

## Amplificación del oncogén Her-2/neu en el carcinoma mamario

La determinación del estado de amplificación génica del Her-2/neu es crucial en el cáncer de mama porque permite seleccionar pacientes que se beneficiarían del tratamiento con trastuzumab. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal diseñado específicamente para reconocer y unirse a la proteína HER2. Según trabajos clínicos publicados, reduce un 50% el riesgo de recurrencia del cáncer en estadio temprano (utilizado en adyuvancia durante el lapso de un año)<sup>1</sup> y reduce un 20% el riesgo relativo de muerte en pacientes con cáncer de mama metastásico (asociado a quimioterapia vs. quimioterapia solamente)<sup>2</sup>. La amplificación del oncogén Her-2/neu determina que cada copia del gen puede ser transcripta y traducida llevando a una sobreproducción de ARNm y de la proteína correspondiente. La célula normal que expresa HER2 posee amplificación del gen Her-2/neu y alrededor de 50 000 copias de la proteína en la membrana celular<sup>3</sup>. Las células tumorales pueden tener un incremento en el número de receptores a nivel de la membrana citoplasmática de hasta 20 veces sobre el valor normal, conduciendo a la célula a un crecimiento descontrolado. La amplificación/sobreexpresión de oncogén en el tejido tumoral mamario es positiva en el 25-30% de los casos<sup>4</sup>. Existen diferentes maneras de detectar la amplificación del gen Her-2/neu o el incremento en la expresión de la proteína HER2 en el tumor. Si se quiere detectar la amplificación génica se puede utilizar *Southern Blot*, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o PCR; para el aumento del transcrito *Northern Blot*, y para el aumento de la proteína HER2 *Western Blot* o inmunohistoquímica (IHQ). La técnica elegida por los laboratorios de Anatomía Patológica por ser costo/beneficio sustentable es la IHQ. Las limitaciones de este método se ven reflejadas en un grupo de tumores con resultado indefinido 2+ (resultados intermedios entre positivos 3+ y negativos 0/1+). En estos casos se recurre al FISH considerado método *gold standard*.

Diseñamos un ensayo en CEMIC con el objetivo de analizar las dificultades y accesibilidad de la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en relación al FISH. EL CISH es una técnica de hibridación que permite ver señales de amplificación del gen conjuntamente con la morfología del tejido. Fueron seleccionadas 30 muestras, de un total de 210, con cáncer primario de mama con resultado equivoco de IHQ (2+) e informe confirmatorio de FISH.

A esta población se le realizó CISH para Her2/neu por duplicado (sonda SP•T-Light® HER2 Zymed, Hannover, GE). A partir de los resultados de este estudio transversal, se realizó el análisis estadístico para evaluar la exactitud diagnóstica del test. Dos casos no amplificados por FISH resultaron amplificados en forma baja con CISH (11% de falsos positivos) (Tabla 1). La sensibilidad del CISH con respecto al FISH fue de 100% al no hallarse resultados falsos negativos. La especificidad fue del 80%. La concordancia entre FISH y CISH fue de 24/26, es decir que la exactitud global del CISH con respecto al *gold standard* fue de 92%, teniendo en cuenta los casos que resultaron evaluables por CISH y descartando los no reactivos.

En conclusión, y como ya fue demostrado en otros estudios, la exactitud global del CISH resultó comparable al FISH<sup>5,6</sup>.

Nuestra experiencia al iniciarnos en la técnica de CISH puede ser de utilidad para otros laboratorios cuando se trata de optar por uno u otro método. El CISH no requirió equipamiento costoso, solo se utilizó un microscopio óptico que se puede encontrar presente en cualquier laboratorio de Anatomía Patológica, y además facilita la lectura de los resultados al poder apreciar simultáneamente la morfología del tejido. Por el contrario, la técnica FISH implica utilizar un microscopio de fluorescencia no accesible para la mayoría de los centros en nuestro medio. Observar la morfología del tejido con la técnica CISH nos permitió asegurar que las señales provenían del componente infiltrante del cáncer y encontrar las células neoplásicas cuando se disponían aisladamente. Por otro lado, permitió utilizar células normales del tejido mamario o linfocitos acompañantes como controles negativos intrínsecos. Si bien el CISH

TABLA 1.- Resultados de la amplificación del gen Her-2/neu en 30 muestras de cáncer de mama primario mediante FISH y CISH.

