

# Markeri moleculari utilizați pentru diagnostic, prognostic și terapie în cancerul mamar - review

*Molecular markers to be used for diagnosis, prognosis and target therapy in breast cancer - review*

Ruxandra Stănculescu,  
Vasilica Baușic,  
Cătălin Coroleucă,  
Diana Comandașu,  
Ciprian Coroleucă,  
Elvira Brătilă

Departamentul  
Obstetrică-Ginecologie,  
Universitatea de Medicină  
„Carol Davila”, București,  
România  
Spitalul Clinic de Urgență  
„Sf. Pantelimon”, București

Correspondență:  
Dr. Diana Comandașu  
e-mail: diana.comandasu@  
yahoo.com

## Abstract

**Purpose.** The aim of current work is to update the information about the clinical practice implementation of molecular markers used for diagnosis, prognosis and individual therapy in women breast cancer. **Material and method.** The study relies on the analysis of the most important papers published during last 10 years concerning this domain of interest. Significant news and insight have been obtained by studying data published by PubMed and Cochrane systems. **Results.** The statistics data highlight that nowadays the breast cancer stands for the second cause of death worldwide recording 450,000 deaths/per year. The progressive growth of the death number by breast cancer is explained both by the rise of risk factors and by life expectancy. The discoveries in genomic and proteomic domain have led to the improvement of therapy methods with Tamoxifen or Trastuzumab. The published data focuses, on one hand, on the agreed markers with important significance for the prognosis and therapy attitude such as hormone receptors (estrogen receptors, progesterone receptors), Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2), Ki67 Antigen, Tumor Protein p53, Breast Cancer Susceptibility Genes (BRCA1, BRCA2), and on the other hand, underlines the significance of new candidate biomarkers for the optimisation of diagnosis and therapy treatment such as Caveolin, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Chemokine Receptor Type 4, Chemokine Ligands 2 si 5, Growth Factors (VEGF, TGF- $\beta$ ), microRNA and other genes. **Conclusions.** The assignment of an appropriate tumor marker panel is necessary for the improvement of management of women breast cancer regarding the diagnosis procedures, metastasis evidence, and new therapeutic strategies implementation for assessment of therapy response and peculiar case prognosis. **Keywords:** molecular markers, diagnosis, prognosis, breast cancer

## Rezumat

**Scop.** Lucrarea își propune actualizarea informațiilor privind implementarea în practica clinică a markerilor moleculari necesari stabilirii diagnosticului, prognosticului și terapiei individuale în cancerul mamar la femeie. **Material și metodă.** Studiul are la bază analiza articolelor publicate în ultimii 10 ani referitoare la acest domeniu de interes. Informațiile necesare au fost dobândite prin studierea bazelor de date PubMed și Cochrane. **Rezultate.** Datele statistice evidențiază faptul că în prezent cancerul mamar reprezintă a doua cauză de deces în lume, înregistrând 450.000 de decese anual. Creșterea progresivă a numărului de decese prin cancer mamar se explică atât prin creșterea numărului factorilor de risc, cât și prin creșterea duratei de viață. Descoperirile din domeniul genomic și proteomicii contribuie major la îmbunătățirea metodelor terapeutice cu Tamoxifen sau Trastuzumab. Datele publicate se referă, pe de o parte, la markeri agreeți folosiți în practica clinică cu rol important în stabilirea prognosticului și atitudinii terapeutice, precum receptori hormonalii (estrogen-receptori, progesteron-receptori), Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2), Ki67 Antigen, Tumor Protein p53, Breast Cancer Susceptibility Genes (BRCA1, BRCA2), iar pe de altă parte, subliniază semnificația unor noi markeri candidați la optimizarea mijloacelor de diagnostic și terapie, precum Caveolin, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Chemokine Receptor Type 4, Chemokine Ligands 2 și 5, factori de creștere (VEGF, TGF- $\beta$ ) etc. **Concluzii.** Determinarea unui panel optimal de markeri tumorali este necesară pentru îmbunătățirea managementului femeilor cu cancer mamar în privința procedurilor de diagnostic, evidențierii metastazelor, implementării strategiilor terapeutice, evaluării răspunsului la terapie și prognosticului particular cazului. **Cuvinte-cheie:** markeri moleculari, diagnostic, prognostic, cancer mamar

