

Protocolo de estudio molecular del oncogén *HER2/neu* en el carcinoma de mama

Montse Verdú Artufel^a, Anna Colomer Valero^b, Ruth Román Lladó^b, Nadina Erill Sagalés^b, Miquel Calvo Llorca^c, Abelardo Moreno Carazo^a, Carlos Cerdón Cardó^{a,b,d} y Xavier Puig Torrus^{a,b}

^aHISTOPAT Laboratoris. Barcelona. España. ^bBIOPAT. Biopatología Molecular. Barcelona. España. ^cDepartamento de Estadística de la Universidad de Barcelona. Barcelona. España. ^dDivision of Molecular Pathology. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. New York. USA.

Antecedentes. El oncogén *HER2/neu* es un determinante biológico predictivo esencial en el cáncer de mama por su papel como diana terapéutica del trastuzumab. No obstante, no se ha llegado aún a consensuar un método de referencia para su estudio.

Métodos. En este trabajo, hemos aplicado y comparado, sobre 222 carcinomas de mama recopilados prospectivamente, los dos ensayos de uso más frecuente para determinar el estado de *HER2/neu*: inmunohistoquímica para expresión de la proteína p185 empleando dos anticuerpos monoclonales (CB11 y TAB250) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), utilizando secciones de tejido incluido en parafina.

Resultados. Los resultados demuestran mayor sensibilidad y especificidad con CB11 (62,5% y 93,4% respectivamente) que con TAB250 (40% y 76,4% respectivamente). El estudio inmunohistoquímico con CB11 es adecuado como prueba inicial para predecir el estado del gen, proporciona un alto valor predictivo negativo (95,5%) en los casos de expresión débil o nula y positivo (96,2%) en los tumores con sobreexpresión. Si la expresión inmunohistoquímica es moderada debe considerarse no concluyente y es indispensable el estudio de FISH. También es recomendable aplicar FISH si hay discordancia entre la expresión de p185 y el perfil morfológico y/o molecular tumoral. Finalmente, aunque la tasa de falsos positivos producidos por estudios inmunohistoquímicos es inferior al 5%, debido a la toxicidad y coste de la terapia con trastuzumab es razonable considerar el empleo sistemático de FISH antes de indicar el tratamiento.

Conclusión. En base a nuestros resultados proponemos un protocolo para el estudio molecular de *HER2/neu*.

Palabras clave: *HER2/neu*, p185, carcinoma de mama, inmunohistoquímica, FISH, trastuzumab.

Verdú Artufel M, Colomer Valero A, Román Lladó R, Erill Sagalés N, Calvo Llorca M, Moreno Carazo A, Cerdón Cardó C, Puig Torrus X. Protocolo de estudio molecular del oncogén *HER2/neu* en el carcinoma de mama. *Clin Transl Oncol*. 2005;7(11):504-11.

Molecular protocol for *HER2/neu* analysis in breast carcinoma

Background. The *HER2/neu* proto-oncogene is frequently over-expressed in breast cancer and serves as a biological target for trastuzumab therapy. However, there is no consensus regarding the technical aspects to be used to define *HER2/neu* status in clinical practice.

Methods. The present study was conducted to address this critical issue by prospectively analysing a large cohort of breast cancer patients (n=222) and using a variety of methods. To define *HER2/neu* expression, detection of its encoded protein (p185) was performed by comparative immunohistochemical (IHC) analysis using two mouse monoclonal antibodies (mAb CB11 and mAb TAB250). To assess *HER2/neu* gene amplification, fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) assays with gene-specific probes were conducted. All procedures were applied to de-paraffinised tissue sections of breast tumour samples.

Results. Results showed that mAb CB11 had increased sensitivity and specificity (62.5% and 93.4%, respectively) compared to mAb TAB250 (40% and 76.4%, respectively) in defining *HER2/neu* amplification. We conclude that *HER2/neu* measurement by IHC using mAb CB11 is an appropriate strategy which provides a high negative predictive value (95.5%) for *HER2/neu* amplification in cases with low or undetectable p185 expression. Conversely, mAb CB11 has a high positive predictive value (96.2%) for *HER2/neu* amplification in cases with p185 overexpression. However, cases with moderate p185 expression need to be considered as inconclusive. In such cases, it is necessary to use FISH measurement to evaluate *HER2/neu* amplification. It is also advi-

Correspondence: Xavier Puig Torrus.
Mendel, 1-3-5.
08054 Barcelona. España.
E-mail: xpuig@histopat.es

Received 7 April 2005; Accepted 11 July 2005.

sable to conduct FISH if there is discordance between p185 expression and the histopathology classification of the lesion, or molecular profile of the tumour. Finally, even though the false positive rate of IHC assay is <5%, the toxicity and cost of trastuzumab therapy suggest that FISH be used systematically prior to implementation of treatment.

