

Trascendencia de la determinación del Her2 por inmunohistoquímica y su utilidad terapéutica

Fabiola Navidad Cervera,* Miguel A Chávez Martínez*

RESUMEN

Antecedentes. El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) se encuentra amplificado en aproximadamente 18 a 20% de los casos de carcinoma mamario. El nombre oficial de este receptor propuesto por el comité de nomenclatura genética es ERBB2.¹

Método. Se realizó un estudio comparativo para la validación de la prueba inmunohistoquímica en donde se evaluaron 25 muestras en el Laboratorio de Referencia Internacional Carpermor en paralelo con el laboratorio Specialty, de acuerdo con la guía de recomendaciones para la validación de la prueba del HER2 por el Colegio Americano de Patólogos (CAP) y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO).

Resultados. Nuestros resultados son reproducibles de acuerdo con los valores de referencia publicados en las Guía de recomendaciones publicadas por el CAP y la ASCO, con lo que se obtuvo la validación de la prueba de inmunohistoquímica para el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

Conclusiones La sobreexpresión de HER2 se asocia con peor pronóstico en pacientes con diagnóstico reciente de carcinoma de mama que no reciben quimioterapia adyuvante.² Más importantes son los resultados que demuestran que los agentes terapéuticos que tienen como blanco los receptores de HER2 son muy eficientes en el tratamiento de metástasis y terapias adyuvantes. Tomados en conjunto los resultados clínicos indican que el HER2 es un factor útil para tomar decisiones terapéuticas en pacientes con carcinoma de mama y enfatizan la importancia de evaluar esta prueba acuciosamente.^{1,2}

Palabras clave: HER2, factor de crecimiento epidérmico humano, inmunohistoquímica, ERBB2.

ABSTRACT

Background. The Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2) is amplified in approximately 15 to 20% of the breast carcinoma cases. The official name of this receptor proposed by the Nomenclature Committee is ERBB2 gene.

Methods. A comparative study was conducted to validate the immunohistochemistry, which examined 25 samples in the Carpermor International Reference Laboratory in parallel to the Specialty Laboratory, according to the guide of recommendations for the validation test HER2 by the College of American Pathologists (CAP), and the American Society of Clinical Oncology (ASCO).

Results. Our results are reproducible according to the reference values published in the recommendations Guide published by the CAP and ASCO, which was obtained as validating the immunohistochemistry test for Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2).

Conclusions. The overexpression of HER2 is associated with worse prognosis in patients with newly diagnosed breast cancer not receiving adjuvant chemotherapy. More important are the results showing that therapeutic agents that target the HER2s are very efficient in the treatment of metastatic and adjuvant therapies. Taken together, the clinical results indicate that HER2 is a useful factor in therapeutic decision-making in patients with breast cancer, and emphasize the importance of thorough evaluation of this test.

Key words: HER2, Human Epidermal Growth Factor, Immunohistochemistry, ERBB2.

* Departamento de Citología e Histopatología, Carpermor MR, Laboratorio de referencia internacional.

Correspondencia: Dra. Fabiola Navidad Cervera. Departamento de Citología e histopatología. fabiolanavidadc@hotmail.com
Recibido: 08.2011. Aceptado: 12.2011

Este artículo debe citarse como: Navidad Cervera F, Chávez Martínez MA. Trascendencia de la determinación de Her2 por inmunohistoquímica y su utilidad terapéutica. Patología Rev Latinoam 2012;50(2):87-93.

El gen HER2, ubicado en el brazo largo del cromosoma 17, codifica un receptor de membrana con actividad tirosina-cinasa involucrado en la fosforilación y transcripción inicial.^{2,14}

Entre el 15 y el 20% de los carcinomas de mama presentan amplificación de HER2 y la consecuente sobreexpresión de la proteína. Esta alteración se asocia con pronóstico de mayor tasa de recurrencia y mortalidad. Múltiples estudios han demostrado su valor predictivo

para sensibilidad o resistencia a distintos regímenes de terapia sistémica, tanto de tipo endocrino (tamoxifeno) como quimioterapéutico (antraciclinas),^{7,8} justificando su inclusión en los paneles de decisión clínica junto a los factores pronósticos y predictivos clásicos del carcinoma de mama.¹

El interés primordial de este gen reside en su papel como blanco terapéutico del trastuzumab (Herceptin®), anticuerpo monoclonal capaz de bloquear la acción del receptor HER2. Esta nueva terapia fue aprobada por la FDA en 1998 limitándola inicialmente a pacientes con enfermedad diseminada. Más recientemente se ha demostrado que el empleo de trastuzumab en estadíos iniciales de la enfermedad, como agente único o en regímenes combinados reduce significativamente tanto el riesgo de recurrencia como la mortalidad.^{1,5,10,11}

