

La expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en carcinomas mamarios hormonoindependientes

A. RUIBAL^a, M. GARRIDO-PUMAR^a Y J.I. ARIAS^b

^aServicio de Medicina Nuclear. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela.

^bServicio de Cirugía General. Hospital Monte del Naranco. Oviedo.

Resumen.—*Objetivo.* Estudiar la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en carcinomas ductal infiltrantes (CDI) hormonoindependientes así como sus posibles relaciones con otros parámetros clínico-biológicos.

Material y método. El EGFR fue determinado, mediante un método de radioligando, en las membranas celulares de 115 CDI RE y RP negativos (< 10 fmol/mg prot.). Hemos analizado, además, las concentraciones citosólicas de pS2, catepsina D, activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP) y ácido hialurónico (AH), así como las de AH en las membranas celulares. También se han considerado el tamaño, afectación axilar, metástasis a distancia, grado histológico, ploidía y fase de síntesis celular (FS).

Resultados. Utilizando como dintel de positividad para el EGFR un valor de 5 fmol/mg prot., pudimos observar que los carcinomas EGFR + mostraron mayores valores globales de FS (p: 0,005) y metástasis a distancia (p: 0,004), siendo más frecuentemente FS > 7% (p < 0,001); asimismo, fueron menos frecuentemente pS2 + (p < 0,001) y t-AP + (p < 0,001). Pudimos seguir 70 pacientes (i: 54-168; mediana 85 meses) y observamos que los carcinomas EGFR + presentaron mayor número de recidivas (14/41 frente a 1/29; p: 0,002), pero no de muertes por el tumor.

Conclusiones. 1) La positividad para el EGFR en los CDI RE y RP negativos se asoció con metástasis a distancia, mayor proliferación celular, menor positividad para pS2 y t-AP y con superior número de recidivas; 2) los mismos hallazgos, excepto el cambio en la proliferación celular, fueron constatados cuando el dintel de positividad fue establecido en 10 fmol/mg prot, y 3) El EGFR podría ser utilizado como factor pronóstico en este tipo de carcinomas mamarios.

PALABRAS CLAVE: cáncer de mama, EGFR, proliferación celular, hormonoindependencia.

EXPRESSION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) IN HORMONE DEPENDENT BREAST CANCERS

Summary.—*Objective.* To determine the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in ER-negative and

Recibido: 5/7/05.

Aceptado: 29/10/05.

Correspondencia:

DR. A. RUIBAL MORELL
Servicio de Medicina Nuclear
Hospital Clínico Universitario
15706 Santiago de Compostela

Pg-R negative infiltrating ductal carcinomas of the breast (IDC) and to analyze the possible relationship between the EGFR positivity and some clinico-biological parameters of tumors.

Material and methods. EGFR was measured by a single point radioligand assay in the cell surfaces of 115 ER-negative and Pg-R-negative (< 10 fmol/mg prot.) IDC. We measured also the cytosolic concentrations of pS2, cathepsin D, tissue-type plasminogen activator (t-PA) and hyaluronic acid (AH), as well as the levels of AH in cell surfaces. Tumor size, axillary involvement, distant metastasis, histological grading, ploidy and S-phase (SP) were taken account.

Results. Using as cut-off for EGFR a value of 5 fmol/mg prot., we can observed that IDCs -EGFR + had greater global values of S-phase (p: 0.005) and were more frequently metastatic (p: 0.004), SP > 7% (p < 0.001) and SP > 14% (p: 0.077); likewise, they were lower frequently pS2-positive (p < 0.01) and t-PA-positive (p < 0.01). During the follow up time (median 85 months), the number of recurrences was higher in EGFR-positive than in EGFR- negative tumors (14/41 frente a 1/29; p: 0.002), but there was not differences in the number of deaths by the tumor.

Conclusions. 1) The EGFR-positivity in ER-negative and PgR-negative IDCs is associated with distant metastasis, greater cellular proliferation (SP), lower positivity for pS2 and t-PA and greater number of recurrences. 2) Using 10 fmol/mg prot. as cut-off, we observed the same findings, except the change in cellular proliferation. 3) Our findings support the possible use of EGFR as a prognostic parameter in those breast carcinomas.

KEY WORDS: breast cancer, EGFR, cellular proliferation, ER-negative, PgR-negative.