Conclusion. We suggest the use of a molecular protocol for *HER2/neu* analysis in this type of tumor.

Key words: *HER2/neu*, p185, breast cancer, immunohistochemistry, FISH, trastuzumab.

INTRODUCCIÓN

El oncogén *HER2/neu* (c-erbB2), localizado en el cromosoma 17q, que codifica una proteína transmembrana de 185 kDa (p185), forma parte de la familia de receptores tirosina quinasa que incluye al receptor del factor de crecimiento epidérmico c-erbB1¹. La sobreexpresión o amplificación de *HER2/neu*, presente en el 10%-30% de los carcinomas infiltrantes de mama^{2,3,4}, se asocia a una mayor agresividad biológica del tumor^{2,4,5} y modifica la respuesta a distintas modalidades de tratamiento^{2-4,6}. La proteína constituye, además, la diana terapéutica del trastuzumab (Herceptin®, Genentech), anticuerpo humanizado anti-*HER2* que se emplea en estadios avanzados de la enfermedad con respuestas clínicas significativas⁷⁻¹⁰.

La indicación de tratamiento con trastuzumab requiere una selección previa de los pacientes candidatos a presentar respuesta clínica. Para ello es necesario desarrollar metodología precisa para el estudio del gen *HER2/neu*^{3,4,9} y su producto. Se han empleado técnicas diversas pero, esencialmente, se ha focalizado el interés en la comparación entre la inmunohistoquímica (IHQ) con distintos anticuerpos monoclonales o policlonales y las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que estudian respectivamente la sobreexpresión de p185 y la amplificación del gen^{4,11}. A pesar de los muchos trabajos publicados en los últimos años, no se ha logrado el consenso acerca de la técnica de estudio de *HER2/neu* que debe utilizarse para indicar el tratamiento con trastuzumab^{4,12-14}. Los primeros ensayos clínicos seleccionaban los pacientes candidatos al tratamiento basándose en la sobreexpresión de la proteína p185 estudiada con técnicas de IHQ. Sin embargo, trabajos más recientes revelan un mayor valor predictivo adscrito a la detección de amplificación del gen^{4,12}.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de estudio molecular de *HER2/neu* para orientar la terapia con trastuzumab. Para ello, nos basamos en la experiencia sobre una serie de carcinomas de mama recopilados de forma prospectiva, integrando ambas técnicas, IHQ y FISH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

Entre marzo de 2000 y septiembre de 2003, se recopilaron prospectivamente muestras tumorales de 234 pacientes tratados quirúrgicamente por carcinoma de mama en distintas áreas del estado español. La muestra inicial constaba de 262 piezas quirúrgicas o biopsias de carcinoma fijadas en formol e incluidas en parafina. Cuarenta de estas muestras (15%) se excluyeron por resultar no valorables al aplicar las técnicas estudiadas, debido al procesamiento inadecuado de los tejidos, incluida la fijación subóptima. En la serie final se incluyeron 222 muestras (216 tumores primarios y 6 recidivas/metástasis). De éstas, 147 especímenes (66%), técnicamente procesados en nuestro laboratorio de forma rutinaria fijando los tejidos en solución de formalina neutra al 10% estabilizada, constituyen un grupo homogéneo (grupo A). Las 75 muestras restantes (34%) procedían de otros laboratorios, ignorándose los detalles sobre las condiciones de fijación y procesamiento tisular empleadas y se consideran un grupo heterogéneo (grupo B). Tras el estudio histopatológico, 204 casos fueron diagnosticados de carcinoma ductal infiltrante, 14 casos de carcinoma lobulillar infiltrante y 4 casos de carcinoma coloide. En términos demográficos, la serie constó de 210 pacientes, 209 mujeres y un varón, con edad promedio de 59±12,4 años (rango 30-97 años).

Anticuerpos para la proteína p185 e IHQ

El estudio de la expresión de la proteína p185 se realizó mediante IHQ utilizando anticuerpos monoclonales de dos clones distintos: TAB250 (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA), y CB11 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK). Estos anticuerpos reconocen distintos epítomos de la proteína p185. Concretamente, TAB250 reconoce un epítipo que abarca varios residuos del dominio extracelular del receptor, mientras que CB11 se une a un epítipo perteneciente al dominio intracitoplasmático.

