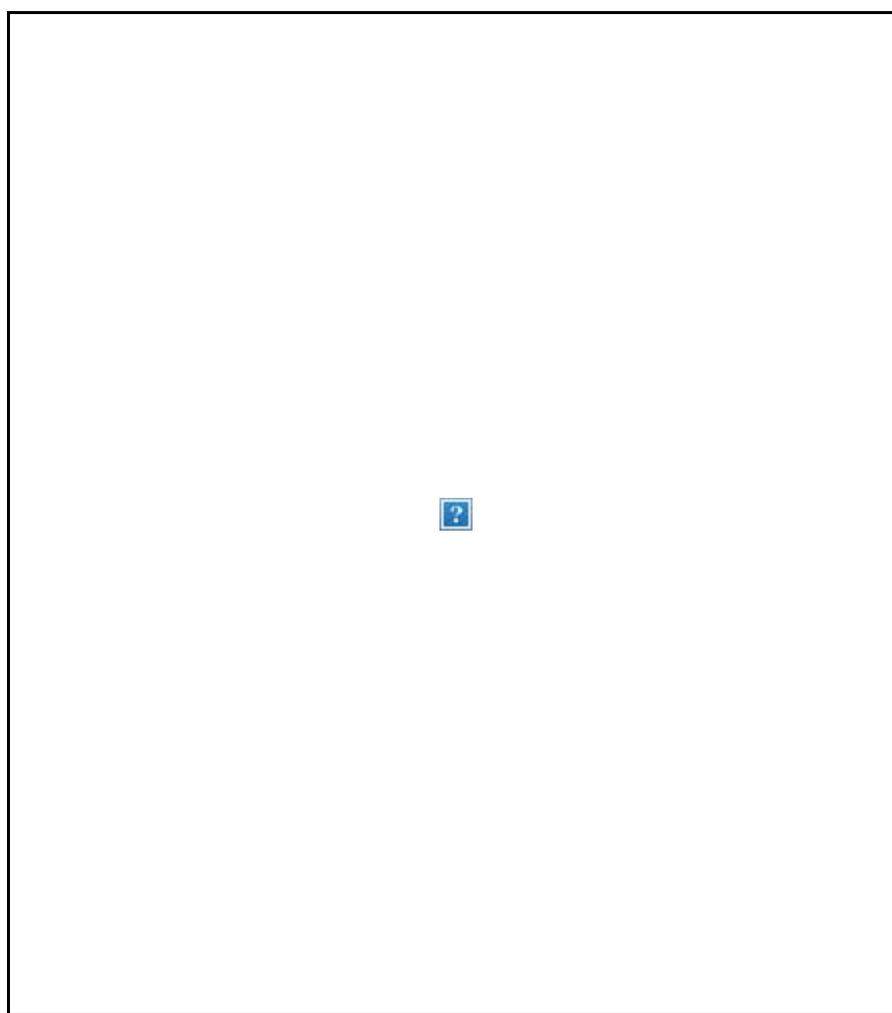
La combinación de marcadores pronósticos convencionales y nuevos marcadores genéticos podría ayudar a la identificación de subgrupos de pacientes con un comportamiento clínico diferente al esperado según los rasgos morfológicos tradicionales.

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de citogenética molecular, como la Hibridación Genómica Comparada (CGH)^{6,7} que están resultando de gran utilidad para el estudio de los tumores sólidos⁸. La CGH es una técnica de cribaje mediante la que se detectan pérdidas y ganancias en todo el genoma en un único experimento de hibridación. Utiliza como material de estudio el DNA extraído del tumor, lo que permite el análisis de tumores sin necesidad del cultivo fresco de las muestras, con la gran ventaja de poder utilizar el material fijado en formol e incluido en parafina. Esto

posibilita la realización de estudios retrospectivos en pacientes cuya evolución clínica se conoce. La descripción de regiones cromosómicas frecuentemente afectadas ha orientado estudios moleculares para la descripción de genes implicados en el desarrollo y progresión de tumores.

