

EXPRESIÓN DE Her-2/neu EN CÁNCER DE MAMA

G Peiró Cabrera

Dpt Patologia/Unitat d'Investigació. Hospital General Universitari,
Alacant

El gen *human epidermal growth factor receptor 2* (Her-2/neu o c-erbB2) (17q21) codifica una glucoproteína transmembrana de 186 kD. Pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico (receptores tirosín-kinasa). No tiene un ligando específico, pero se cree que forma heterodímeros con otros miembros de esta familia de receptores (p.e. EGFR1) y responde a ligandos circulantes (p.e. EGF). Está implicado en mecanismos de crecimiento, supervivencia y diferenciación celular. Aproximadamente 20-30% de cánceres de mama (CM) tienen sobreexpresión y/o amplificación. Her-2/neu es una diana molecular cuya precisa valoración en el CM es esencial para las nuevas terapias dirigidas. Además de su valor pronóstico, la selección de las pacientes tiene interés por la cardiotoxicidad y el alto coste del tratamiento. El mejor método para la identificación de las pacientes que pueden responder a Trastuzumab es fuente de controversia. En un informe de consenso publicado recientemente se concluye que cualquier método para la valoración de Her-2/neu es válido, siempre que la tecnología esté completamente validada y apoyada por un programa de control de calidad tanto interno como externo.

Entre los numerosos **métodos para la valoración** del status de Her-2/neu, los más ampliamente utilizados son la **inmunohistoquímica** (IHQ) para la determinación de la expresión proteica y la **hibridación in situ de fluorescencia** (FISH) para la amplificación del gen. Los niveles de detección por estos métodos son muy variables entre los diferentes laboratorios, por lo que suelen ser una fuente potencial de confusión entre los clínicos. Entre las **ventajas** de la IHQ se incluyen su disponibilidad, relativo bajo coste, preservación de las preparaciones teñidas y el uso de

microscopio de rutina para su evaluación. Entre las **desventajas** cuentan el almacenamiento, la variabilidad en el tiempo y tipo de fijación, intensidad de la recuperación antigénica, tipo de Ac (mono- vs policlonal) y diferentes diluciones, naturaleza de las muestras de control, y lo más importante, la subjetividad en la evaluación de los resultados. Los resultados de *United Kingdom National Quality Assessment Scheme for Immunohistochemistry* (UK NEQAS-ICC) sugieren que el factor más importante de la falta de reproducibilidad es el sistema de valoración de Her-2/neu aplicado por cada laboratorio. Para mejorar el nivel de consistencia, algunas casas comerciales han desarrollado presentaciones en forma kit (HercepTest; Dakocytomation) que han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos como test clínico para seleccionar a las pacientes con CM candidatas a tratamiento con Trastuzumab. La concordancia entre HercepTest y otros Ac comercializados es buena. El inconveniente es su alto coste, por lo que algunos autores apoyan el uso de Ac, especialmente monoclonales, con protocolos de IHQ de rutina. El empleo de HercepTest se recomienda en aquellos laboratorios cuya consistencia en los resultados no es fiable.

Los factores más importantes para mejorar la calidad de la IHQ son la standardización de la fijación del tejido y procesamiento, el uso de controles positivos y negativos, así como la participación en programas de control de calidad externos. Recientemente se han implementado criterios muy estrictos en algunos países para garantizar que los laboratorios mantengan los estándares y excluyen aquellos que no los cumplen. Los laboratorios que determinan Her-2/neu deben realizar el suficiente número de casos (aproximadamente 250 al año) para poder mantener su experiencia en este campo.

Los **criterios** más ampliamente aplicados para la evaluación de la tinción son los recomendados por DakoCytomation: (0) tinción de membrana <10%, (1+) leve/ imperceptible de membrana incompleta >10%, (2+) débil/moderada completa o incompleta >10% y (3+) marcada completa de membrana >10%. Es muy importante valorar los controles externos (positivo y negativo), así como el buscar detalles en la

propia preparación (p.e. epitelio benigno negativo) para comprobar si ha habido algún problema en la tinción. Her-2/neu no amplificado puede expresarse en el epitelio normal, por lo que técnicas IHQ o diluciones del Ac inadecuadas pueden inducir tinción de membrana marcada en epitelio benigno, lo que conlleva a clasificar un tumor de positivo cuando ni tiene sobreexpresión ni amplificación. En ocasiones, la naturaleza del tumor (tubular o lobulillar) debe alertar sobre su fiabilidad. Tumores con diferenciación apocrina pueden sobreexpresar Her-2 sin estar amplificados. Hay que tener en cuenta que Herceptin va dirigido a la proteína expresada en la membrana citoplasmática y por lo tanto, la tinción nuclear o del citoplasma no debe ser valorada, además de ser muy poco probable que refleje amplificación.