La técnica de IHQ se realizó por el método de la avidina-biotina/inmunoperoxidasa sobre secciones tisulares de 4 µm desparafinadas en xilol y rehidratadas en etanol de gradación decreciente. Tras el bloqueo de peroxidasas endógenas mediante 0,1% H₂O₂ durante 15 minutos, se procedió a la recuperación antigénica por dos métodos distintos: digestión enzimática con ficina (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) diluida 1:4 a TA durante 10 minutos para TAB250, o por calentamiento en autoclave en tampón citrato 0.1M pH 6.0 a 110°C durante 10 minutos para CB11. El bloqueo del anticuerpo secundario se realizó con suero de caballo (Horse Normal Serum, Jackson, Westgrove, PE) diluido 1:20 durante 20 minutos, seguido de incubación

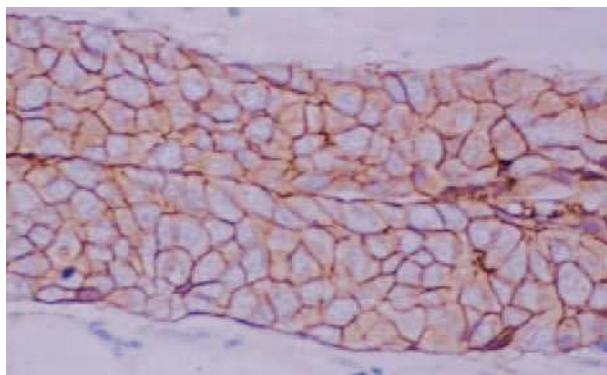


Fig. 1. Inmunohistoquímica (CB11). Sobreexpresión de *HER2/neu*: positividad de membrana intensa y completa (200x).

con el anticuerpo primario, diluido 1:20 para TAB250 y 1:80 para CB11, durante 14-18 h a 4°C en cámara húmeda. A continuación se procedió a una incubación secuencial a temperatura ambiente (TA) con el anticuerpo secundario (Horse-anti-mouse, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) diluido 1:100 durante 40 minutos, seguido con el complejo avidina-biotina (ABC, PK4000 Vectastain ABC kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) diluido 1:100 durante 40 minutos. Finalmente, se procedió al revelado con 3,3'-tetrahidroclouro de diaminobenzidina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), y a la contratinción con hematoxilina de Harris. En todos los procesos de IHQ se incluyeron los correspondientes controles positivos, que fueron secciones de carcinoma de mama de expresión conocida, incluyendo distintos grados de intensidad de expresión de la proteína p185, y controles negativos, por omisión del anticuerpo primario.

Las secciones fueron evaluadas por dos observadores independientes, mediante microscopía óptica. En caso de discordancia, los resultados fueron revisados y consensuados. La inmunorreactividad se evaluó exclusivamente en el componente infiltrativo del tumor y se clasificó numéricamente de la forma siguiente: "3" o expresión de membrana intensa y completa (patrón previamente relacionado con sobreexpresión) (fig. 1), "2" o expresión moderada (positividad de membrana de intensidad moderada, completa o no), "1" o expresión débil (positividad de membrana de intensidad débil, completa o no), y "0" o no evidencia de expresión. En la evaluación no se consideró el porcentaje de células que presentaba inmunorreactividad para la proteína. En los tumores que presentaron un componente intraductal asociado al componente infiltrativo, la expresión de p185 se evaluó únicamente en éste último. Asimismo, en los casos con expresión heterogénea, prevaleció el resultado correspondiente a la expresión de mayor intensidad.

Sondas para el oncogén *HER2/neu* y FISH

La detección de amplificación génica se llevó a cabo utilizando el sistema PathVysion *HER2* DNA Probe Kit (Vysis, Inc., Downers Grove, IL). En éste se incluye, además de una sonda locus específica para *HER2/neu* (LSI *HER2/neu* SpectrumOrange), una sonda centromérica del cromosoma 17 (CEP17 SpectrumGreen) que permite valorar el número de copias de este cromosoma con independencia del estado de amplificación.

El método FISH se realizó en secciones tisulares de 4 µm que, una vez desparafinadas, fueron pretratadas por calentamiento en autoclave, como se ha mencionado anteriormente. A continuación se procedió a una digestión con 50 µg/ml de proteinasa K (P5665 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) en tampón TE a 37°C durante 5-10 minutos, seguida de fijación con formol tamponado a TA durante 10 minutos. Las secciones se desnaturalizaron a 80°C durante 5 minutos en placa calefactora, en presencia de una solución de hibridación constituida por ambas sondas, y la hibridación se realizó a 37°C durante 14-18 horas en cámara húmeda. Finalmente, se realizó un lavado suave con solución de post-hibridación (2×SSC pH7.2 suplementada con 0,3% NP-40) a TA durante 5 minutos para retirar los cubreobjetos, seguido de un lavado astringente con la misma solución a 72°C durante 2 minutos. La contratinción fluorescente de los núcleos se realizó con DAPI.