MATERIAL Y MÉTODOS

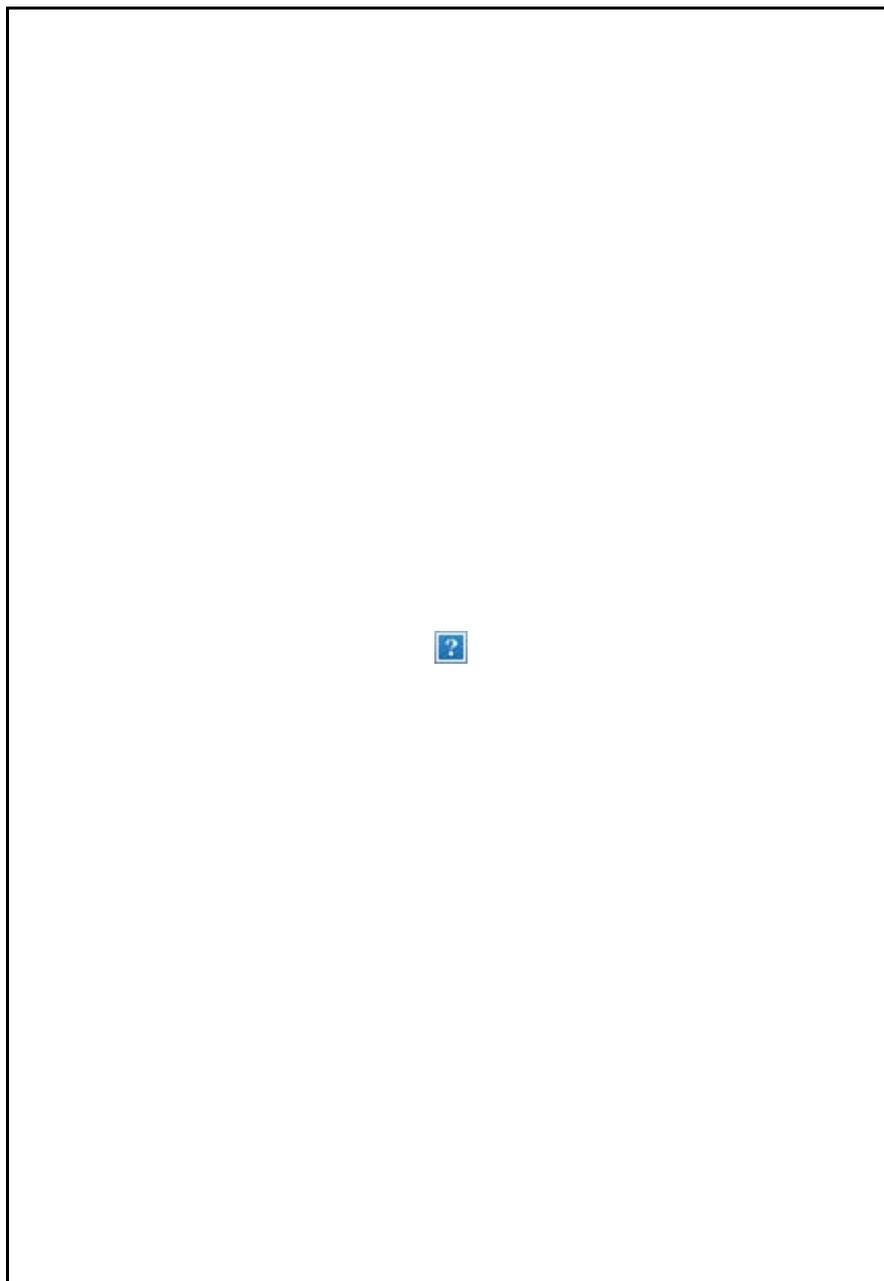
Fueron seleccionados 70 tumores de mama, todos ellos de tipo ductal invasivo, correspondientes a pacientes diagnosticadas en el Hospital de Navarra en el periodo comprendido entre los años 1991 y 1994. A partir de las historias de las pacientes se seleccionaron los rasgos anatomopatológicos de reconocido valor pronóstico como son el tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico, expresión de receptores de estrógenos y progesterona, β cl-2, ErbB-2, acumulación de p53, contenido en ADN y proliferación celular (Ki67). Además se calculó el índice pronóstico de Nottingham (NPI) para cada uno de los tumores (Tabla 1). Se recogieron también los datos clínicos correspondientes a la presencia de metástasis (local, ganglionar o a distancia) y la supervivencia de las pacientes.