## Introducere

Cancerul mamar reprezintă cea mai frecventă cauză de deces în rândul femeilor. Datele statistice estimează că, din 2008, incidența cancerului mamar crește cu 20%,

iar mortalitatea - cu 14%. Pentru 2016, în Statele Unite se estimează 246.660 de cazuri noi de cancer mamar invaziv și 61.000 de cazuri noi de cancer *in situ*<sup>(1,2)</sup>. Riscul de deces prin cancer mamar este mai mare pentru

femeile din Africa și mai redus la populația feminină asiatică, hispanică și nativă americană. Analiza atentă a datelor statistice relevă faptul că, în 2016, în Statele Unite ale Americii, există mai mult de 2,8 milioane de femei cu istoric de cancer de sân. Femeile cu mutații BRCA1 prezintă risc de 55-65% de a dezvolta cancer mamar în cursul vieții, în timp ce femeile cu mutații BRCA2 dezvoltă cancer mamar în procent de 45%. Deși există o probabilitate semnificativă de apariție a cancerului mamar la femeile cu istoric familial de cancer, aproximativ 85% din cancerele mamare se instalează în lipsa oricăror antecedente familiale. De-a lungul timpului, s-au implementat în practica clinică o serie de biomarkeri cu valoare predictivă și prognostică ce vizează cancerul mamar. Utilitatea clinică a markerilor reiese din capacitatea acestora de a estima agresivitatea, invazia, existența metastazei, răspunsul la terapia administrată și selectarea planului terapeutic. Creșterea progresivă a numărului de decese prin cancer mamar se explică atât prin creșterea numărului factorilor de risc, cât și prin creșterea duratei de viață. Cunoașterea markerilor cu specificitate și sensibilitate crescută în stabilirea diagnosticului, prognosticului, planului de terapie și supraveghere a femeilor tratate are deosebite implicații în practica clinică. În acest sens, există markeri deja implementați în practica clinică, cu rol important în stabilirea prognosticului și atitudinii terapeutice, precum receptori hormonal (estrogen-receptori, progesteron-receptori), Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2), Ki67 Antigen, Tumor Protein p53, Brest Cancer Susceptibility Genes (BRCA1, BRCA2), cât și markeri candidați la optimizarea mijloacelor de diagnostic și terapie, precum Caveolin, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Chemokine Receptor Type 4, Chemokine Ligands 2 și 5, factori de creștere (VEGF, TGF- $\beta$ ), microRNA și alte gene.

În acord cu cele menționate, lucrarea își propune să prezinte detalii practice legate de markerii moleculari folosiți pentru precizarea diagnosticului, terapiei și prognosticului cancerului mamar, cât și tendințele actuale privind extinderea panelului de markeri utili în managementul cancerului mamar.

### **1. Markerii moleculari folosiți pentru precizarea diagnosticului, terapiei și prognosticului cancerului mamar**

Markerii moleculari utilizați pentru prognosticul și atitudinea terapeutică în cancerul mamar sunt reprezentați prin evidențierea receptorilor hormonal (HR), Receptorului 2 al Factorului de Creștere Uman Epidermal - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (cunoscut sub inițialele HER-2), antigenului Ki67, proteinei p53, antigenului 15-3, antigenului carcinoembrionar și genelor BRCA1 și BRCA2. Utilizarea unora dintre acești biomarkeri sub forma unui panel de biomarkeri are capacitatea de a influența pozitiv conduita terapeutică.

#### **1.1. Receptorii hormonal - markeri imunohistochimici**

Receptorii hormonal existenți la nivelul epiteliului și stromei mamare au capacitatea de a lega hormonii