Los resultados fueron evaluados por dos observadores independientes mediante microscopía de fluorescencia. Para ello se procedió al estudio previo de toda la sección y, tras seleccionar las áreas más representativas de la misma, se contabilizaron las señales correspondientes a ambas sondas en, al menos, 20 núcleos individuales no solapados de células tumorales. El cálculo de la relación entre ambas sondas se realizó siguiendo las indicaciones del sistema PathVysion, calculando el cociente entre el sumatorio de señales locus específicas y el sumatorio de señales centroméricas. Se consideró que las muestras con una relación *HER2/CEP17* igual o superior a 2 presentaban amplificación génica (fig. 2). En caso de existir discordancia entre los observadores, los resultados fueron consensuados. No se evaluó la amplificación del gen correspondiente al componente intraductal de los tumores, en caso de existir éste. En los casos que presentaban una población heterogénea en cuanto a la coexistencia de núcleos con amplificación o sin ella, se contabilizaron únicamente los núcleos amplificados.

En los últimos 105 casos estudiados de la serie se determinó, además del estado de amplificación, la existencia de polisomía. Ésta se define como la presencia de más de dos copias del cromosoma 17 por célula, detectada mediante la observación de un número de señales centroméricas superior a dos, con independencia del número de señales locus específicas.

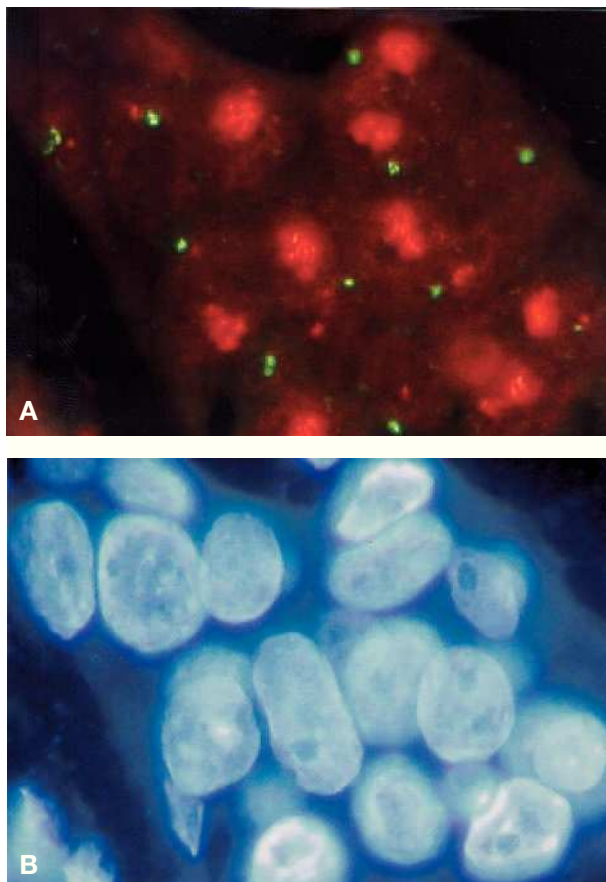


Fig. 2. FISH (*HER2/neu*) en secciones de carcinoma ductal de mama ($\times 1.000$): A: monosomía de cromosoma 17 y amplificación de *HER2/neu*, múltiples señales del locus específico (cociente *HER2/CEP17* > 10) y señal centromérica única (verde). B: contratinción nuclear fluorescente (DAPI) en células neoplásicas.

Análisis estadístico

La posible relación de dependencia entre los resultados de IHQ y FISH se estudió mediante el test χ^2 de Pearson, cuando la muestra tenía un tamaño suficiente, o con la prueba exacta de Fisher en caso contrario. Ambas pruebas se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtuvo un p-valor $< 0,05$. En caso

de existir dependencia, se determinó entre qué parejas de categorías se hallaban diferencias significativas mediante los intervalos de confianza de las *odd-ratio*. Finalmente, se calculó la especificidad, la sensibilidad, y los valores predictivos positivos y negativos de IHQ para cada uno de los anticuerpos en relación con FISH, considerada como técnica de referencia. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete R Versión 1.7.1-2003-06-16[®] (The R Development Core Team) sobre Windows XP profesional.

RESULTADOS

Expresión de la proteína p185

El análisis de los 222 casos mediante IHQ con el anticuerpo TAB250 reveló 18 casos (8,1%) con sobreexpresión, 14 casos (6,3%) con expresión moderada, 44 casos (19,8%) con expresión débil y 146 casos (65,8%) sin evidencia de expresión. Se observó positividad de membrana en el epitelio normal de la mama, con intensidad débil o moderada, en 44 casos (19,8%).