Análisis de las muestras mediante CGH

La técnica utilizada para el análisis citogenético fue la CGH. Se llevó a cabo según el protocolo tradicional, con pequeñas modificaciones técnicas condicionadas por el estudio de tejido incluido en parafina⁹. La CGH se basa en el marcaje del ADN en estudio mediante un fluorocromo de emisión verde y de un ADN normal de referencia con un fluorocromo de emisión roja. Mezclados en cantidades equimoleculares, los dos ADN se utilizan como sondas en la hibridación sobre una metafase normal; cuando existe ganancia de material en la muestra test, en un cromosoma (o en parte de él) se detectará en esa zona una mayor intensidad verde; será roja en el caso de la detección de pérdidas. La cuantificación de esa diferencia de intensidades se realiza mediante un

equipo informático que calcula el cociente de intensidades verde/rojo a lo largo de cada cromosoma de la metafase (Fig. 1).



La sensibilidad de la CGH a la hora de detectar ganancias y pérdidas viene condicionada principalmente por la contaminación por células normales; en general se calcula que es necesario una presencia de un 30% de células tumorales para que una alteración pueda ser detectada¹⁰. Por ello, en cada muestra se seleccionó la región más representativa y con mayor componente tumoral. Además, la sensibilidad va a depender del nivel y del tamaño de la región alterada. Un aumento de material en 50% se detecta si la región es de un tamaño de 2Mb o mayor, y una región que está amplificada y tiene un tamaño de 250Kb necesita estar presente en un porcentaje de 400%¹¹. De igual forma, cuando una delección está presente en 100% del ADN se puede alcanzar una resolución de entre 1 a 2 Mb¹². Sin embargo, el límite real de resolución se encuentra entre 10 y 20Mb¹³.

Análisis estadístico

Para la comparación entre el número medio de alteraciones, ganancias y pérdidas detectadas y los factores anatomopatológicos se utilizó el test de t de Student para las variables distribuidas normalmente y el test U de Mann-Whitney para las variables que no seguían una distribución normal. El análisis de más de dos muestras se llevó a cabo

mediante el test de ANOVA de un factor si la variable seguía una distribución normal (previo estudio de la homoscedasticidad de las muestras con el test de Levene), y el test de Kruskal-Wallis para variables no distribuidas normalmente.

La asociación entre la presencia o ausencia de una determinada alteración y los factores anatomopatológicos se estudió mediante el test de contingencia (chi-cuadrado) y prueba exacta de Fisher.

El análisis de supervivencia se realizó utilizando el método de Kaplan-Meier para variables cualitativas y la regresión de Cox univariante para variables cuantitativas.

RESULTADOS

Descripción de las alteraciones citogenéticas obtenidas mediante CGH

Se obtuvieron resultados satisfactorios en 57 de las 70 muestras analizadas (81,4%). Dos de las muestras presentaron cariotipos normales y en el resto se describieron alteraciones que afectaban a todos los cromosomas, exceptuando el cromosoma 21 y el Y.

Se describieron un número medio de 5,81 alteraciones por tumor (DE=0,45; rango 0-15). El número medio de ganancias fue de 3,66 (DE=0,28; rango 0-9) que resultó ser significativamente mayor ($p<0,001$) que el número de pérdidas detectadas (2,18; DE=0,27; rango 0-8).

Las alteraciones citogenéticas descritas en esta serie se representan en la figura 2. Considerando conjuntamente todas las alteraciones descritas en un mismo brazo, las ganancias detectadas con mayor frecuencia afectaron a 8q (63,1%), 17q (45,6%), 1q (38,6%), 20q (26,3%), 11q (21%) y 6q (17,5%) y las pérdidas más frecuentes fueron en 16q (21%), Xp y Xq (19,3%), 13q (17,5%), 11q (15,7%) y 8p (15,7%). En la mayor parte de los cromosomas se detectaron tanto ganancias como pérdidas excepto en 1q, 2, 6p, 10p, 11p, 12p y 20 donde no se detectaron pérdidas de material. Tampoco se detectaron ganancias en 7p, 9p, 16q y 22.



