

Valoración inmunohistoquímica de la expresión de *c-erb B2* como variable independiente en el carcinoma mamario T2N1 patológico

F. Vicente García*, B. Larrinaga**, M.C. Miranda Murua*, P. Soriano Gil Albarelllos**, A. Calvo Benito* y J.M. Lera Tricas*

*Servicio de Cirugía General y digestiva. **Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Navarra. Pamplona.

Resumen

Introducción. La incidencia de carcinoma mamario oscila entre 11 y 80 casos por 100.000 mujeres/año. El desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica, para la determinación de marcadores tumorales ha posibilitado la realización de trabajos retrospectivos que nos permitan valorar su utilidad como factores pronósticos. Diversos trabajos relacionan la sobreexpresión de *c-erb B2* con factores pronósticos. El objeto de nuestro estudio es determinar si la sobreexpresión de *c-erb B2* es un factor pronóstico independiente en el grupo de pacientes seleccionado.

Pacientes y métodos. Se trata de 83 pacientes intervenidas entre 1980 y 1990 por carcinoma ductal infiltrante de mama, T2N1 patológico.

Hemos utilizado el kit Super Sensitive Immunodetection System de Biogenex, para la determinación de *c-erb B2*.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se ha realizado mediante las pruebas de χ^2 para variables cualitativas y la t de Student y análisis de la variancia para variables cuantitativas.

Resultados. El 35% de las pacientes mostró sobreexpresión de *c-erb B2*. El 48% de las pacientes presentó progresión de la enfermedad. No hemos encontrado diferencias significativas al comparar sobreexpresión de *c-erb B2* con ningún parámetro estudiado salvo una relación inversa, estadísticamente significativa, entre *c-erb B2* y receptores estrogénicos ($p = 0,0403$).

Conclusiones. El *c-erb B2* determinado mediante inmunohistoquímica no es un factor independiente

de pronóstico en carcinomas ductales infiltrantes de mama T2N1.

Los receptores estrogénicos presentan una relación inversa con *c-erb B2* con significación estadística.

Palabras clave: Cáncer de mama. *c-erb B2*. Pronóstico. Inmunohistoquímica.

(*Cir Esp* 2001; 70: 142-146)

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF C-ERB B2 EXPRESSION AS AN INDEPENDENT VARIABLE IN T2 N1 BREAST CARCINOMA

Introduction. The incidence of breast carcinoma oscillates between 11 and 80 cases per 100,000 women/year. Due to the development of immunohistochemical techniques for the determination of tumoral markers, retrospective studies can be performed to evaluate their utility as prognostic factors. Several studies have associated *c-erb-B2* overexpression with prognostic factors. The aim of this study was to determine whether *c-erb B2* overexpression is an independent prognostic factor in the group of patients selected.

Patients and methods. We studied a series of 83 women who underwent surgery for infiltrating T2 N1 ductal carcinoma of the breast between 1980 and 1990. The Biogenex super sensitive immunodetection system was used to determine *c-erb B2*. In the statistical analysis the Chi-squared test and Student's t-test were used to evaluate qualitative variables and analysis of variance was used to evaluate quantitative variables.

Results. Thirty-five percent of the patients showed overexpression of *c-erb B2*. Forty-eight percent of the patients showed disease progression. No significant differences were found in the comparison between *c-erb B2* overexpression and the other variables studied except an inverse, statistically significant relationship between *c-erbB2* and estrogen receptors ($p = 0.0403$).

Correspondencia: Dr. F. Vicente García.
Servicio de Cirugía General. Hospital de Navarra.
Irunlarrea, 3. 31008 Pamplona.

Aceptado para su publicación en junio de 2001.

Conclusions. Immunohistochemically-determined *c-erb B2* is not an independent prognostic factor in T2 N1 infiltrating ductal carcinoma of the breast. Estrogen receptors present a statistically significant inverse relationship with *c-erb B2*.

Key words: Breast cancer. *C-erb B2*. Prognosis. Immunohistochemistry.

Introducción

El carcinoma mamario es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres de los países desarrollados. La incidencia de la enfermedad varía entre distintos países, oscilando entre 11 y 80 casos por 100.000 mujeres/año. En Navarra se estima que la incidencia (tasa estandarizada) de la enfermedad se sitúa en 60,8 casos/100.000 mujeres/año¹. Durante años se han intentado fijar los factores que orientaran sobre la evolución de estos tumores, y se ha reconocido que los de mayor significación pronóstica, hasta la actualidad, son el tamaño tumoral y la afección axilar²⁻⁴. En los últimos años se han estudiado otros factores relacionados con la biología tumoral y su posible relación con el comportamiento evolutivo de la enfermedad (Labelling index, PCNA, Ki67, etc.). Más recientemente, se han desarrollado técnicas que intentan determinar la implicación de ciertos genes en el desarrollo de los tumores y su posible valor pronóstico. Inicialmente, estos estudios precisaban la realización de su determinación con material no incluido en parafina, lo que limitaba su utilización. El desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica para la determinación de alguno de ellos ha posibilitado la realización de trabajos retrospectivos que nos permitan valorar su utilidad como factores pronósticos.