circulanți, influențând astfel activitatea celulară<sup>(3)</sup>. Receptorii hormonal cei mai studiați prin tehnici de imunohistochimie (IHC) sunt receptorii estrogenici (RE) și receptorii progesteronici (RP). Semnificația crescută a evidențierii acestor receptori hormonal este explicată prin prezența acestora în procent de aproximativ 70% în cazurile de cancer mamar<sup>(4)</sup>. Receptorii estrogenici sunt reprezentați prin receptorii  $\alpha$  și  $\beta$ ; fiecare dintre acești receptori intervin diferit în dezvoltarea glandei mamare. Astfel, RE- $\alpha$  joacă un rol semnificativ în perioada de pubertate, influențând dezvoltarea ductală. RE- $\beta$ , alături de RP sunt implicați în diferențierea lactațională a lobulilor din glanda mamară. Supraexpresia RE- $\alpha$  se corelează cu evoluția tumorală lentă, gradul histologic scăzut, diploidie DNA. Cancerle mamare RE- $\alpha$  pozitive au prognostic mai bun, în raport cu cancerle mamare cu RE negativi. Tumorile mamare cu receptori hormonal negativi prezintă evoluție agresivă și sunt frecvent asociate cu supraexpresia HER2 și mutații ale genei supresoare p53<sup>(5)</sup>. În fapt, prezența receptorilor hormonal în țesutul mamar, influențată de vârsta femeii, este asociată cu influența hormonilor asupra cancerului mamar. Acesta este argumentul care justifică utilizarea terapiei antiestrogenice (Tamoxifen) în managementul cancerului mamar cu RE pozitivi evidențiați imunohistochimic<sup>(6)</sup>.

#### **1.2. Receptorul 2 al factorului de creștere uman epidermal (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; HER-2) - markeri imunohistochimici**

Receptorul 2 al factorului de creștere uman epidermal - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 - este cunoscut în literatura de specialitate cel mai frecvent sub denumirea HER-2. Acest receptor este un receptor tirosinkinază transmembranar care aparține familiei de receptori asociați cu factorul epidermal de creștere. Datele din literatură relevă faptul că supraexpresia HER-2 se asociază cu agresivitate celulară tumorală crescută, rezistență la tratament hormonal și citotoxic, identificând cazurile cu prognostic nefavorabil<sup>(7)</sup>. Similar acțiunii terapeutice anti-receptor estrogenic, industria farmaceutică a introdus în terapia cancerului mamar cu receptori pozitivi HER-2 terapia cu Trastuzumab, reprezentată prin anticorpi monoclonali anti-HER2. Reducerea numărului de receptori HER-2 pozitivi evidențiază un răspuns pozitiv la terapia inițiată.

Femeile cu receptori hormonal și HER2 pozitivi beneficiază de terapie hormonală, răspunsul la terapie fiind mai bun în formele de cancer mamar mai puțin agresive asociate cu prezența acestor receptori.

#### **1.3. Ki67 - markeri imunohistochimici**

Ki67 este o proteină nucleară manifestă în celule numai în fazele proliferative ale ciclului celular. Expresia Ki67 este evaluată prin indexul de proliferare care corespunde numărului de nuclei care se colorează la anticorpii specifici anti-antigen Ki67 în cadrul diagnosticului imunohistochimic efectuat pe țesutul mamar biopsiat. Piesa de biopsie este fixată în formaldehidă neutră buffer și este colorată pentru Ki67 cu anticorpi

MIB1. Pentru formularea unui scor precis, medicul patolog trebuie să interpreteze aproximativ 1000 de celule, 500 de celule fiind acceptate ca o cifră absolut minimă. Testul se consideră pozitiv în situația în care 10-20% din celule prezintă supraexpresia markerului Ki67<sup>(8)</sup>. Cu toate că există multe studii, în lipsa existenței unei armonizări a criteriilor de evaluare IHC a markerului Ki67, grupul internațional de lucru pentru acest marker nu a ajuns la un consens în privința unui cut-point ideal care să poată fi utilizat în practica clinică.

Totuși, multe date statistice pledează pentru existența unei strânse corelații între procentul Ki67 nuclear pozitiv și prognosticul cazului<sup>(9)</sup>. S-au derulat multe studii în încercarea de a obține informații referitoare la valoarea markerului Ki67 din punctul de vedere al capacității acestuia de estimare a prognosticului, predicției, răspunsului la terapia neoadjuvantă și chimioterapie. Markerul de proliferare Ki67 este un indicator al eficienței chimioterapie din cancerul mamar, după cum arată studiile efectuate cu anastrozol sau letrozole. Eficiența terapiei este exprimată prin reducerea expresiei Ki67<sup>(10)</sup>. Ki67 este util pentru triajul cazurilor care necesită terapie adjuvantă după chimioterapie neoadjuvantă.

#### **1.4. Proteina p53 - markeri imunohistochimici**

Gena tumorală supresoare p53 are rol în procesele de apărare împotriva cancerului mamar, intervenind în blocarea ciclului celular, apoptoză, repararea DNA-ului și senescența celulară. Mutațiile genei p53 se acumulează în nucleul celulelor neoplazice. Evidențierea expresiei p53 în țesutul mamar are valoare prognostică. Supraexpresia markerului p53 evidențiază prezența riscului major de recurență și deces.