La mayor parte de las alteraciones descritas afectaron a un cromosoma o al brazo completo de un cromosoma, pero también se definieron alteraciones en regiones de menor tamaño. Las más frecuentes fueron las pérdidas detectadas en 11q (afectando a la región 11q21-qter), las ganancias detectadas en 11q (en 11q13), ganancias en 8q (principalmente en la región terminal 8q23-qter), 6q (en distintas regiones comprendidas entre las bandas 6q16 y q24, siendo 6q22-q23 la menor región afectada), 17q (principalmente 17q21-qter, 17q22-qter y 17q23-qter) y ganancias en 14q (con 14q13-q21 como la menor región involucrada en la ganancia de material). En ocasiones, las ganancias o pérdidas afectaron a una sola banda como es el caso de la ganancia en 1p21, 7q11, 11q13 y 12q15.

Marcadores citogenéticos y análisis de supervivencia

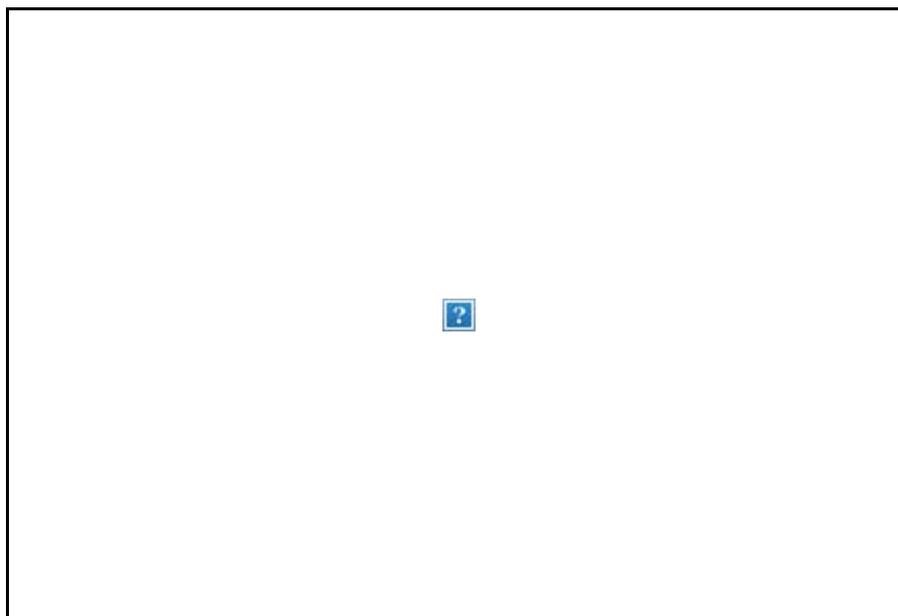
Número de alteraciones y análisis de supervivencia

Se estudió la asociación existente entre el número de alteraciones descritas en los tumores y la supervivencia global (SG) e incidencia de recidivas (IR) de las pacientes. No se detectaron asociaciones significativas para el número de alteraciones, las ganancias o las pérdidas analizadas de forma independiente.

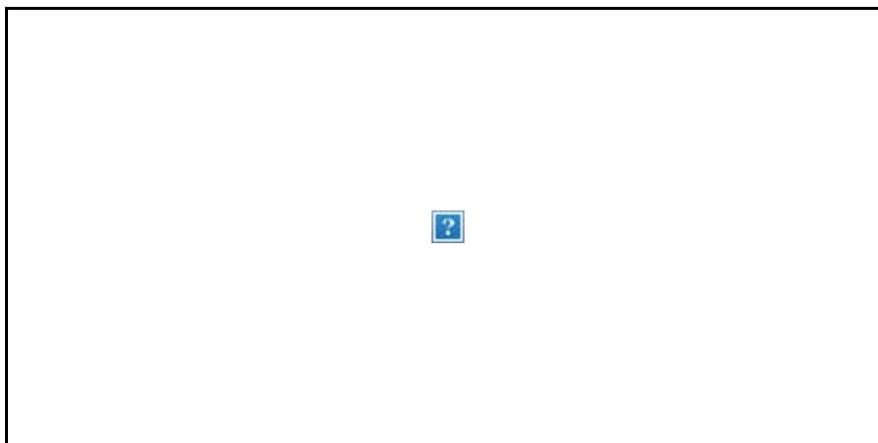
Tipo de alteraciones y análisis de supervivencia