INTRODUCCIÓN

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) forma parte de una familia de receptores de membrana (erbB) con actividad intrínseca tirosín-quinasa. Es una glucoproteína de membrana con un peso molecular de 170 KD, se expresa en muchas células epiteliales y se activa a través de numerosos ligandos entre los que destacan el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGFA)¹. En la célula tumoral, el EGFR forma heterodímeros con otros receptores, lo

que conlleva la activación de numerosos mecanismos bioquímicos celulares que intervienen en la adhesión, motilidad, crecimiento, angiogénesis y escape de la apoptosis². El interés de este receptor se ha incrementado en los últimos años por ser una diana de nuevas opciones terapéuticas, ya sea en su dominio externo o interno³. En los tumores mamarios la expresión de EGFR se detecta en el 48 % de los mismos, se correlaciona inversamente con los receptores esteroideos y junto al oncogén HER2-erbB2 permite distinguir subgrupos de pacientes con enfermedad avanzada y diferente respuesta a la hormonoterapia⁴ y al anticuerpo humanizado frente al oncogén erbB2⁵. Se puede detectar también EGFR en el núcleo de las células tumorales y en esta localización actúa como un regulador de la transcripción del gen de la ciclina D1, correlacionándose con la proliferación celular medida a través del Ki67⁶. Merece destacarse la existencia de diferencias en el comportamiento de un tumor en función de la expresión de distintos miembros de la familia erbB⁷.

Los carcinomas mamarios hormonoindependientes representan un importante porcentaje de casos, pueden ser consecuencia de numerosas causas y suelen asociarse con un peor comportamiento y evolución. Asimismo, la pérdida de la hormonodependencia parece estar ligada a la progresión de estos tumores⁸, y cambios en la funcionalidad de los receptores de progesterona llevan a la adquisición de un fenotipo agresivo⁹. Nosotros hemos querido analizar el papel del EGFR en los carcinomas mamarios hormonoindependientes, considerando el receptor de estrógenos y de progesterona, y ver si constituía un factor de interés clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

El grupo de estudio incluyó 115 carcinomas ductales infiltrantes de mama (CDI) hormonoindependientes (RE y RP < 10 fmol/mg prot.; EIA. Abbott. EE.UU.), sin tratamiento previo y pertenecientes a mujeres de edades comprendidas entre 36 y 82 años ($62,5 \pm 10,7$; mediana 63). Tras su obtención en quirófano y transporte en un contenedor frío, las muestras fueron separadas de sus componentes grasos y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su utilización. Posteriormente, fueron pulverizadas con un microdesmembrador (OMNI 1000; Waterbury, CT, USA) a -70° y homogeneizadas en un potter de telón-cristal

en un *buffer* TRIS-CLH (TRIS 0,01 M; EDTA Na2 0,0015M; 10 % glicerol; 0,1 % monioglicerol; pH 7,4). Los homogeneizados fueron luego centrifugados a bajas revoluciones (800 g durante 10 minutos a 4°C) y el sobrenadante obtenido ultracentrifugado a 100,000 g durante una hora a 4°C . El nuevo sobrenadante (citosol) y el precipitado (membranas) se utilizaron para los análisis de los distintos parámetros. En el citosol hemos determinado las concentraciones de pS2 (IRMA, CIS, Francia), catepsina D (IRMA, CIS, Francia), activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP; EIA, Boehringer Mannheim, Alemania) y ácido hialurónico (AH) (RIA, Pharmacia, Suecia), mientras que en las membranas celulares determinamos las concentraciones de AH y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; RLG, Viennalab, Austria). Esta última es una técnica de radioligando de un solo punto con un límite inferior de sensibilidad de 1 fmol/mg proteína. Hemos tomado como dintel de positividad para el EGFR un valor de 5 fmol/mg prot., ligeramente superior a la mediana obtenida en un grupo constituido por 434 CDI (1-290,5; mediana 4,4; P₂₅: 2,0 y P₇₅: 14,9). También se han considerado el tamaño, afectación axilar (N), metástasis a distancia (M), ploidía y fase de síntesis celular, determinadas estas dos últimas mediante citometría de flujo en muestras en fresco (Becton Dickinson Fascal, EE.UU.). Dado que los distintos parámetros biológicos no siguieron una distribución normal, hemos utilizado tests estadísticos no paramétricos. Los resultados de los distintos parámetros biológicos se han referido por miligramo de proteína, medida por el método de Bradford, y expresado mediante el intervalo y la mediana. Una diferencia se consideró estadística cuando el valor de $p < 0,05$. Hemos podido seguir la evolución de 70 pacientes durante un tiempo que osciló entre 54 y 168 meses ($89,5 \pm 27,5$) y con una mediana de 85 meses.