La aplicación terapéutica en fases iniciales y el hecho de que la respuesta depende de la alteración del gen, han convertido en esencial el estudio de HER2. Actualmente se considera obligado efectuarlo en todos los casos diagnosticados de carcinoma de mama invasor y además es crítica su confiabilidad, ya que ello decide el tratamiento que tiene un alto costo, el riesgo de toxicidad cardiaca (5-15%) y el perjuicio que supone negar esta opción terapéutica a una paciente susceptible de responder.^{1,12}

La inmunohistoquímica (IHQ) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) son los métodos más utilizados para el estudio de HER2.^{1,2} Ambos permiten la interpretación de resultados sobre el contexto microanatómico. Con la IHQ se evalúa el grado de expresión de la proteína en la membrana celular y con FISH se evalúa el número de copias del gen en el núcleo celular para detectar su amplificación. Mientras que la IHQ está incorporada en muchos laboratorios de patología la técnica de FISH es menos accesible, requiere equipamiento de mayor costo y es difícil de implementar y acumular experiencia en laboratorios con bajo volumen de actividad.¹⁵

En los últimos años se han publicado múltiples estudios comparativos entre ambos métodos con resultados variables pero, en general, sus conclusiones son complejas por la ausencia de estandarización entre distintos ensayos, tanto en aspectos técnicos como de interpretación y confirmación de resultados. Algunos autores han defendido la mayor fiabilidad de la técnica de FISH pero en los ensayos clínicos se ha utilizado, preferentemente, IHQ y en algunos de ellos se han detectado importantes discordancias

entre los resultados del primer laboratorio que efectuaba la prueba y los de un laboratorio de referencia de mayor volumen que lo realizaba con posterioridad, antes de indicar el tratamiento. En 20% de casos el primer resultado se consideró incorrecto. Esta variabilidad de resultados se atribuye a factores preanalíticos como la fijación y el procesado tisular, analíticos como los reactivos o los procedimientos del laboratorio y posanalíticos como los criterios de interpretación de resultados.¹

Con la totalidad de los datos actualmente disponibles en la literatura no puede demostrarse superioridad de ninguno de los dos métodos respecto al otro para predecir respuesta a la terapia antiHER2, pero sí se ha evidenciado que es esencial emplear metodología adecuadamente validada independientemente del método elegido.

Los algoritmos de decisión terapéutica consensuados y utilizados hasta la actualidad, asumiendo un alto nivel de concordancia entre IHQ y FISH no claramente justificado por la literatura disponible, recomiendan la utilización de IHQ como prueba primaria, indicando FISH sólo en los casos de positividades intermedias, no concluyentes (2+). Los casos de alta positividad (3+) se consideran candidatos a trastuzumab y los de positividad baja (1+) o nula se informan como negativos y no se consideran susceptibles de respuesta.^{1,10,13}

Este estudio está supeditado a la fiabilidad del laboratorio que efectúa el test y vinculado a un volumen mínimo de casos anuales que acrediten su experiencia. También se ha enfatizado la necesidad de documentar en el laboratorio la concordancia entre FISH e IHQ (90% para IHQ 0 y 3+ y 95% para IHQ 1+) antes de limitar la aplicación de FISH a los casos de IHQ 2+. Sin embargo, ninguna de estas condiciones se cumple de manera sistemática en la práctica asistencial y muy probablemente se están generando indicaciones y exclusiones inadecuadas del tratamiento en un porcentaje sustancial de pacientes.

Estos algoritmos son previos a la publicación de los resultados de trastuzumab en tratamiento adyuvante y sus exigencias de concordancia se orientaban esencialmente a una situación de enfermedad avanzada, con carácter más paliativo y no a la mejora de la sobrevida demostrada en fases iniciales de la enfermedad.¹¹ En este nuevo contexto el protocolo óptimo debe identificar la totalidad de las pacientes con alteraciones de HER2 que pueden beneficiarse de la nueva terapia (sensibilidad 100%) y también las que no las presentan y deben dirigirse a otros régime-

nes terapéuticos, evitando riesgos y costos innecesarios (especificidad 100%).

La distancia entre estos objetivos y la realidad actual motivó una iniciativa conjunta del CAP y ASCO que ha proporcionado una guía de recomendaciones para la prueba de HER2 (ASCO & CAP. Guideline Recommendations for HER2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2007;131:18–43).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de referencia internacional Carpermor. La prueba de inmunohistoquímica para la determinación del receptor HER2, mediante el sistema de detección del complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (Biotin-Streptavidin-Horseradish Peroxidase Detection System), se realizó en paralelo con el laboratorio Specialty en 25 bloques de parafina con tejido mamario, fijado previamente en formol amortiguado durante 6 horas como mínimo y no más de 48 horas; con diagnóstico de carcinoma mamario de enero del 2009 a diciembre del 2010. Se excluyeron las muestras con deficiencias de fijación, artificios que impiden la evaluación correcta o con representación insuficiente de carcinoma invasor. Se utilizaron: control positivo (bloques de parafina de tejidos positivos ya conocidos para el anticuerpo) y controles negativos para evaluar la tinción inespecífica o aberrante en el tejido del paciente relacionada con las condiciones de recuperación del antígeno y/o sistema de detección utilizado, así como la especificidad de cada anticuerpo.