		FISH		Totales
		Positivo	Negativo	
CISH	Positivo	16	2	18
	Negativo	0	8	8
	No reactivo	1	3	4
	Totales	17	13	30

detecta el número de copias por núcleo del gen Her-2/neu al igual que el FISH, los materiales necesarios para realizar la técnica y la sonda específica a utilizar fueron más económicos que los de FISH. Los preparados del CISH fueron archivados a temperatura ambiente con el resto de los preparados de hematoxilina-eosina e IHQ. Al emitir una señal que perdura en el tiempo, se contó con dichos preparados para una posterior revisión; no siendo necesario recurrir a un archivo fotográfico, utilizado en el FISH donde la señal decae en el tiempo.

Con respecto a la interpretación de los resultados, con CISH fue menos compleja que con la técnica FISH. Si bien el objetivo óptico 40X seco es el recomendado por los catálogos de la sonda para leer los resultados de CISH, en la mayoría de los casos resultó beneficioso complementarlo con un objetivo 60X seco o 100X de inmersión para mayor comodidad al contar el número de puntos en cada núcleo. Es importante aclarar que siempre se usó el control positivo que venía con el *kit*, el cual funcionó en todos los casos. Es posible que la dificultad en la lectura de CISH en algunos casos se haya debido a señal débil (a pesar de la señal fuerte del testigo) con mucha señal de fondo. Ha sido publicada una menor efectividad del procedimiento debido a la utilización de alcohol-formol-ácido acético como fijador<sup>6</sup>, pero en todos nuestros casos se usó formol-*buffer* neutro. Obtuvimos cuatro casos no reactivos por CISH y reactivos por FISH. Estos casos no deberían ser considerados como falsos negativos ya que los controles internos (células no neoplásicas) permiten discriminarlos. Las posibles explicaciones serían las variaciones en el tiempo de fijación de las piezas operatorias o la curva de aprendizaje del método.

Para finalizar, nuestra experiencia con CISH demostró que puede ser un método al alcance de los laboratorios

con experiencia en la realización de técnicas de inmunohistoquímica.

Mariana Cánepa<sup>1</sup>, Valeria Denninghoff<sup>1,2</sup>,  
 Florencia Perazzo<sup>3</sup>, Fernando Paesani<sup>4</sup>,  
 Silvana Nieto<sup>1</sup>, Alejandro García<sup>1</sup>,  
 Alejandra Avagnina<sup>1</sup>, Boris Elsner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Dr. Norberto Quirno (CEMIC), <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), <sup>3</sup>Servicio de Oncología Clínica, CEMIC, <sup>4</sup>Departamento de Ginecología y Obstetricia, CEMIC, Buenos Aires  
 e-mail: vdenninghoff@cemic.edu.ar

1. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-84.
2. 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; 44:783-92.
3. Ni R, Mulligan AM, Have C, O'Malley FP. PGDS, a novel technique combining chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of ErbB2 (HER2/neu) status in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15:316-24.
4. 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.
5. Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of Her-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification. *Am J Clin Pathol* 2005; 123:237-43.
6. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, et al. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:1587-91.

---  
*Al que has de castigar con obras no trates mal con palabras, pues le basta al desdichado la pena de suplicio, sin la añadidura de las malas razones.*

Miguel de Cervantes (1547- 1616)

*Don Quijote de la Mancha*. Segunda parte (1615). Capítulo XLII. De los consejos que dio Don Quijote a Sancho Panza antes que fuese a gobernar la ínsula, con otras cosas bien consideradas. Edición del IV Centenario. San Pablo, Brasil: Real Academia Española/Alfaguara, 2004, p 870