RESULTADOS

Cuando los carcinomas fueron clasificados en función del dintel de positividad de 5 fmol/mg prot., pudimos ver, tal como se expone en la tabla 1, que los casos EGFR-positivos cursaron con mayores valores globales de fase S, siendo, asimismo, más frecuentemente proliferativos (FS > 7%), pS2-negativo y t-AP negativo, pero sólo este último con el dintel de 5 ng/mg prot.; asimismo, presentaron con mayor frecuencia metásta-

Tabla 1

DISTRIBUCIÓN DE LOS VALORES (INTERVALO Y MEDIANA) DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS CLÍNICO-BIOLÓGICOS OBTENIDOS EN LOS CARCINOMAS DUCTALES INFILTRANTES DE MAMA CLASIFICADOS EN FUNCIÓN DE LA POSITIVIDAD (> 5 FMOL/MG PROT.) PARA EL EGFR

Parámetro	EGFR +	EGFR-	p	Unidades
CATD	1,5-1228 (38,9)	5,8-126 (42,9)	ns	pmol/mg prot.
AHC	526-12.935 (4.395)	946-30.561 (4.204)	ns	ng/mg prot.
AHM	70,2-6.843 (1.938)	49-5.117 (1.442)	ns	ng/mg prot.
Tamaño	0,16-10 (2,4)	0,6-13 (2,5)	ns	cm
Fase S	0,9-42,3 (10,8)	1,9-51,2 (7)	0,005	%
> 2cm	43/70	30/45	ns	
> 5cm	5/70	2/45	ns	
N+	40/70	33/45	ns	
M+	17/70	1/45	0,001	
FS > 7 %	38/53	20/41	0,023	
FS > 14 %	14/53	11/41	ns	
Aneuploides	29/53	17/41	ns	
GH3	37/70	22/45	ns	
pS2 > 2	20/70	33/45	< 0,001	
pS2 > 5	15/70	25/45	< 0,001	
t-AP > 1	47/70	33/45	ns	
t-AP > 5	0/70	19/45	< 0,001	

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

sis a distancia. Tras el seguimiento de 70 pacientes pudimos constatar que los tumores EGFR-positivos mostraron mayor número de recidivas que los EGFR-negativos (14/41 frente a 1/29; p: 0,002), sin apreciarse diferencias en el número de muertes por el tumor entre los dos subgrupos de pacientes.

DISCUSIÓN

Aunque es difícil precisarlos, pues existen cuestiones metodológicas y los dinteles de positividad pueden variar según la técnica utilizada, los carcinomas mamarios hormonoindependientes representan un porcentaje importante de los observados, de tal forma que pueden estar cercanos al 20 %¹⁰. Suelen cursar con un peor comportamiento y, obviamente, no son tributarios, *a priori*, de una terapia hormonal. Paralelamente, el interés del EGFR se ha incrementado en los últimos años, no sólo por ser un objetivo terapéutico, sino también por su implicación en la fisiopatología de los tumores mamarios. Así, la interrelación entre este receptor y los receptores esteroideos es de gran valor y se cree que aquél desempeña un importante papel en la aparición de la hormonoindependencia. También la ausencia de estrógenos conlleva la regulación positiva de los procesos bioquímicos

regulados por los factores de crecimiento, lo que determina un subtipo más agresivo y hormonoindependiente¹¹. Esta interrelación biológica nos ha llevado a analizar como la concentración de EGFR incide en las características clínico-biológicas de los tumores mamarios hormonoindependientes, considerando la negatividad para los receptores de estrógenos y de progesterona.