Varios de estos genes reciben y propagan señales para la proliferación y diferenciación celular; pueden también manifestar una tendencia a la disfunción y anormal crecimiento de las células neoplásicas. Cuando funcionan normalmente, estos genes son conocidos como protooncogenes, pero cuando son activados son denominados oncogenes o genes causantes de cáncer. Los protooncogenes pueden ser activados por diversas vías (una mutación somática en la que se cambia la secuencia en una o varias bases de ADN, una translocación cromosómica, por efecto viral o por sobreexpresión de un gen –efecto conocido como amplificación–).

El *c-erb B2* es un protooncogén, también conocido como *HER2-neu*, que está ligado a un gen relacionado con el receptor de crecimiento epidérmico de la superficie celular, y su activación se produce por mutaciones somáticas.

Diversos trabajos de investigación relacionan la sobreexpresión de *c-erb B2* con determinados factores pronósticos, como la afección ganglionar axilar, la supervivencia o el intervalo libre de enfermedad^{5,6}. Otros estudios, por el contrario, no encuentran relación entre el mismo y los parámetros clásicos de pronóstico tumoral en pacientes con ganglios negativos⁷. El objetivo del trabajo es deter-

minar si la expresión de *c-erb B2* es un factor pronóstico independiente entre pacientes diagnosticadas de carcinoma en estadio II patológico con ganglios positivos y valorar la existencia de relaciones entre los parámetros clásicos de pronóstico tumoral y *c-erb B2*.

Pacientes y métodos

Hemos estudiado, retrospectivamente, a 83 pacientes intervenidas de carcinoma ductal infiltrante de mama con un tamaño tumoral patológico comprendido entre 2 y 5 cm, presentando todos los casos afección axilar (estadio II patológico [T2N1]). Las pacientes habían sido intervenidas entre 1980 y 1990.

Recogida de datos

Hemos obtenido los datos clínicos evolutivos (intervalo libre de enfermedad [ILE], fallecimiento y supervivencia), así como los datos diagnósticos (tamaño tumoral, afección ganglionar, grado histológico y receptores hormonales) de las historias de las pacientes procedentes del archivo de historias clínicas.

Determinación de *c-erb B2*

La determinación de la expresión de la proteína se ha realizado mediante un sistema de detección de peroxidasa conjugada con biotina-estreptavidina utilizando el kit Super Sensitive Immunodetection System de Biogenex. Los cortes histológicos se desparafinaron con calor a 60 °C, y se rehidrataron con lavados sucesivos de xilol, alcohol absoluto, alcohol 70°, agua corriente y agua destilada a razón de 5 min cada fase.

Los resultados del estudio se valoraron por dos patólogos, considerando cuatro categorías en relación con la intensidad de la tinción de la membrana celular: negativo, 1+, 2+ y 3+. La lectura del resultado fue realizada por dos patólogos con experiencia en estudio IHQ y, en caso de discordancia, era estudiado por un tercer facultativo con experiencia.

Para comprobar la especificidad de la reacción se realizaron controles positivos y negativos en cada prueba.

Análisis estadístico

Para el estudio estadístico de los datos obtenidos hemos utilizado el método de las tablas de contingencia χ^2 para variables cualitativas y la *t* de Student y análisis de la variancia para variables cuantitativas. Se ha utilizado el programa estadístico para ordenador personal (Mc) STATVIEW™ SE+GRAPHICS (Abacus Concepts).

Resultados

La edad media de las pacientes estudiadas ha sido de 56 años, con un rango comprendido entre 36 y 82 años (DE, 11).

El tamaño medio de las lesiones extirpadas ha sido de 3 cm (rango: 2-5). La linfadenectomía axilar practicada señaló una media de 14,4 ganglios aislados con un mínimo de 5 y un máximo de 30.

Todas las pacientes presentaban afección axilar, siendo la media de adenopatías metastásicas de 4. La afección osciló entre 1 y 14 (DE, 2,98), la mayor parte de las pacientes presentaba afección entre 1 y 3 adenopatías (52,8%). En la tabla 1 se recoge la distribución de los casos según el número de adenopatías con afección metastásica.