Estudiamos la asociación existente entre la presencia y ausencia de un determinado marcador citogenético y la SG e IR de las pacientes. Sólo se observó una ligera tendencia a mostrar una recidiva más temprana a las pacientes con ganancias en 1q ($p=0,063$) y 11q13 ($p=0,066$) (Tabla 2). Sin alcanzar un valor estadísticamente significativo, se observó que las pacientes cuyos tumores presentaron ganancias en 3q y 12q y pérdidas de 11q, 16q o Xq presentaron una supervivencia global mayor y una incidencia de recidivas menor que en el caso de ausencia de estas alteraciones. Por

ejemplo, las pacientes en cuyos tumores se describieron ganancias en 12q presentaron una supervivencia a los 5 años de 100% frente a un 73,5% en los casos de ausencia de esta alteración. Para el resto de los marcadores, la presencia de las alteraciones se mostró más frecuente en pacientes de peor supervivencia.



Dado el valor pronóstico de la presencia de metástasis en los ganglios axilares estudiamos las posibles asociaciones existentes entre los marcadores citogenéticos descritos y la SG e IR en las pacientes del grupo sin infiltración ganglionar. Las ganancias detectadas en 17q mostraron una tendencia a una menor supervivencia ($p=0,066$). Además, tanto las ganancias en 17q como en 20q se asociaron significativamente a una mayor incidencia de recidivas ($p=0,039$ en ambos casos) (Tabla 2, Fig. 3).



Asociación entre las alteraciones citogenéticas y factores anatomopatológicos

Asociación entre el número de alteraciones citogenéticas descritas y los distintos factores anatomopatológicos

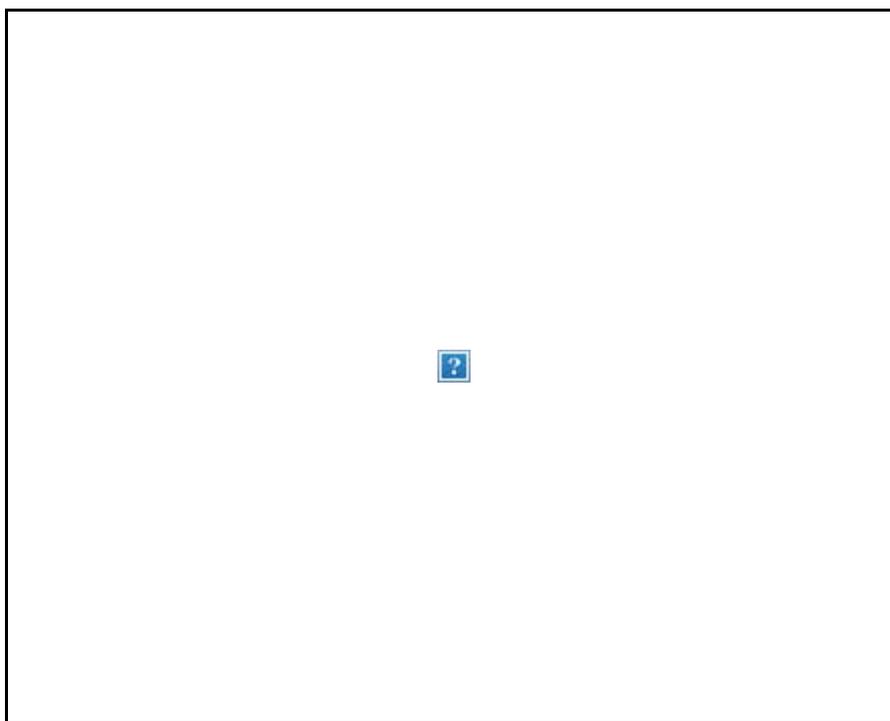
Hemos detectado una tendencia a la asociación entre el número de ganancias y el tamaño tumoral ($p=0,058$), el número de pérdidas y la expresión de los receptores de progesterona ($p=0,083$) y el número, tanto de pérdidas como de ganancias, y la acumulación de proteína p53 ($p=0,070$ y $p=0,059$). No se detectaron asociaciones significativas para el resto de los marcadores.