Tomando como dintel de positividad para el EGFR un valor de 5 fmol/mg prot., superado por el 52,5 % de 434 carcinomas ductales infiltrantes de mama de nuestra base de datos, pudimos observar que los tumores positivos cursaron más frecuentemente con metástasis a distancia y fueron más frecuentemente proliferativos, tanto globalmente como cuando el dintel para la fase S se estableció en el 7 %. Sabemos que la proliferación celular es un importante factor pronóstico en los tumores mamarios, además de favorecer el tratamiento quimioterápico^{12,13}. Pero lo más llamativo de nuestro estudio fue que los carcinomas EGFR negativos cursaron con mayores porcentajes de positivities para la pS2 (con dinteles de 2 y 5 ng/mg prot.) y el t-AP sólo con el dintel de 5 ng/mg prot. Hemos considerado porcentajes y no concentraciones para ambos factores, porque en los tumores hormonoindependientes sus concentraciones son muy reducidas, ya que ambos están relacionados con la

maquinaria estrogénica de un modo preferente¹⁴⁻¹⁶. El aumento de la positividad para la pS2, independientemente del dintel utilizado, en los casos EGFR- es difícil de explicar. Sabemos que la pS2 es una proteína inducida por los estrógenos, aunque también la pueden expresar tumores hormonoindependientes y que su valor clínico reside en que es un indicador de la respuesta hormonal. Por ello, nuestro hallazgo podría ser el reflejo de cierta "hormonodependencia" residual, pues los valores observados en los tumores RE-/RP-/EGFR- son muy superiores a los apreciados en los casos RE-/RP- (I. 0,1-322; mediana 1,8). Asimismo, nosotros no hemos apreciado diferencias clínico-biológicas en los CDI RE-/RP-/pS2 + y RE-/RP-/pS2-. Apoyaría también la "hormonodependencia" residual, la observación de mayores positivities para el t-AP con el dintel de 5 ng/mg prot., pues esta proteasa es también un indicador del funcionamiento de la cadena hormonal esteroidea¹⁶. No obstante, queda abierta la posibilidad de que las elevaciones de pS2 y t-AP en los casos EGFR-negativos puedan ser el exponente de otro/s hechos fisiopatológicos que en este momento no podemos precisar. Nuestros resultados apoyan el interés práctico del EGFR para establecer subgrupos de riesgo en los tumores hormonoindependientes, hecho ya señalado por otros grupos^{17,18}. Asimismo, apoya que puedan utilizarse terapias sobre el EGFR en los tumores receptores esteroideos negativos¹⁹.

Cuando consideramos otros dinteles cuantitativos para el EGFR, pudimos observar que con un valor de 10 fmol/mg prot. (superado por el 30,3 % de nuestra serie histórica) persistían las diferencias con las metástasis a distancia (p: 0,031), la positividad para la pS2 (> 2; p < 0,001; > 5 ng/mg prot.; p: 0,007), la de t-AP (> 5 ng/mg prot.; p: 0,009) y el mayor número de recidivas (p: 0,046), desapareciendo las diferencias en la fase de síntesis celular. Con el dintel de 20 fmol/mg prot., superado por el 18,9 % de nuestra serie histórica, persistieron también las diferencias en las metástasis a distancia (p: 0,089), positividad para la pS2 (p: 0,001; p: 0,013) y la positividad para el t-AP (p: 0,012), desapareciendo las diferencias en la proliferación celular y en el número de recidivas. Es decir, conforme aumentamos el dintel del EGFR desaparece la importancia de la proliferación celular, pero persisten el resto de hallazgos fisiopatológicos.

En cuanto al valor pronóstico del EGFR en el cáncer de mama, los resultados descritos en la literatura no son coincidentes^{17,20-22} y se considera, cuando exis-

te, que aquél desciende con el paso del tiempo²³. Nuestras pacientes fueron sometidas a cirugía, radio y quimioterapia y pudimos seguir a 70 (41 EGFR + y 29 EGFR-) durante un período de tiempo moderadamente importante. Pudimos constatar un mayor número de recidivas en los casos positivos (14/41 frente a 1/29; p: 0,002), pero no de muerte por el tumor (5/39 frente a 1/29; ns). Somos conscientes del reducido número de pacientes seguidos, de su posible heterogeneidad y que hemos empleado una técnica isotópica, por lo que no queremos sacar conclusiones, pero sí podemos resaltar que, quizás en los carcinomas hormonoindependientes este receptor puede ser de utilidad, máxime cuando otros autores no suelen diferenciar los tumores en base a su carácter hormonal o no consideran la negatividad para los receptores de estrógenos y de progesterona.

