

DETECCIÓN DE MAMOGLOBINA Y MAGE-A3 EN GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES

HISTOLÓGICAMENTE NEGATIVOS, EN CÁNCER DE MAMA

ALDO REIGOSA^{1,2}, VÍCTOR DELGADO³, TRINA LÓPEZ³, YESSSENIA AVILÉS⁴, MARÍA BALZA⁴, KARLA MOLINA¹, HUMBERTO PONTILLO⁵, FELIPE SALDIVIA⁵, ELISSA GALDONA¹.

¹CENTRO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS (CIMBUC); ²DEPARTAMENTO DE MORFOFISIOPATOLOGÍA, ³LABORATORIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS UC (LABDEI); ⁴ESCUELA DE BIOANÁLISIS; UNIVERSIDAD DE CARABOBO ⁵INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO, VALENCIA, VENEZUELA

RESUMEN

La detección histológica de metástasis en los ganglios linfáticos axilares es un parámetro de mayor valor pronóstico en cáncer de mama. Un 30 % de pacientes con ganglios linfáticos negativos tienen recaída en cinco años, sugiriendo que, este estudio no es suficiente para detectar todas las metástasis. En el presente estudio, se determinó la expresión de marcadores mamoglobina y MAGE-A3, en ganglios axilares histológicamente negativos de pacientes con cáncer de mama, mediante reacción en cadena polimerasa transcriptasa-reversa, a fin de detectar células tumorales aisladas o micrometástasis. La expresión mamoglobina y MAGE-A3 se detectaron en 55,6 % y 33,3 %, respectivamente. Se amplificó el ARN de mamoglobina y MAGE-A3 en ganglios histológicamente positivos en un 72,7 % y 54,5 %, respectivamente. Se relacionó la presencia o ausencia de células tumorales en ganglios negativos con tamaño tumoral, grado histológico, émbolos neoplásicos vasculares, obteniendo resultados no concluyentes, no se logró distribución equitativa de las muestras. Estos resultados muestran que la mamoglobina y MAGE-A3 son útiles para detección de células tumorales aisladas en ganglios axilares negativos.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, mama, diagnóstico, ganglios linfáticos axilares, mamoglobina, MAGE-A3.

SUMMARY

Histological detection of metastasis in axillary lymph nodes is a current practice, and the parameter has greatest prognostic value in breast cancer. 30 % of negative lymph nodes patients at histology studies has disease relapse in five years, suggesting that this method is inadequate to identify all cases with metastasis. In this study, the expression of mamaglobin and MAGE-A3 markers were determined in histological negative axillaries lymph nodes breast cancer patients, by reverse transcriptase polymerase chain reaction. The expression mamaglobin and MAGE-A3 were detected in 55.6 % and 33.3 %, respectively. The ARN of mamaglobin and MAGE-A3 was amplified in patients with histological positive axillaries lymph nodes, obtaining an expression of 72.7 % and 54.5 %, respectively. Finally, presence or absence of tumour cells detected in negative lymph nodes were related to tumour size, histological grade, vascular tumour emboli; non conclusive results were obtaining because it wasn't possible to obtain an equitable distribution of the samples. These results show that mamaglobin and MAGE-A3 are useful for detection of isolated tumour cells in axilar node negative

KEY WORDS: Cancer, breast, diagnosis, axillaries lymph nodes, mamaglobin, MAGE-A3.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es considerado como un gran problema sanitario, ya que ocupa el primer lugar en Venezuela como causa de mortalidad por cáncer en las mujeres y su incidencia ha aumentado en los últimos años, tanto en Venezuela como

Recibido: 22/07/2005 Revisado: 10/10/2005

Aceptado para Publicación: 10/04/2006

Correspondencia: Dr. Aldo Reigosa

Universidad de Carabobo, Avenida Universidad,
Bárbula, Valencia, Estado Carabobo, Venezuela

Tel: (241) 866.6243 - E-Mail: areigosa@uc.edu.ve

mundialmente^(1,2). El incremento global de su incidencia puede estar asociado a un aumento de los factores de riesgo y al desarrollo sostenido de campañas de detección^(3,4).