#### **1.5. CA-15-3 și antigenul carcinoembrionar (CA15-3 și CEA) - markeri serici**

Valoarea diagnostică, prognostică și de anticipare a recurenței și speranței de viață este disputată între acești markeri<sup>(11)</sup>. Determinarea valorii serice a acestor markeri permite estimarea precoce a metastazelor la 60-80% din pacientele cu cancer mamar<sup>(12)</sup>.

#### **1.6. Panel de markeri**

Introducerea în practica clinică a unui panel de markeri pentru stabilirea diagnosticului, terapiei specifice și posibilității de recurență îmbunătățește valoarea singulară a utilizării markerului în cancerul mamar.

##### **1.6.1. Triplul test negativ pentru RE, RP și HER-2**

Prezența triplului test negativ manifestat prin absența receptorilor hormonal RE și RP, cât și a expresiei HER-2 este întâlnită la femeile tinere și este asociată cu lipsa de răspuns la terapia hormonală și răspuns slab la chimioterapie. În acest context, triplul test negativ evidențiază existența unei forme de cancer mamar deosebit de agresive<sup>(13)</sup>.

##### **1.6.2. HER2 și p53**

Mutațiile genei p53 asociate cu supraexpresia HER2 constituie o combinație de markeri care întărește prognosticul cazului de cancer mamar. Pozitivitatea acestor markeri caracterizează evoluția unui tip de cancer mamar cu prognostic prost.

##### **1.6.3. CA 15-3 și CEA (vezi paragraful 1.5)**

##### **1.6.4. Triplul test negativ (RE-; RP-, HER2 -) și CXCR4**

Triplul test negativ asociat cu supraexpresia receptorului C-X-C Chemokine Receptor tip 4 (CXCR4) contribuie la susținerea diagnosticului de tumoră mamară cu potențial puternic agresiv.

##### **1.7. Gene susceptibile pentru diagnosticul de cancer mamar (BRCA1, BRCA2)**

BRCA1 (Breast Cancer 1 gene) și BRCA2 (Breast Cancer 2 gene) sunt gene supresoare prezente în tumorile care codifică proteine cu rol în procesele de reparare ale ADN-ului. Mutațiile genelor BRCA1 și BRCA2 sunt multiple, aproximativ 1200, respectiv 1300 de mutații, astfel încât prevalența mutațiilor în populația generală este estimată la 1/300-1/800. Mutațiile genei BRCA1 afectează replicarea normală a ADN-ului și sunt responsabile de proliferarea necontrolată a celulelor epiteliale.

Gena BRCA1 este localizată la nivelul cromozomului 17q21 și este alcătuită din 22 de axoni cu rol major în menținerea stabilității genomice în supresia tumorală în cadrul proceselor de transcripție, reparare a ADN-ului dublu catenar și în procesele de recombinare. Mutațiile genei BRCA1 sunt implicate în cel puțin 40% din cazurile de cancer mamar ereditar exclusiv și în 80% din cancerele mamare ereditare asociate, de sân și ovar. Gena BRCA2 este localizată la nivelul cromozomului 13q12-q13. Gena are 27 de axoni, dintre care axonul 11 este similar genei BRCA1<sup>(14)</sup>. În prezența mutațiilor BRCA1 și BRCA2, riscul de cancer ovarian este de 39-46%, respectiv 12-20%<sup>(15)</sup>. Femeile purtătoare de mutații BRCA1 sau BRCA2 prezintă risc cumulativ de cancer mamar raportat la prezența antecedentelor familiale și de vârstă.

Determinarea markerilor moleculari considerați specifici pentru cancerul de sân și ovar influențează pozitiv identificarea predispoziției genetice de a dezvolta cancer cu această localizare. Existența sindromului ereditar de cancer mamar și ovarian implică prezența cel puțin a unei alele defectuoase BRCA1 sau BRCA2 provenite de la unul din părinți. Procesul neoplazic se dezvoltă în condițiile în care cea de-a doua alelă devine nefuncțională.