Los resultados obtenidos nos inducen a las siguientes consideraciones: 1) La positividad para el EGFR en los tumores mamarios hormonoindependientes (RE y RP negativos) se asocia positivamente con una mayor frecuencia de metástasis a distancia y superior proliferación celular, así como negativamente con la positividad para la pS2 y t-AP; 2) cuando el dintel de positividad para el EGFR se incrementa a 10 fmol/mg prot., desaparece el comportamiento de la proliferación celular, pero persisten el resto de cambios biológicos; 3) en nuestra experiencia, la positividad del EGFR (5 o 10 fmol/mg prot.) se asoció con un mayor número de recidivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salomon DS, Brandt R, Ciardello F, Normanno N. Epidermal growth factor related peptides and their receptor in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19:183-232.
2. Brandt BH, Roetger A, Ditmar T, Nikolai G, Seeling M, Merschjann A, et al. C-erbB2/EGFR as dominant heterodimerization partners determine a mitogenic phenotype in human breast cancer cells. *FASEB* 1999; 13:1939-49.
3. Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3235-42.
4. Fitzpatrick SL, La Chance MP, Schultz GS. Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res*. 1984;44:3443-7.
5. Diemeier S, Horvath G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szollosi J, Brockhoff G. Epidermal growth factor receptor co-expression modulates susceptibility to Herceptin in HER-2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res*. 2005;304:604-19.
6. Lo HW, XIA W, Wei Y, Ali-Sayed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:338-48.

7. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell JA, Rampaul RS, Blamey RW, et al. Expression and c-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2004;91:1532-42.
8. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*. 2005;205:248-54.
9. Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK, Horwitz KB. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol*. 2005;19:574-87.
10. Colomer R, Beltran M, Dorcas J, Cortes-Funes H, Hornedo J, Valentin V. It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3868-9.
11. Sabnis GJ, Jelovac D, Long B, Brodie A. The role of growth factor receptor pathways in human breast cancer cells adapted to long-term estrogen deprivation. *Cancer Res*. 2005;65:3903-10.
12. Michels JJ, Marnay J, Delozier T, Denoux Y, Chasle J. Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer*. 2004;100:455-64.
13. Caly M, Genin P, Ghuzlan AA, Elie C, Freneaux P, Klijanienko J, et al. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Res*. 2004;24:3283-8.
14. Rochefort H. Estrogen-induced genes in breast cancer, and their medical importance. *Bull Acad Natl Med*. 1999;183:955-68.
15. Rella C, Coviello M, Quaranta M, Paradiso A. Tissue-type plasminogen activator as marker of functional steroid receptors in human breast cancer. *Thromb Res*. 1993;69:209-20.
16. Ruibal A, Álvarez A, Fernández Llana B, Fernández Fernández M, Roiz MC, Allende MT. Cytosolic tissue-type plasminogen activator (t-PA) levels in breast tumors and hormone dependence. Role of pS2. *Int J Biol Markers*. 1994;9:251-3.
17. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1,029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;71:67-75.
18. Fox SB, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Hastrich D, Harris AL. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3,009 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;29:41-9.
19. Lu C, Speers C, Zhang Y, Xu X, Hill J, Steinbis E, et al. Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor on development of estrogen receptor-negative mammary tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1825-33.
20. Mulero M, Fernández Raigoso P, Vázquez J, Lamelas ML, Corte D, Allende MT, et al. Significación clínica del contenido tumoral del receptor del factor de crecimiento epidérmico en el cáncer de mama. *Rev Esp Med Nuclear*. 2003;22:386-94.
21. Ferrero JM, Ramaioli A, Largillier R, Formento JL, Francoual M, Ettore F, et al. Epidermal growth factor receptor expression in 780 breast cancer patients: a reappraisal of the prognostic value based on a eight-year median follow-up. *Ann Oncol*. 2001;12:841-6.
22. Harris AL, Nicholson S, Sainbury JRC, Farndon J, Wright C. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: Association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *J Steroid Biochem*. 1989;34:123-31.
23. Klijn JG, Look MP, Portengen H, Alaxieva-Figusch J, Van Putten WL, Foekens JA. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer; results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;29:73-83.