Asociación entre los distintos tipos de alteraciones citogenéticas y los factores anatomopatológicos

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue la caracterización de alteraciones citogenéticas que puedan contribuir a mejorar el diagnóstico y el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. Así, pudimos detectar una asociación significativa entre la ganancia de material en el brazo largo del cromosoma 1 y el tamaño tumoral ($p=0,041$) de forma que el 95% de los tumores en los que se detectó la ganancia 1q (21/22 casos) son tumores de más de 2 cm.

Con respecto a la afectación ganglionar, las pérdidas en 16q y 11q fueron significativamente más frecuentes en los tumores sin afectación ganglionar ($p=0,025$ y $p=0,040$, respectivamente).

El resto de las asociaciones significativas se presentan en la tabla 3.

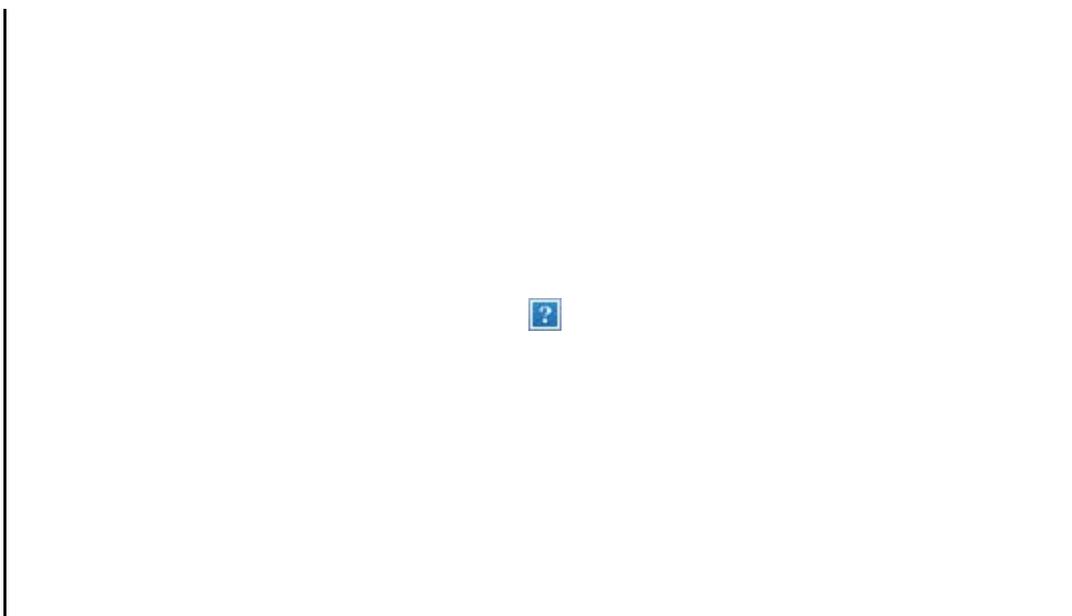


DISCUSIÓN

La mayor parte de los trabajos publicados de CGH en tumores sólidos se han realizado a partir de tejido congelado¹⁴. Sin embargo, dado que la fijación e inclusión en parafina ha sido hasta la fecha el principal método de conservación de las muestras en los servicios de anatomía patológica, los estudios retrospectivos se ven condicionados a la utilización de este tipo de material. La fijación e inclusión en parafina de las muestras provoca la fragmentación del ADN y establece fuertes uniones ADN-proteínas¹⁵ que dificultan las reacciones de marcaje en los ensayos de CGH¹⁴. En estas condiciones la sensibilidad en la detección de alteraciones cromosómicas es menor que en el caso de tejidos congelados.

Mientras que el porcentaje de éxito en los análisis de tejidos frescos y congelados mediante CGH oscila entre 70 y 90%¹⁶, en el caso de los tejidos parafinados, el porcentaje esperado es menor. Sin embargo, pequeñas modificaciones técnicas en el proceso de extracción y marcaje del ADN obtenido de parafina, permiten obtener resultados satisfactorios con este tipo de material. En nuestro trabajo conseguimos analizar el 81,4% de los casos.