Debido a la variabilidad del curso clínico de la enfermedad, ha sido necesario tratar de identificar algunas características pronósticas del comportamiento tumoral, siendo los más utilizados entre los de carácter morfológico: tamaño del tumor, tipo y grado histológico, émbolos vasculares sanguíneos o linfáticos y presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales, de estos últimos, los axilares son los más frecuentemente involucrados⁽⁵⁻⁸⁾.

Existe una relación directa entre el tamaño del tumor y la presencia de ganglios axilares linfáticos (GLA) positivos, así como un mayor riesgo de recaída y de mortalidad⁽⁸⁾. El carcinoma ductal infiltrante es la variedad histológica más frecuente, hay subtipos que tienen mejor pronóstico: papilar, medular, mucinoso, adenoideo-quístico y tubular; o de peor pronóstico: metaplásico, neuroendocrino y de células en anillo de sello⁽⁷⁾. El grado histológico se basa en la valoración de tres factores: la formación de túbulos, la regularidad en el tamaño, forma y características de tinción del núcleo, y la actividad mitótica^(6,9).

Los vasos sanguíneos y linfáticos que se encuentran alrededor de un carcinoma infiltrante pueden estar invadidos por células tumorales, siendo su identificación importante en la predicción de la recurrencia local precoz y metástasis distantes, orientando además en el éxito o fracaso terapéutico⁽¹⁰⁾.

Las metástasis en los GLA pueden ser micrometástasis, cuando el tamaño es menor de 2 mm de diámetro pero mayor de 0,2 mm en su mayor dimensión. Las células tumorales aisladas (ITC) se definen como células aisladas o grupos de células cuyo tamaño no exceda 0,2 mm y no muestren evidencia de actividad proliferativa o reacción estromal⁽⁷⁾.

El número de GLA comprometidos es

inversamente proporcional a la supervivencia del paciente, si los GLA con metástasis son separados en niveles, pueden obtenerse datos de significado pronóstico, sin embargo, el número total de GLA comprometidos, más que el nivel de compromiso, sigue siendo el factor de mayor valor pronóstico⁽¹¹⁾.

Estudios retrospectivos han sugerido que un número considerado de pacientes con GLA histológicamente negativos, pueden desarrollar cáncer a través del tiempo, indicando así que los métodos de rutina son inadecuados para identificar precozmente estas metástasis⁽¹²⁾. Los principales factores limitantes para la detección de las ITC son: número de cortes histológicos examinados, variabilidad biológica de las células malignas y cantidad de células malignas presentes⁽⁷⁾.

Recientemente, se ha implementado la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa-reversa (RT-PCR) para detectar marcadores moleculares presentes en las células cancerosas, tales como la mamoglobina (MMG), la cual, se expresa principalmente en células epiteliales de la mama, y está presente en muchos tipos de tumores de mama, por lo que su detección es útil para la identificación de células cancerosas en la circulación periférica, médula ósea y en GLA⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Otro de los marcadores tumorales utilizados para la detección de ITC en GLA en el cáncer de mama, a través de la RT-PCR, es el gen MAGE-A3, este no se expresa en tejido normal, excepto en la placenta y células germinales masculinas. Los péptidos y proteínas del gen MAGE-A3 son inmunogénicos y pueden inducir citotoxicidad en los linfocitos T y anticuerpos en el paciente⁽¹⁶⁾.

En el presente trabajo se correlaciona la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3 por RT-PCR, con la detección de ITC en GLA histológicamente negativos y positivos de pacientes con cáncer de mama, se discute la importancia de identificación de marcadores genéticos en el estudio del paciente con cáncer.

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores para amplificación.