El grado histológico de la lesión fue de grado II en el 61% de los casos estudiados, un 25% de casos fue de

TABLA 1. Distribución de los casos según el número de ganglios afectados

Ganglios afectados	1 a 3	4 a 10	> 10
N.º de casos	43 (51,8%)	36 (43,4%)	4 (4,8%)

TABLA 2. Resultados de la determinación de receptores hormonales

	Positivos	Negativos	Total
Receptores de estrógenos	27 (65,9%)	14 (34,1%)	41
Receptores de progesterona	24 (64,9%)	13 (35,1%)	37

TABLA 3. Evolución de la enfermedad en el período del estudio

Estado	Casos	%
Viva sin enfermedad	41	49,4
Fallecimiento sin enfermedad	2	2,4
Viva con enfermedad	8	9,6
Fallecimiento con enfermedad	32	38,6

grado III y un 14 % de grado I.

La determinación de receptores hormonales no se practicó en todos los pacientes (receptores estrogénicos en 41 casos y de progesterona en 37 casos) por disponer de poco material de reserva para efectuar estos estudios. Los resultados se recogen en la tabla 2.

Del total de las pacientes estudiadas, 40 (48%) presentaron progresión de la enfermedad en el período de estudio, 6 de ellas en el primer año tras el tratamiento quirúrgico, 7 en el segundo, 7 en el tercero, 5 en el cuarto, 5 en el quinto, 5 entre el sexto y el séptimo y 2 a los 8 y 17 años de evolución. Treinta y dos mujeres fallecieron durante este período a causa de la enfermedad, dos pacientes fallecieron sin progresión de la enfermedad tras 80 y 180 meses de evolución y 41 permanecían libres de enfermedad al cierre del estudio (tabla 3).

Hemos estudiado los resultados obtenidos de la expresión de *c-erb B2*, considerando como sobreexpresión todos los casos en los que el resultado fue 1+, 2+ y 3+. El 35% de las pacientes presentó sobreexpresión presentando el 13% 1+, el 13% 2+ y el 8% 3+ (tabla 4). No hemos encontrado diferencias significativas al comparar los resultados en relación con la edad de las pacientes ($p = 0,1025$), tamaño patológico ($p = 0,8986$) y ganglios afectados ($p = 0,5133$). En las pacientes con progresión de la enfermedad no hemos encontrado diferencias en cuanto al intervalo libre de enfermedad (ILE) en relación con la sobreexpresión de *c-erb B2* ($p = 0,8108$). Hemos encontrado una relación inversa estadísticamente significativa entre *c-erb B2* y receptores estrogénicos ($p = 0,0403$), y no así con los de progesterona ($p = 0,0668$), al comparar los resultados en relación con el grado histológico no hemos encontrado diferencias significativas ($p = 0,5707$), pero sí se observa una tendencia a una mayor positividad con la progresión del grado histológico (tablas 5-9).

Al estudiar los resultados sobre la base de la progresión de la enfermedad en relación con la edad, tamaño

TABLA 4. Resultados de *c-erb B2*

Resultados	Casos	%
Negativo	54	65
1+	11	13
2+	11	13
3+	7	8

TABLA 5. Resultados comparativos de *c-erb B2* en relación a parámetros clínicos (edad e ILE –en las que progresaron–) y patológicos (ganglios afectados y tamaño)

	<i>c-erb B2</i> positivo	<i>c-erb B2</i> negativo	p
Edad media	53	57	0,1025
Test patológico	3	3	0,8986
Media ganglios positivos	4	4	0,5133
ILE (media)	45	47	0,8108

ILE: intervalo libre de enfermedad.

TABLA 6. Resultados comparativos de *c-erb B2* en relación con la progresión de la enfermedad ($p = 0,248$)

	<i>c-erb B2</i> positivo	<i>c-erb B2</i> negativo
Progresión	17 (42,5%)	23 (57,5%)
Libres de enfermedad	12 (27,9%)	31 (72,1%)

TABLA 7. Resultados comparativos de *c-erb B2* en relación con receptores de estrógenos ($p = 0,0403$)

	<i>c-erb B2</i> positivo	<i>c-erb B2</i> negativo
Receptores de estrógenos positivos	7 (24%)	20 (76%)
Receptores de estrógenos negativos	9 (67%)	5 (33%)

patológico, número de ganglios afectados, afección ganglionar por grupos, receptores hormonales (de estrógenos y de progesterona) y sobreexpresión de *c-erb B2*, no hemos encontrado diferencias con significación diagnóstica entre los dos grupos.