La sensibilidad alcanzada en la detección de alteraciones en nuestra serie ha sido muy similar a la publicada en otras series de carcinomas ductales infiltrantes (Tabla 4).



Sin embargo, cabe destacar la detección de dos alteraciones en una frecuencia diferente a la publicada en el resto de las series: las ganancias en 6q y 14q. Las ganancias en 6q son detectadas habitualmente con menor frecuencia que las pérdidas en el mismo brazo. Sin embargo, en nuestra serie detectamos un mayor número de ganancias afectando principalmente a la región 6q16-q24 (con 6q22-q23 como la mínima región involucrada). Solamente Hermsen y col¹⁷ y Kuukasjarvi y col¹⁸ han detectado ganancias afectando a las mismas bandas, siendo más frecuentes en tumores aneuploides y de mal pronóstico. En 6q22-q23 se localiza el gen *c-MYB*, un factor de transcripción que ya ha sido descrito amplificado en otras series¹⁹⁻²¹. Las ganancias afectando a 14q11-q24 apenas han sido descritas en cáncer de mama. En un trabajo reciente en líneas celulares de mama, utilizando la técnica de los microarrays de ADN, se ha señalado el gen *BRF1* como posible gen involucrado²².

Existen varios trabajos publicados en los que se estudian las asociaciones existentes entre las alteraciones citogenéticas descritas mediante la técnica de CGH y los rasgos clínicos y anatomopatológicos en cáncer de mama²³⁻²⁷, pero son pocos los que incluyen un rango tan amplio de posibles marcadores como el nuestro^{17, 28, 29}.

De entre todas las asociaciones descritas entre los marcadores citogenéticos y factores pronósticos, la asociación entre las pérdidas en 16q y el pronóstico de las pacientes ha resultado ser la más importante de la serie. Aunque las pérdidas en 16q no se mostraron significativamente asociadas a la supervivencia y la incidencia de recidivas, las pacientes cuyos tumores presentaron pérdidas en 16q mostraron una supervivencia mayor (83,3% vs 71,4%) y una incidencia menor de recidivas (19,0% vs 33%) que las pacientes que no poseían esa alteración ($p=0,413$ y $p=0,313$, respectivamente). Con respecto a los factores anatomopatológicos estudiados, las pérdidas en el brazo largo de este cromosoma se mostraron significativamente asociadas a tumores sin afectación ganglionar (75% de los tumores con pérdidas en 16q no presentaron afectación ganglionar; $p=0,025$), receptores estrogénicos positivos (el 46,7% de los receptores estrogénicos positivos mostraron pérdidas en 16q; $p<0,001$), y sobreexpresión de *Bcl-2* (todos los tumores con pérdidas en 16q eran positivos para la sobreexpresión de *Bcl-2*; $p=0,014$). Estos tres rasgos han sido considerados indicadores de buen pronóstico en numerosas publicaciones³⁰⁻³³.

Las ganancias en 1q se manifestaron en nuestra serie asociadas a mal pronóstico. Por una parte, las pacientes cuyos tumores presentaban dicha alteración mostraron una mayor incidencia de recidivas que en ausencia de la misma ($p=0,062$). Además, la presencia de este marcador se asoció significativamente con tumores de más de 2 cm

($p=0,041$). Es bien sabido que el tamaño tumoral está en relación directa con la agresividad del tumor. Tumores sin infiltración ganglionar y con un tamaño menor de 2 cm pueden alcanzar una supervivencia de más de 82% a los 10 años y ésta podría disminuir hasta la mitad para tumores de más de 5 cm³. En nuestra serie, el tamaño tumoral mostró una tendencia a la significación tanto con la supervivencia global como la incidencia de recidivas ($p=0,052$ y $p=0,051$), mostrando una supervivencia de 100% para las pacientes con tumores menores de dos centímetros y sólo de 70,4% para las pacientes con tumores mayores.