El análisis de los 222 casos estudiados mediante IHQ con el anticuerpo CB11, reveló 26 casos (11,7%) con sobreexpresión, 18 casos (8,1%) con expresión moderada, 123 casos (55,4%) con expresión débil y 55 casos (24,8%) sin evidencia de expresión. Cuarenta y cinco casos de la serie (20,3%) presentaron positividad de membrana en el epitelio normal de la mama, de intensidad débil o moderada. Dieciocho casos (8,1%) presentaron expresión inespecífica granular en el citoplasma.

Amplificación del oncogén *HER2/neu*

El análisis de los 222 casos estudiados por FISH reveló 40 casos (18,0%) con amplificación génica para *HER2/neu*, mientras que los 182 casos restantes (82,0%) resultaron negativos para amplificación. La presencia de polisomía del cromosoma 17 se detectó en 30 de los 105 casos en que ésta fue estudiada (28,6%). Trece de estos casos (43,3%) poseían amplificación del gen *HER2/neu*, mientras que de los 75 casos sin polisomía solo 9 (8,6%) presentaban amplificación.

TABLA 1. IHQ-TAB250 frente a FISH. Agrupación categorías 1 y 2. Intervalos de confianza de las *odd-ratio* FISH negativo / FISH positivo (exactos 99%)

Comparación	Muestra conjunta	Grupo homogéneo	Grupo heterogéneo
1 o 2 frente a 3	2,607 - 429,4 *	0,017 - $+\infty$	4,039 - 968,1 *
1 o 2 frente a 0	0,028 - 0,443 *	0,001 - 0,065 *	0,002 - 7,428
3 frente a 0	0,001 - 0,054 *	0,000 - 0,178 *	0,001 - 0,307 *

0: expresión nula; 1: expresión débil; 2: expresión moderada; 3: sobreexpresión; *indica significación; IHQ: inmunohistoquímica; FISH: hibridación *in situ* fluorescente.

TABLA 2. **Especificidad, sensibilidad y valores predictivos para los dos anticuerpos en relación a los resultados de FISH**

Concepto	IHQ-TAB250	IHQ-CB11
Sensibilidad	40,0%	62,5%
Especificidad	76,4%	93,4%
Valor predictivo +	88,9%	96,2%
Valor predictivo -	95,2%	95,5%
No informativo	26,1%	8,1%

Para el cálculo de estos valores se ha asociado la categoría 3 a FISH positivo en los dos anticuerpos; para IHQ-TAB250 0 a FISH negativo, 1 y 2 a no informativo; para IHQ-CB11 0 y 1 a FISH negativo, 2 a no informativo.

IHQ: inmunohistoquímica; FISH: hibridación *in situ* fluorescente.

Estudio comparativo de TAB250 frente a FISH

Las frecuencias obtenidas permitieron elaborar un modelo para la predicción del estado de *HER2/neu*, que consiste en asignar un valor negativo de amplificación a los casos con IHQ de TAB250 con resultado 0 (95,2% de estas muestras son negativas por FISH) y un valor positivo a los casos con IHQ con resultado 3 (11,1% de estas muestras son negativas por FISH). Las dos categorías restantes de TAB250 no permiten predecir el estado de amplificación del gen, por lo que se agruparon para el resto del estudio y el resultado fue referido como “no concluyente”. Con este modelo de predicción las categorías de TAB250 y FISH presentaron una relación de dependencia significativa (χ^2 ; $p < 10^{-15}$). La tabla 1 resume los análisis dos a dos de las categorías 0, 1+2 y 3, y las diferencias entre ellas. La tabla 2 muestra que el modelo de predicción de *HER2/neu* utilizando TAB250 presenta una sensibilidad del 40%, una especificidad del 76,4%, un valor predictivo positivo del 88,9% y un valor predictivo negativo del 95,2%. A continuación se estudió el impacto que la fijación y el procesamiento tisular ejercía sobre la expresión de la proteína p185 estudiada con el anticuerpo TAB250. Para ello, se compararon los resultados obtenidos al aplicar el modelo de predicción de *HER2/neu* a los dos grupos de muestras establecidos según su procedencia: el grupo A (homogéneo, $n = 147$) y el grupo B (heterogéneo, $n = 75$). Considerando de nuevo las ca-

tegorías 0, 1+2 y 3, se observa en ambos grupos una dependencia global entre las variables (test exacto de Fisher; $p < 10^{-14}$ y $p < 10^{-6}$ para los grupos A y B, respectivamente). La tabla 1 pone de manifiesto que el análisis por parejas de las categorías de TAB250 no detecta diferencias significativas entre las categorías 0 y 1+2 del grupo B. Los porcentajes de amplificación negativa de *HER2/neu* en los grupos A y B son respectivamente del 95,4% y 93,3% para la categoría 0 y del 0,0% y 14,2% para la categoría 3.