Iniciador	Secuencia
GA3PDH	
sense5	'CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA3'
GA3PDH	
antisense	5'TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC3'
MMG	
sense	5'CCGACAGCAGCAGCCTCAC3'
MMG	
antisense	5'TCCGTAGTTGGTTTCTCAC3'
MAGE-A3	
sense	5'GAAGCCGCCCCAGGCTCG3'
MAGE-A3	
antisense	5'GGAGTCCTCATAGGATTGGCTCC3'

MÉTODOS

La muestra estuvo conformada por GLA, provenientes de 29 pacientes con adenocarcinoma ductal infiltrante de mama, diagnosticadas en el Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, Venezuela, durante el año 2004. El espécimen de vaciamiento axilar fue disecado en fresco, obteniéndose los ganglios linfáticos. Ellos fueron seccionados en mitades, una destinada al estudio histológico, el cual se efectuó según el procedimiento de rutina, la otra se guardó en tubos Eppendorf y se congeló a -70°C para el estudio molecular. Estos últimos fueron cortados en un criostato, a un espesor de $20\text{ }\mu\text{m}$ y pesados hasta obtener entre 48-52 mg de material para la prueba. Se obtuvo además un fragmento de tejido fresco del tumor primario de mama como control positivo y como control negativo, un ganglio linfático no neoplásico.

La extracción de ARN se realizó con el Kit RNAgents total isolation system (Promega), empleando los volúmenes recomendados por el fabricante de acuerdo a la cantidad de tejido (mg) procesado. Los extractos de ARN fueron tratados con inhibidor de ARNasas y almacenados a -70°C en alícuotas de $5\text{ }\mu\text{L}$ para conservar su integridad. Para el ensayo RT-

PCR de los marcadores MMG y MAGE-A3 se usó el kit access RT-PCR system (Promega), $49\text{ }\mu\text{L}$ de mezcla maestra preparada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con 50 pmoles de cada iniciador (Cuadro 1) y $1\text{ }\mu\text{L}$ del ARN diluido 1:10. La integridad del ADNc sintetizado, se evidenció con la co-retro-transcripción paralela del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) en las mismas condiciones de reacción.

Todas las reacciones de RT-PCR fueron desarrolladas en un volumen final de 50 mL en las temperaturas descritas por el fabricante del kit, la temperatura annealing para MMG fue $62^{\circ}\text{C}/30\text{ seg}$, MAGE-A3 y GA3PDH $53^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ (termociclador PTC 100 M.J.-Research). En cada set de RT-PCR, fueron incluidos controles de reactivos sin ARN, control negativo (ARN extraído de tejido no neoplásico) y un control positivo (ARN extraído de tejido fresco de tumor de mama primario). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforésis en gel de agarosa al 2 % y coloreado con bromuro de etidio.

El tamaño del tumor fue obtenido del reporte de la biopsia, medido de acuerdo a su diámetro mayor en la pieza de mastectomía y clasificado en tres categorías ($\leq 2\text{ cm}$; $2,1\text{ cm}$ a 5 cm o $\geq 5,1\text{ cm}$). En caso de haber recibido quimioterapia neoadyuvante, se utilizó la medida indicada en la historia clínica del paciente. El grado histológico fue el reportado en el informe de la biopsia definitiva, determinado según el método de Bloom y Richarson⁽⁶⁾, modificado por Elston y Ellis⁽⁹⁾.

Los datos obtenidos fueron comparados utilizando el paquete estadístico STATISTIX. Se aplicó la prueba Chi-cuadrado (X^2) para establecer las asociaciones entre las variables en estudio.

RESULTADOS

De los 29 pacientes cuyos GLA fueron

evaluados, 18 casos fueron negativos al estudio histológico y 11 presentaron metástasis. Se estudiaron entre 2 y 15 GLA por paciente.

El Cuadro 2, muestra los resultados de la detección de los marcadores MMG y MAGE A-3 destacándose la expresión ARNm de MMG (Figura 1-A) en 8 de 11 (72,7 %) pacientes con metástasis histológicamente demostrada y en 10 de 18 (55,6 %) sin evidencia histológica de metástasis; mientras que el ARNm del MAGE-A3 (Figura. 1-B) se expresó en 6 de 11 (54,5 %) pacientes con GLA metastásicos y 6 de 18 casos con GLA sin metástasis (33,3 %). Se demostró la integridad del ADNc en los casos analizados (Figura 1-C).