Uno de los marcadores citogenéticos se mostró significativamente asociado al NPI: las ganancias en 8q ($p=0,02$). Las ganancias en el brazo largo de este cromosoma resultaron ser indicativas de mal pronóstico ya que, mientras que sólo el 30% de las pacientes del grupo de buen pronóstico presentó esa alteración, la frecuencia aumentó hasta el 58,3% en las pacientes con pronóstico moderado y el 81% en las pacientes de mal pronóstico. En los trabajos publicados de CGH en mama las ganancias en 8q siempre se han asociado a fenotipos agresivos y de mal pronóstico. Se ha relacionado con tumores con mayor contenido en ADN y una alta fracción S28, con el grupo de mal pronóstico¹⁷ y asociadas a una mayor incidencia de recidivas en pacientes sin infiltración ganglionar²³. Además se ha detectado con mayor frecuencia en tumores de grado III (68%) que en tumores de grado I (30%)²⁷ y también con mayor frecuencia en tumores aneuploides (70%) que diploides (30%)²⁴. Su asociación a tumores más agresivos se confirma también por su presencia tanto en la lesión in situ, como invasiva y la metástasis del mismo tumor^{25,34}, y por su frecuencia mayor en tumores ductales frente a los lobulillares³⁵.

En nuestra serie, aunque sin llegar a alcanzar valores estadísticamente significativos, la ganancia de 8q mostró el mismo patrón definido en la bibliografía al estar presente en 66% de los tumores aneuploides, frente a 33% de los diploides ($p=0,298$) y en 36% de los tumores sin infiltración ganglionar frente a una frecuencia de 64% en los tumores con ganglios afectados ($p=0,074$).

De especial interés son las asociaciones encontradas entre las ganancias en 17q y 20q y la incidencia de recidivas en las pacientes sin infiltración ganglionar ($p=0,039$) (Tabla 2, Fig. 3). Dos de las pacientes en cuyos tumores se describieron ganancias en 17q recidivaron, mientras que no lo hizo ninguna de las pacientes en cuyos tumores no se detectó ganancias en 17q. De igual forma, en su estudio sobre carcinomas ductales in situ, Buerger y col²⁶ describieron la ganancia en 17q12 asociada a carcinomas de grado moderado y poco diferenciados que pudieran desarrollarse directamente del tejido en proliferación sin pasar por estadios menos agresivos.

El hecho de que, aun observando diferencias importantes en la supervivencia de las pacientes, en función de la presencia o ausencia de una determinada alteración, ésta no se haya manifestado como significativa, puede ser debido principalmente a la elevada supervivencia de las pacientes de esta serie (75% a los 5 años). Esta elevada supervivencia se debe a que un porcentaje importante de las pacientes de este estudio fueron diagnosticadas de cáncer de mama dentro del programa de Detección Precoz del Gobierno de Navarra. Tal y como ha descrito Cabello³⁶, el diagnóstico precoz de una enfermedad puede producir un sesgo en la supervivencia por adelantamiento en el diagnóstico. La ausencia de significación se debe a una ausencia de eventos causada por un periodo insuficiente de seguimiento de las pacientes. Ante esta situación, se prevé completar el estudio de esta serie en los próximos años, de forma que el aumento del tiempo de seguimiento compense el sesgo introducido por el diagnóstico precoz.

En resumen, la técnica de CGH nos ha permitido describir las alteraciones citogenéticas características de los carcinomas ductales invasivos de mama. A pesar de la dificultad del análisis del tejido incluido en parafina, hemos podido confirmar las alteraciones ya

descritas en otras series similares y mostrar además dos nuevas regiones afectadas en cáncer de mama en 6q22-q23 y 14q11-q24. La asociación de los marcadores citogenéticos y los rasgos clínicos de las pacientes ha puesto de manifiesto que la caracterización de determinadas alteraciones como las pérdidas en 16q o las ganancias en 17q podrían ser utilizadas, junto con los rasgos anatomopatológico clásicos, como marcadores de la evolución clínica de las pacientes. Sin embargo, serán necesarios estudios en series mayores que confirmen los resultados obtenidos.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los servicios miembros de la Unidad de mama del Hospital de Navarra su aportación en este trabajo, así como la colaboración de los miembros del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra y de la Universidad de Tampere en Finlandia.