En condiciones homogéneas (grupo A) de fijación y procesamiento, 11 de los 12 casos con expresión de membrana débil o moderada (91,7%) presentaron amplificación de *HER2/neu*, frente a los sólo 6 de 46 casos con amplificación (13,0%) en condiciones de fijación heterogéneas (grupo B).

Estudio comparativo de CB11 frente a FISH

Para el anticuerpo CB11, el modelo propuesto consistió en asignar un valor negativo de amplificación de *HER2/neu* a los casos con IHQ de CB11 con resultado 0 o 1 (95,5% de estas muestras son negativas por FISH) y un valor positivo a los casos con IHQ con resultado 3 (3,8% de estas muestras son negativas por FISH). Los casos con IHQ de resultado 2 no permitieron predecir el estado de amplificación de *HER2/neu*, por lo que a estos casos se les asignó el resultado de “no concluyentes”. Con este modelo de predicción en las categorías de CB11 y FISH se detectó una relación de dependencia significativa (χ^2 ; $p < 10^{-15}$). La tabla 3 resume los análisis dos a dos de las categorías 0+1, 2 y 3, y las diferencias entre ellas. La tabla 2 muestra que el modelo de predicción de *HER2/neu* utilizando CB11 presenta una sensibilidad del 62,5%, una especificidad del 93,4%, un valor predictivo positivo del 96,2% y un valor predictivo negativo del 95,5%.

En cuanto a los resultados sobre el impacto del estado tisular en la expresión de p185 estudiada con CB11 y con el modelo de predicción de amplificación de *HER2/neu* que agrupa las categorías 0 y 1, se observa en ambos grupos una dependencia global entre variables (test exacto de Fisher; $p < 10^{-15}$ y $p < 10^{-8}$ para los grupos A y B, respectivamente). La tabla 3 muestra que el análisis por parejas de las categorías de CB11

TABLA 3. **IHQ-CB11 frente a FISH. Agrupación categorías 0 y 1. Intervalos de confianza de las *odd-ratio* FISH negativo / FISH positivo (exactos 99%)**

Comparación	Muestra conjunta	Grupo homogéneo	Grupo heterogéneo
0 o 1 frente a 2	2,309 - 75,28 *	2,587 - 392,5 *	0,149 - 84,09
0 o 1 frente a 3	44,2 - 4,1015 *	41,73 - $+\infty$ *	7,710 - 16384 *
2 frente a 3	2,579 - 7816 *	1,382 - $+\infty$ *	0,624 - 5785

0: expresión nula; 1: expresión débil; 2: expresión moderada; 3: sobreexpresión; * indica significación; IHQ: inmunohistoquímica; FISH: hibridación *in situ* fluorescente.

no detecta diferencias significativas en el grupo heterogéneo al comparar la categoría 2 con las demás, posiblemente debido al reducido tamaño muestral en ésta. Los porcentajes de amplificación negativa de *HER2/neu* de los grupos A y B fueron respectivamente 97,5% y 91,1% para la categoría 0+1 y 0,0% y 7,7% para la categoría 3.

DISCUSIÓN

Ningún método está universalmente aceptado como tecnología de referencia para el estudio de *HER2/neu* en el momento actual. El método predominantemente empleado es IHQ sobre secciones tisulares, por su facilidad de implementación en laboratorios de patología y su reducido coste. Las técnicas de FISH requieren equipamiento y metodologías de mayor complejidad y no son asequibles a la mayoría de laboratorios^{4,12-14}. Tanto IHQ como FISH preservan la morfología tisular, permitiendo la evaluación de la señal molecular en el área específica de interés a nivel microanatómico. También ambas técnicas pueden ser negativamente impactadas por factores diversos relacionados con procesado tisular, reactivos empleados y sistemas de evaluación⁴.

Estudios comparativos entre IHQ y FISH revelan una concordancia significativa; sin embargo no se ha llegado a un protocolo de aplicación consensuado. Se acepta que FISH es un método más objetivo porque permite cuantificar el número de copias del gen. Varios estudios han demostrado buena correlación entre el número de copias génicas y la expresión IHQ de la proteína. Los ensayos clínicos utilizando trastuzumab seleccionan inicialmente pacientes basándose en los resultados de IHQ, aunque estudios recientes han demostrado la mayor utilidad de FISH para predecir mejor la respuesta terapéutica^{4,12}.

Los inconvenientes más importantes atribuidos a la IHQ radican tanto en la variabilidad de resultados entre distintas metodologías, como en la subjetividad del método de evaluación, especialmente en los casos con positivities de intensidad intermedia que, de hecho, no pueden considerarse concluyentes^{12,15}. Una de las variables relevantes es el anticuerpo utilizado¹⁶. Los distintos anticuerpos disponibles varían considerablemente en su capacidad de reconocer a su correspondiente epítipo, así como en la modificación de ésta en función de las condiciones de fijación tisular, proporcionando niveles distintos de sensibilidad y especificidad^{14,17,18}.