La relación entre la expresión de los marcadores moleculares y el tamaño del tumor no mostró diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 3).

Cuadro 2. Correlación entre el análisis histológico de los GLA y la RT-PCR

	GLA negativos		GLA positivos		Concordancia total
	PCR-	PCR+	PCR-	PCR+	
MMG	8	10	3	8	55,2
MAGE	12	6	5	6	62,1

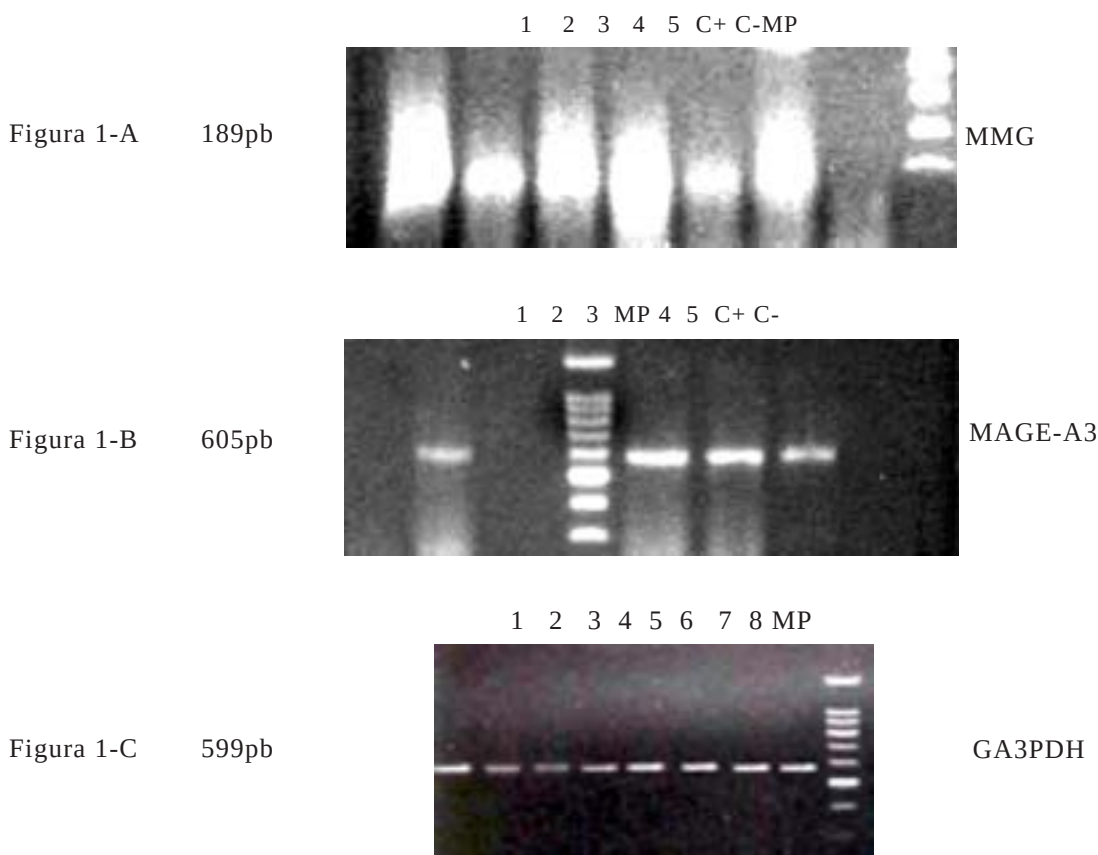


Figura 1-A. Expresión de RNAm de MMG en GLA con metástasis histológicamente documentada (carril 1 al 5); **Figura 1-B.** Expresión de RNAm de MAGE A-3 en GLA con evidencia histológica de metástasis (carril 1 al 5). Detectadas por RT-PCR, como control positivo (c+) tumor primario de mama y control negativo (c) ganglio linfático no neoplásico; **Figura 1-C.** Expresión de GA3PDH como control positivo de integridad del DNAc. Carril MP es un ladder molecular de 100pb.