Discusión

La proteína *c-erb B2* es un receptor de membrana con actividad tirosinasa y que ejerce su papel oncogénico por sobreexpresión de la misma. El principal mecanismo por el que se produce sobreexpresión de la proteína es una amplificación de un gen localizado en 17q11-q12 en una amplia mayoría de los casos^{8,9}.

Desde que en 1987 Slamon et al¹⁰ presentaran un estudio en el que se relacionaba la amplificación de *HER-2/neu (c-erb B2)* con la mala evolución en pacientes con cáncer mamario, son muchos los trabajos que han relacionado la amplificación de este gen, o la sobreexpresión de la proteína, como asociado a mal pronóstico¹¹⁻¹⁴; por otro lado, gran número de trabajos lo presentan como un factor de mal pronóstico en pacientes con ganglios metastásicos¹⁵⁻¹⁹. El interés por el estudio de este oncogén o

TABLA 8. Resultados comparativos de *c-erb B2* en relación con receptores de progesterona ($p = 0,0668$)

	<i>c-erb B2</i> positivo	<i>c-erb B2</i> negativo
Receptores de progesterona positivos	6 (25%)	18 (75%)
Receptores de progesterona negativos	8 (61,5%)	5 (38,4%)

TABLA 9. Resultados comparativos de *c-erb B2* en relación con grado histológico ($p = 0,5707$)

	<i>c-erb B2</i> positivo	<i>c-erb B2</i> negativo
Grado I	1 (20%)	4 (80%)
Grado II	8 (32%)	17 (68%)
Grado III	12 (45,5%)	31 (54,5%)

la expresión de su proteína ha aumentado al haberse presentado gran número de trabajos que los relacionan con la resistencia a determinados protocolos quimioterápicos, si bien no vamos a entrar en este tema por no ser el objetivo de nuestro estudio.

En el estudio realizado con nuestra serie, en todos los casos con ganglios positivos y tumores comprendidos entre 2 y 5 cm, hemos encontrado resultados que contrastan con los publicados por otros grupos y que podrían deberse a las características del grupo estudiado.

Con respecto a la sobreexpresión de la proteína *c-erb B2*, nuestros resultados ofrecen cifras inferiores a las presentadas por Gallegos et al y Abadjian et al^{20,21}, estando mas próximas a las presentadas por otros autores^{11,12,16,19}.

Al analizar comparativamente la expresión de *c-erb B2* en relación con los parámetros clásicos de pronóstico podemos observar que: no hemos encontrado relación entre sobreexpresión de *c-erb B2* y el tamaño tumoral, lo que concuerda con los datos publicados en otros estudios^{19,21}. Gusterson et al¹⁶, en un estudio sobre 760 casos de pacientes sin afectación axilar, sí ha encontrado diferencias entre los tumores pT1 y el resto de tumores. En nuestra serie era previsible la inexistencia de diferencias por la naturaleza de la muestra.

En algunos estudios se han encontrado diferencias en cuanto a la expresión de proteína y la afectación axilar, con muestras que incluían pacientes con N0 y N1-2^{12,14,15}. Por el contrario, otros ensayos no parecen encontrar estas diferencias entre la proteína y la afectación axilar²⁰, lo que concuerda con nuestros resultados ya que no hemos encontrado diferencias ni en cuanto al número de ganglios afectados ni al considerarlos en grupos (1 a 3, 4 a 10 o más de 10) según la afectación.

Con respecto al grado histológico, no hemos encontrado relación significativa con expresión de la proteína; este hecho es comunicado en otras series^{12,21}. Otros autores sí relacionan el grado histológico con la positividad de la prueba^{16,19,20}.

Los resultados de la determinación de receptores hormonales se han relacionado estadísticamente de manera inversa con el *c-erb B2*, lo que podría hacer pensar en

una asociación pronóstica entre ellos^{12,16,22}. En nuestra serie hemos podido observar esta misma asociación entre receptores hormonales de estrógenos y la expresión de *c-erb B2* aunque, teniendo en cuenta el escaso número de pacientes estudiados por nosotros, no podremos más que, a la vista de nuestros resultados, confirmar lo evidenciado por otros autores.

La valoración de la expresión de *c-erb B2* en pacientes con afección axilar ha sido estudiada con cierta profusión, ya que la amplificación del gen o sobreexpresión de la proteína se ha identificado como un factor pronóstico tanto de intervalo libre de enfermedad como de supervivencia^{14-19,23,24}. En nuestra serie los resultados discrepan de los presentados en la bibliografía referidos a pacientes con N⁺. Consideramos que esta discrepancia podría deberse a que hemos seleccionado un grupo para el estudio con el mismo tipo histológico (ductal infiltrante), tamaño similar y afección axilar en todos los casos. Las características de esta selección podrían hacer desaparecer posibles diferencias que irían, tal vez, ligadas a alguna de estas variables o al tamaño de la muestra.