El presente estudio compara la expresión IHQ de la proteína p185 en 222 carcinomas de mama con dos anticuerpos distintos (TAB250 y CB11), y el estado de amplificación del gen *HER2/neu* por FISH, considerando ésta última como técnica de referencia. Los resultados ponen de manifiesto que el anticuerpo monoclonal CB11 es más sensible y específico que el

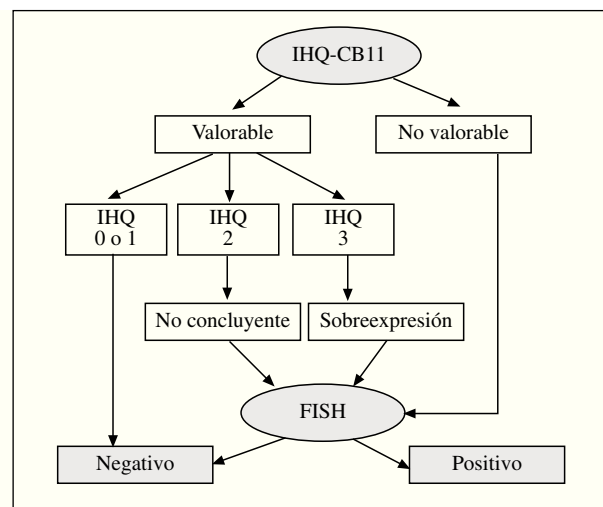


Fig. 3. Algoritmo de estudio de *HER2/neu*. IHQ: inmunohistoquímica; FISH: hibridación *in situ* fluorescente.

anticuerpo TAB250. Su alto valor predictivo, tanto positivo (96,2%) como negativo (95,5%), así como el bajo porcentaje de casos no concluyentes (8,1% frente a 26,1% con TAB250), lo perfilan como un buen candidato para predecir la amplificación de *HER2/neu*. Por otra parte, el anticuerpo CB11 presenta un comportamiento más estable y menos dependiente de las condiciones de fijación y procesado tisular que el anticuerpo TAB250. Sería, por tanto, el inmunorreactivo más recomendable para laboratorios de referencia donde se manejan muestras de orígenes diversos, con mayor probabilidad de condiciones heterogéneas de fijación o procesado.

No obstante, este anticuerpo no está exento de problemas. Un porcentaje reducido de casos (8,1%) presentan tinción granular en el citoplasma de células tumorales que se ha relacionado con internalización del receptor de membrana^{16,19} y no comporta amplificación génica, por lo que debe considerarse artefactual y evaluar únicamente como positividad IHQ la expresión en la membrana celular^{16,19,20}. Cuando este artefacto de citoplasma es acusado, puede dificultar la evaluación del caso al impedir la discriminación de la señal en la membrana. También hemos observado en un número considerable de casos (20,3%) positividad de membrana de baja intensidad en células epiteliales de ductos mamarios normales, tal como se ha descrito en distintos estudios previos, con disparidad de opiniones respecto a su significación^{12,15,21,22}.

La figura 3 ilustra el algoritmo de trabajo propuesto en función de nuestros resultados. La primera aproximación se realiza mediante IHQ utilizando el anticuerpo CB11. Los casos de difícil evaluación por estado tisular subóptimo o expresión artefactual, deben informarse como no valorables. Los casos con expresión de membrana débil o nula (categorías 0 y 1), se informan

como negativos. Según nuestros resultados se obtiene con este anticuerpo un valor predictivo negativo del 95,5% (tabla 2). Los tumores con expresión de membrana intensa y completa (categoría 3) se informan como positivos. El valor predictivo positivo en nuestra serie es del 96,2% (tabla 2). En este grupo de pacientes puede indicarse realizar FISH si se pretende discriminar la sobreexpresión debida a polisomía del cromosoma 17 de la secundaria a amplificación del gen^{4,12,21}. En nuestra serie se detecta polisomía en 30 de 105 casos evaluados para este parámetro (28,6%). En otras series su incidencia supera el 20%¹² y no hay consenso sobre la utilidad del tratamiento con trastuzumab en estos casos^{6,7,10,12}. Por otra parte, aunque los falsos positivos de IHQ representan un bajo porcentaje de casos (inferior al 5% para CB11), por la toxicidad de la terapia con Herceptin® y su elevado coste, tiene sentido considerar el empleo sistemático de FISH en todos los casos con sobreexpresión de membrana, antes de iniciar el tratamiento. El coste adicional que esto supone se limita al de aplicar FISH a un 11,7% de los casos, muy inferior al coste de un solo tratamiento innecesario.