Cuadro 3. Relación de MMG y /o MAGE-A3 detectados por RT-PCR, en ganglios linfáticos histológicamente negativos, y el tamaño del tumor de mama.

	Tamaño del tumor			Total
	<2cm	2,1 a 5cm	>5,1cm	
Negativo	0	1	5	6
MMG o MAGE A3	2	3	3	8
MMG y MAGE A3	0	2	2	4
Total	2	6	10	18
P< 0,05				

Al comparar los marcadores moleculares de metástasis y el grado histológico del tumor primario se evidencia la expresión de 1 ó 2 marcadores en dos tumores con grado histológico I, en siete tumores con grado II y en tres tumores con grado III, no existiendo relación entre estas variables (Cuadro 4).

Del total de las muestras estudiadas sólo un paciente presentaba émbolos vasculares neoplásicos, por lo tanto, no se pudo correlacionar la presencia o ausencia de esta característica histológica con la expresión de los marcadores ensayados.

Cuadro 4. Relación de MMG y /o MAGE-A3 detectados por RT-PCR, en ganglios linfáticos histológicamente negativos, y grado histológico del tumor de mama.

	Grado histológico			Total
	I	II	III	
Negativo	1	3	2	6
MMG o MAGE A3	2	5	1	8
MMG y MAGE A3	0	2	2	4
Total	3	10	5	18
P< 0,05				

DISCUSIÓN

En el presente estudio se corrobora la utilidad de la RT-PCR en la detección de marcadores específicos de células tumorales epiteliales aisladas y/o micrometástasis presentes en los GLA. Se demostró un 72,7 % de expresión de MMG en GLA histológicamente positivos, este porcentaje es inferior al 91 % obtenido por Watson y col.⁽¹⁷⁾, en la expresión de MMG por PCR de 11 GLA con metástasis histológicamente documentadas. Similarmente, Marchetti y col.⁽¹⁸⁾, demostraron expresión de ARNm en 97 % de los GLA histológicamente comprometidos, y Aihara y col.⁽¹⁹⁾, detectaron MMG en el 100 % de 11 pacientes con GLA metastásicos.

Al emplear tejido fresco de cáncer de mama de 165 pacientes, el 95 % expresó MMG por RT-PCR⁽¹⁵⁾. El porcentaje de casos positivos para MMG de este estudio es similar al obtenido mediante inmunohistoquímica, pero como se puede observar es inferior a lo reportado con la técnica RT-PCR, tanto en tumor primario como en los GLA histológicamente positivos; la razón de estas diferencias pudiera estar asociada a la heterogeneidad que caracteriza el cáncer de mama y la zona del tejido ganglionar seleccionado.

Se observó evidencia de ITC para MMG en el 56 % de los pacientes con GLA histológicamente negativos; en nuestro caso, el porcentaje obtenido es mayor que los reportados por Aihara y col.(1999) y Marchetti y col. (2001), quienes obtuvieron expresión de MMG en 11/45 (31 %) y 46/159 (29 %) de los GLA negativos a la histología respectivamente^(19,20). Las diferencias aquí observadas se podrían explicar por los argumentos señalados de los casos GLA histológicamente positivos.

La expresión de MAGE-A3 en GLA histológicamente positivos fue de 54,5 %, esta expresión es superior al 19 % o 21 % obtenido por Kown y col.⁽²¹⁾, en donde observan que la variabilidad de expresión se debe al número de

GLA positivos analizados; cuando se han empleado tejido mamario tumoral primario, Taback y col.⁽²²⁾, obtienen expresión de MAGE-A3 en el 100 % de 25 pacientes.

La expresión del MAGE-A3 en GLA histológicamente negativos fue del 33 % en el presente estudio, se corresponde con los hallazgos de Washer y col.⁽¹⁴⁾, quienes obtuvieron expresión de este marcador en 38 % en GLA histológicamente negativos.