La mayoría de estudios interlaboratorios e interobservadores muestran acuerdo hasta 97% utilizando tanto diferentes Ac como diferentes métodos inmunohistoquímicos de detección. Los resultados de IHQ obtenidos con CB11 y TAB250 o mejor incluso FISH, se correlacionan con la respuesta a tratamiento.

En la práctica habitual se clasifican 0 y 1+ como negativos, los 3+ como positivos y los indeterminados ó 2+ se suelen analizar además con algún método molecular, habitualmente FISH. Los tumores positivos (3+) están generalmente amplificados. El grupo intermedio (1+ y 2+) cuando se confirma el número de copias del gen, no suelen estarlo la mayoría. Entre las causas de sobreexpresión sin amplificación se consideran las alteraciones de los mecanismos de la expresión del gen, aneuploidía o la alta sensibilidad de los Ac, entre otras.

La actitud más ampliamente aceptada es el analizar por IHQ el nivel de expresión de Her-2/neu y sólo los casos con resultados indeterminados (2+) analizar con FISH. Sin embargo, en algunos países se recomienda confirmar todos los 2+ y 3+ por FISH o CISH. Las ventajas que tiene es que se detectan los 3+ falsos positivos (hasta 10%) y no hace falta distinguir entre 2+ y 3+, en ocasiones difícil y subjetivo. En un futuro próximo puede incluso que se incluyan los 0 y 1+. Al parecer, esta aproximación tiene sus

ventajas tanto para el paciente como desde el punto de vista económico.

Datos recientes apoyan la IHQ como primer método de elección a la hora de evaluar Her-2/neu. La concordancia con FISH es hasta 95% según series. FISH se considera una técnica precisa y reproducible, pero los requerimientos para su realización hace que no esté disponible en muchos laboratorios de patología. El desarrollo reciente de la *hibridación in situ chromogénica (CISH)*, que es una modificación de la técnica de FISH, es una alternativa muy atractiva para detectar amplificación, sobre todo para aquellos laboratorios menos dotados. Estudios recientes muestran excelente correlación entre ambos. Este método no está todavía aprobado por la FDA.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) ha sido utilizada predominantemente para detectar mRNA Her-2/neu en sangre periférica y médula ósea. Con el desarrollo de la microdissección por láser y la aceptación de la RT-PCR como técnica de rutina fácil y reproducible, puede que en un futuro muy próximo sea utilizada como método de screening rápido en la determinación de Her-2/neu.

Her-2 está sobreexpresado en tumores de alto grado, carcinomas ductales *in situ* extensos, enfermedad de Paget mamaria o extramamaria, en las metástasis de tumores 1º con sobreexpresión, alto nivel de proliferación, negatividad para receptores hormonales, mutación de p53, amplificación de topoisomerasa II- α , entre otros. Además, la expresión no se modifica tras tratamiento.

Numerosos estudios apoyan su valor **pronóstico** solo o combinado con el status ganglionar, por su asociación a un comportamiento más agresivo de la enfermedad, conllevando a recidivas más precoces y supervivencia más corta.

Herceptin/Trastuzumab es un Ac murino humanizado clase IgG1 monoclonal desarrollad por Genentech (San Francisco, CA, USA) y comercializado por Roche (Nutley, NJ, USA). Está dirigido contra la proteína que se expresa en la membrana citoplasmática e induce la muerte celular. Inicialmente se administró a pacientes con cáncer de mama en estadio avanzado cuyos tumores sobreexpresaban Her-2 y más

recientemente a pacientes en estadios más precoces así como en neoadyuvancia.

Se ha argumentado que los tests actuales para determinar la expresión o amplificación no necesariamente reflejan la actividad funcional del receptor. De hecho, el receptor debe estar activado/fosforilado para poder realizar sus funciones. El papel de Her-2 fosforilado como predictor de respuesta a Trastuzumab se desconoce en la actualidad.

En conclusión, la inmunohistoquímica se considera el método de elección en la detección rutinaria de Her-2/neu, siguiendo procedimientos standardizados y adoptando controles de calidad apropiados. Los casos indeterminados (2+) deben confirmarse con técnicas moleculares (FISH o CISH).

BIBLIOGRAFÍA

- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. Science 1989;244:707-712.
- Mass RD, Press M, Anderson S, et al. Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization. Proc Am Soc Clin Oncol 2001;20:85
- Jacobs TW, Gown AM, Yazij H, et al. Her-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. Am J Clin Pathol 2000;11:171-5.
- Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. J Clin Oncol 2001; 19(2):354-63.
- Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. Am J Pathol 2000;157(5):1467-72.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: Biomarker and target of therapy. The Oncologist 2003;8:307-325.

- Lewis F, Jackson P, Lane S, et al. Testing for HER2 in breast cancer. *Histopathology* 2004;45:207-217
- Isola J, Tanner M, Forsyth A, et al. Interlaboratory comparison of HER-2/neu Oncogene amplification as detected by Chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2004;10:4793-98.