En todos aquellos casos en que la expresión IHQ es moderada (categoría 2), no debe considerarse fiable para predecir amplificación génica. Este resultado inmunohistoquímico debe informarse como no concluyente y realizar siempre FISH para indicar o no el tratamiento con trastuzumab^{7,12,15,21,23}.

En las muestras en estado de preservación subóptimo, evidente o presumible, que pueden generar intensidades de expresión IHQ devaluadas o heterogéneas de difícil categorización (expresión débil frente a moderada, moderada frente a intensa), es importante emplear ambas técnicas si pretendemos disponer de conclusiones fiables para orientar la terapia. Nuestros resultados ponen de manifiesto tasas de error de IHQ respecto a FISH superiores en el subgrupo de casos con condiciones de fijación o procesado heterogéneas, al compararlos con los que fueron estudiados desde un principio en el mismo laboratorio, en condiciones de fijación y procesado conocidas y homogéneas.

Otra circunstancia que hace también recomendable apoyar con FISH los resultados de la IHQ es la descorrelación con uno o varios parámetros del perfil morfológico o molecular tumoral. El tipo histológico y el grado del carcinoma pueden poner de manifiesto discordancias con la expresión de p185. Es infrecuente su sobreexpresión en el carcinoma lobulillar infiltrante convencional²⁴, y en carcinomas ductales grado 1 o variantes de bajo grado². En cambio, es especialmente frecuente en carcinoma intraductal de alto grado²⁵, en la enfermedad de Paget²⁶, en tumores con alta actividad proliferativa y en casos con fenotipo negativo para receptores hormonales^{4,27}.

El algoritmo propuesto (fig. 3) contempla, por tanto, las condiciones de fijación y procesado tisular, el fe-

notipo morfológico tumoral, la expresión IHQ de la proteína de membrana p185 y su correlación con los restantes parámetros moleculares, además de la posibilidad de estudiar con FISH el estado del gen en los casos que lo requieran. Su aplicación prospectiva en otras series de casos puede contribuir a consolidar y consensuar los criterios metodológicos para el estudio de *HER-2/neu*.

Bibliografía

1. Stern DF, Hefferman PA, Weinberg RA. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol*. 1986;6:1729-40.
2. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 1998;16:413-28.
3. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer*. 2000;36:170-6.
4. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted Therapy in Breast Cancer: The HER-2/neu Gene and Protein. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(4):379-98.
5. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER/2-neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-12.
6. Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, et al. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER-2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1071-7.
7. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-26.
8. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 1999;17:2639-48.
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344:783-92.
10. Smith IE. Efficacy and safety of Herceptin® in women with metastatic breast cancer: results from pivotal clinical studies. *Anticancer Drugs*. 2001;12 Supl 4:S3-10.
11. Yeh IT. Measuring HER-2 in breast cancer. Immunohistochemistry, FISH, or ELISA? *Am J Clin Pathol*. 2002;117 Supl:S26-35.
12. Yaziji H, Gown AM. Accuracy and precision in HER-2/neu testing in breast cancer: are we there yet? *Hum Pathol*. 2004;35(2):143-6.
13. Nichols DW, Wolff DJ, Self S, et al. A testing algorithm for determination of HER2 status in patients with breast cancer. *Ann Clin Lab Sci*. 2002;32:3-11.
14. Press MF, Slamon DJ, and Flom KJ. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: Comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol*. 2002;20:3095-105.
15. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16(2):173-82.

16. Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. [Review]. *Diagn Mol Pathol*. 2001;10(3):139-52.
17. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2001; 14(11):1079-86.
18. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol*. 2001;19(10):2587-95.
19. De Potter CR, Schelfout A-M. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Arch*. 1995;426:107-15.
20. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (c-erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol*. 1999;12:827-34.
21. Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Pathol*. 2003;34(10): 1043-7.
22. Acs G, Wang L, Raghunath PN, Salscheider MA, Zhang PJ. Role of different immunostaining patterns in Her-cepTest interpretation and criteria for gene amplification as determined by fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11(3): 222-9.
23. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER2 testing in breast cancer using parallel tissue-based method. *JAMA*. 2004; 291(16):1972-7.
24. Rosenthal SI, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS. Comparison of HER-2/neu oncogene amplification detected by fluorescence *in situ* hybridization in lobular and ductal breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10(1):40-6.
25. Moreno A, Lloveras B, Figueras A, et al. Ductal carcinoma *in-situ* of the breast: Correlation between histologic classification and biologic markers. *Mod Pathol* 1997; 10:1088-92.
26. Wolber RA, DuPuis BA, Wick MR. Expression of cerb B2 oncoprotein in mammary and extramammary Paget's disease. *Am J Clin Pathol* 1991;96:243-7.
27. Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech*. 2002;59:102-8.