En el presente trabajo no se encontró relación entre la expresión de MMG y MAGE-A3 con tamaño y grado histológico del tumor. Existen estudios que encuentran relación entre estos parámetros y la presencia de células en sangre periférica que expresan MMG o MAGE-A3^(17,23). No se encontraron reportes en la bibliografía consultada que relacionen marcadores genéticos de expresión en GLA con el tamaño y grado histológico del tumor.

Este estudio ha demostrado que la expresión de los marcadores moleculares MMG y MAGE-A3, a través del ensayo RT-PCR, es útil en la

detección de ITC en GLA histológicamente negativos, en pacientes con cáncer de mama, ya que fueron expresados simultáneamente en 4 de 18 pacientes, mientras que 8 fueron positivos a uno u otro marcador, es decir, el ensayo PCR fue capaz de detectar ITC en 12 pacientes (66,6 %) previamente reportados como libres de neoplasia según el estudio histológico.

Debido a que se desconoce el valor pronóstico de la detección de ITC (por PCR o inmunohistoquímica) en GLA histológicamente negativos, son necesarios estudios prospectivos que registren la evolución de las pacientes, ya que esto ayudaría a identificar pacientes con mayor riesgo de recurrencia y/o metástasis a distancia, quienes podrían beneficiarse con una terapia adyuvante más agresiva. De igual manera, está por determinarse cual es el marcador o panel de marcadores que deba ser utilizado. Mientras tanto y debido a la heterogeneidad del cáncer de mama, parece sensato recomendar el uso de al menos dos marcadores.

REFERENCIAS

1. Anuario de mortalidad 2004. Ministerio de Salud, Venezuela. 2005. Disponible en: http://www.msds.gov.ve/msds/direcciones_msds/Epidemiologia/Estadistica/Index.htm.
2. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(1):10-30.
3. Parkin DM, Fernandez LM. Use statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J*. 2006;12(Suppl 1):70-80.
4. Okobia MN, Bunker CH. Epidemiological risk factors for breast cancer—a review. *Niger J Clin Pract*. 2005;8(1):35-42.
5. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2006;42(3):357-362.
6. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: A study of 1 409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359-377.
7. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics tumors of breast and female genital organs. IARC Press Lyon. 2003.
8. Rivers AK, Griffith KA, Hunt KK, Degnim AC, Sabel MS, Diehl KM, et al. Clinicopathologic features associated with having four or more metastatic axillary nodes in breast cancer patients with a positive sentinel

- lymph node. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(1):36-44.
9. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-410.
 10. Wong JS, O'Neill A, Recht A, Schnitt SJ, Connolly JL, Silver B, et al. The relationship between lymphatic vessel invasion, tumor size, and pathologic nodal status: Can we predict who can avoid a third field in the absence of axillary dissection? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48(1):133-137.
 11. Díaz J. Estado actual de los factores pronósticos en cáncer de mama. En: Hernández G, editor. *Avances en Mastología*. Buenos Aires: Editorial MacGraw Hill; 1996.p.239-253.
 12. Musé L, Sabini G, Viola A. Tratamientos adyuvantes sistémicos en el cáncer de mama sin compromiso metastásico de los ganglios axilares. En: Hernández G, editor. *Avances en Mastología*. Buenos Aires: Editorial MacGraw Hill; 1996.p.451-458.
 13. Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, et al. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res*. 2003;5(3):R65-70.
 14. Bernstein JL, Godbold JH, Raptis G, Watson MA, Levinson B, Aaronson SA, et al. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6528-6535.
 15. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Pronzato P, Tognoni A, Falco E, et al. Human mammaglobin mRNA is a reliable molecular marker for detecting occult breast cancer cells in peripheral blood. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005; 24(2):265-271.
 16. Wascher RA, Bostick PJ, Huynh KT, Turner R, Qi K, Giuliano AE, et al. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients' sentinel lymph nodes. *Br J Cancer*. 2001;85(9):1340-1346.
 17. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res*. 1999;59(13):3028-3031.
 18. Marchetti A, Buttita F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D, et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: Comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathol*. 2001;195(2):186-190.
 19. Aihara T, Fujiwara Y, Ooka M, Sakita I, Tamaki Y, Monden M. Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;58(2):137-140.