Podríamos establecer, a modo de conclusión, los siguientes puntos:

- El *c-erb B2* determinado mediante inmunohistoquímica sobre cortes de parafina no es un factor independiente de pronóstico tumoral en tumores ductales infiltrantes de mama T2N1.

- Existe una tendencia a mayor positividad de *c-erb B2* con mayor grado histológico aunque sin significación estadística.

- No hay relación entre la expresión de *c-erb B2* y la edad de presentación, tamaño del tumor, y evolución de la enfermedad en el grupo estudiado.

- Los receptores estrogénicos presentan una relación inversa con *c-erb B2* con significación estadística en nuestra serie.

Bibliografía

1. Registro de Cáncer de Navarra. Incidencia de Cáncer en Navarra. 1993-1994. An Sist San Navarra 1999; 22: 383-392.
2. Donegan W. Tumor-related prognostic factor for breast cancer. Cancer J Clin 1997; 47: 28-51.
3. International Breast Cancer Study Group (IBCS). Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancer. Lancet 1990; 335: 1565-1568.
4. Johnstone F. Carcinoma of the breast: influence of size of primary lesion and life node involvement based on selective biopsy. Am J Surg 1972; 972 (124): 158-164.
5. Kalloniemi O, Holli P, Visakorpi T, Koivula T, Helin H, Isola J. Association of *c-erb B2* oncogene over-expression with high rate of cell proliferation, increase risk for visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. Int J Cancer 1991; 49: 650-655.
6. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. ERB B2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. Oncogene 1991; 6 (1): 137-143.
7. Elledge R, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. Clin Cancer Res 1998; 4 (1): 7-12.
8. Hollywood D, Hurst H. Targeting gen transcription: a new strategy to down regulate *c-erb B2* expression in mamary carcinoma. Br J Cancer 1995; 71: 753-757.
9. Hollywood D, Hurst H. A novel transcription factor, OB2-1, is required

- for overexpression of the proto-oncogene c-erb B2 in mammary tumour lines. *EMBO J* 1993; 12 (6): 2369-2375.
10. Slamon D, Clark G, Wong S et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
 11. Lonn U, Lonn S, Nilsson B, Stenkvist B. Prognostic value of erb-B2 and myc amplification in breast cancer imprints. *Cancer* 1995; 75: 2681-2687.
 12. Seshadri R, Fargnair FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11 (10): 1936-1942.
 13. Mauriac L, McGrogan G, Avril A, Durand M, Floquet A, Debled M et al. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast carcinoma larger than 3 cm: a unicentre randomized trial with a 124 month median follow-up. Institut Bergonie Bordeaux Groupe Sein (IBBGS). *Ann Oncol* 1999; 10 (1): 47-52.
 14. Midulla C, Giovagnoli M, Valli C, Vecchione A. Correlation between ploidy status, erb-B2 and p53 immunohistochemical expression in primary breast carcinoma. *Ann Quant Cytol Histol* 1995; 17 (3): 157-162.
 15. Quenel N, Wafflard J, Bonichon F. The prognostic value of c-erb B2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 283-291.
 16. Gusterson B, Gelber R, Goldhirsch KP et al. Prognostic importance of c-erb B2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10 (7): 1049-1056.
 17. Hartmann L, Ingle J, Wold L. Prognostic value of c-erb B2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer: result from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer* 1994; 74: 2956-2963.
 18. Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node positive breast cancer: the influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994; 1994 (73): 2359-2365.
 19. Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30 year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10 (7): 1044-1048.
 20. Gallegos M, González S, Leon A, Claire R, Goñi I, Andrade LD. Marcadores tumorales inmunohistoquímicos en carcinoma ductal infiltrante de la mama. *Rev Med Chil* 1998; 126 (10): 1216-1223.
 21. Abadjian G, Antoun R. Carcinomes mammaires: evaluations des récepteurs hormonaux et des marqueurs pS2, erb B2 p-glycoprotéine et Ki 67. *J Med Liban* 1996; 44 (1): 10-15.
 22. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14 (10): 2702-2708.
 23. Tiwari R, Borgen P, Wong G. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 1992; 12: 419-425.
 24. Lonn U, Lonn S, Nilsson B, Stenkvist B. Prognostic significance of c-erb B2 and int-2 amplification compared with DNA ploidy, S-phase fraction, and conventional clinicopathological features. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29 (3): 237-245.