##### **2. Markeri implicați în optimizarea posibilităților de diagnostic și terapie**

Printre markerii implicați în optimizarea posibilităților de diagnostic și terapie a cancerului mamar se numără Caveolinele, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Chemokine Receptor Type 4, Chemokine Ligands 2 și 5, factorii de creștere (VEGF, HGF, IGF, TGF-β) etc.

Familia caveolinelor, alcătuită din caveolin 1, 2 și 3 (CAV1, CAV2, CAV3), este prezentă în majoritatea celulelor mamare și joacă un rol semnificativ în organizarea ciclului celular. Rezultatele cercetărilor au demonstrat existența unei strânse corelații între supraexpresia CAV1 și CAV2 și absența receptorilor hormonal constatată în tumorile mamare de grad înalt<sup>(16)</sup>.

Există studii în derulare care încearcă să dovedească utilitatea unui alt marker, Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4), în supravegherea terapiei cancerului ma-

mar prin administrarea de antagoniști AMD3100 ai receptorilor CXCR4<sup>(17)</sup>. Valoarea factorilor de creștere poate stratifica riscul de progresie și recidivă în cazul tumorilor mamare. În același timp, alți cercetători demonstrează faptul că factorul de creștere hepatocitar (HGF) seric poate diferenția tumorile mamare benigne de cele maligne.

## Concluzii

Acuratețea diagnosticului este crescută prin folosirea panelului de markeri moleculari și genetici de diagnostic, precum triplul test negativ pentru RE, RP și HER-2, asocierile dintre expresia HER2 și p53, CA 15-3 și CEA, triplul test negativ și CXCR4, alături de determinarea genelor BRCA1 și BRCA2, susceptibile pentru diagnosticul de cancer mamar ereditar.

Identificarea femeilor cu receptori estrogenici pozitivi, HER-2 pozitivi și markeri de proliferare Ki67 pozitivi creează oportunitatea instituirii unui tratament specific corespunzător tipului de receptori pozitivi detectați, precum tratamentul anti-estrogenic cu Tamoxifen, terapia cu anticorpi monoclonali anti-HER2 cu Trastuzumab sau chimioterapia cu anastrozol sau letrozole. Reducerea numărului receptorilor menționați constituie dovada răspunsului favorabil la terapia inițiată.

Diagnosticul, prognosticul, estimarea riscului de recurență, cât și estimarea răspunsului la terapie, alături de evaluarea șanselor de supraviețuire a femeilor cu cancer mamar se formulează pe baza utilizării în practica clinică a markerilor specifici pentru cancerul mamar. ■

## Bibliografie

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: Intl Agency for Research on Cancer, 2013, Available from <http://globocan.iarc.fr>.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 132(5):1133–45 <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27711> PMID:22752881.
3. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2004, 13(10):1558-68.
4. Piccart-Gebhart M.J. New developments in hormone receptor-positive disease. *The oncologist*. 2011, 16:40-50.
5. Pankaj Taneja, Dejan Maglic, Fumitake Kai, Sinan Zhu, Robert D. Kendig Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol*, 2010,4:15-34.
6. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL. Tamoxifen for prevention of breast cancer report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(18):1371-88.
7. Slamon DJ, Clark GM et al. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987, 235(4785):177-82.
8. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*, 2008, 17(4):323-334.
9. Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'Hern R, Makris A, Gregory RK, Chang J, Dowsett M. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 82:113-23.
10. Jones RL, Salter JA. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer *Clin Cancer Res*, 2008, 14:8019-26.
11. Uehara M, Kinoshita T, Hojo T, Akashi-Tanaka, Iwamoto E. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol*, 2008, 13(5):447-51.
12. Jager W, Eibner K, Loffler B, Gleixner S, et al. Serial CEA and CA 15-3 measurement during follow-up of breast cancer patients *Anticancer Res*, 2000, 20(6):5179-28.
13. Cho EY, Chang MH, Choi YL. et al. Potencial candidate biomarkers for heterogeneity in triple-negative breast cancer (TNBC) *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001,68(3):753-61.
14. Petrucelli N, Daly BM, Feldman LG, BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Gene Reviews*, 2007, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
15. Welesch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer, *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7):705-13.
16. Hnasko R, Lisanti MP. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Molecular interventions*. 2003, 3(8):445-64.
17. Li JK, Yu L, Shen Y, Zhou LS, Wang YC, Zhang JH. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology*; 2008, 14(15):2308-13.