RESULTADOS

Se establecieron los lineamientos para el análisis microscópico de cortes histológicos incluidos en parafina y su procesamiento por la técnica de inmunohistoquímica.

Obtenidos los resultados en el laboratorio de referencia internacional Carpermor se enviaron las mismas 25 pruebas al laboratorio Specialty que cuenta con la validación del método para la prueba de detección de HER2.

Con los resultados obtenidos de ambos laboratorios se realizó un análisis estadístico de concordancia; para este fin se usaron las guías para la evaluación de pruebas cualitativas volumen 22, número 14, del NCCLS de Agosto 2002³ como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Correlación de resultados HER2-NEU Carpermor-Specialty

		Diagnóstico			
		Método	Positivos	Negativos	
		Positivos	A	B	A+B
		Negativos	C	D	C+D
Carpermor	Total		A+C	B+D	N
	IHQ		SPECIALTY		
	Positivos		Positivos	Negativos	Total
	Negativos		2	0	2
	Total		0	23	23
			2	23	25

Sensibilidad= $2/2 \times 100\% = 100\%$

Especificidad = $23/23 \times 100\% = 100\%$

PVP=100% (2/2)=100%

PVN=100% (23/23)=100%

Como se puede observar la sensibilidad estimada de acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla de contingencia es: (Sens) = $100\% [A/(A+C)]$ 100% y la especificidad (Spec) = $100\% [D/(B+D)]$ 100%, el valor predictivo positivo (PVP)= $100\% [A/(A+B)]$ de 100% y el valor predictivo negativo (PVN) = $100\% [D/(B+D)]$ del 100%.

La prevalencia de positividad al marcador es 8% Prev = $100\% (A+C)/N$ del total del número de casos estudiados de pacientes con cáncer de mama.

Nuestros resultados son reproducibles de acuerdo con los valores de referencia publicados en las guía de recomendaciones publicadas por el *College of American Pathologists* y la *American Society of Clinical Oncology*, en un artículo especial (Arch Pathol Lab Med 2007;131).

La prueba para HER2 resultó con reacción 2+ positiva con tinción de la membrana débil que no es uniforme, con distribución circunferencial en menos de 10% de las células o intensidad completa de la membrana en menos de 30% de las células tumorales, invasora de acuerdo con los criterios ASCO/CAP es considerado indeterminado por lo que es necesario realizar detección de HER2/neu por FISH.

Para clasificar el estado de HER2 como positivo o negativo el laboratorio debe demostrar previamente la concordancia de sus resultados con una prueba de FISH validada, confirmado que las discordancias no superan 5% en ninguna de las dos categorías. Si el laboratorio no cumplía estas condiciones no se realizó la prueba.

Las condiciones de manejo y procesamiento previo de la muestra deben estar estandarizadas y deben especificarse en cada caso. El fijador idóneo es el formol neutro a 10%

y el tiempo de fijación óptimo es de 6 a 48 horas, variando según el volumen de la muestra.

Los resultados deben evaluarse sólo en el componente invasor del tumor y los criterios de interpretación e informe de resultados deben estar estandarizados. Se establecen tres categorías (negativo, positivo y indeterminado) y los criterios que determinan la exclusión del test de muestras en estado subóptimo. Como controles pueden emplearse líneas celulares o bloques de tumores con representación de las tres categorías de resultados. Si los controles no presentan los resultados esperados debe repetirse la técnica.

HER2 negativo

En IHQ consiste en la ausencia de tinción (0) o en positividad 1+, definida como expresión de membrana débil, incompleta, en cualquier proporción de células. (Figuras 1 a 4). En FISH se considera negativo el número de copias por núcleo inferior a 4 o el cociente HER2/CEP17 inferior a 1.8. El porcentaje de falsos negativos debe tender a 0% y nunca superar 5%.

HER2 indeterminado

Las confusiones generadas en torno a la metodología de la prueba para HER2 proceden de la necesidad de definir una variable categórica (la indicación o no del tratamiento con trastuzumab) a partir de una variable continua, el grado de expresión o amplificación identificado en la prueba. Este hecho genera, en la práctica, situaciones intermedias de difícil resolución.

El rango indeterminado para la IHQ son los casos etiquetados como expresión 2+, que suponen aproximadamente 15% y se definen como la positividad de membrana

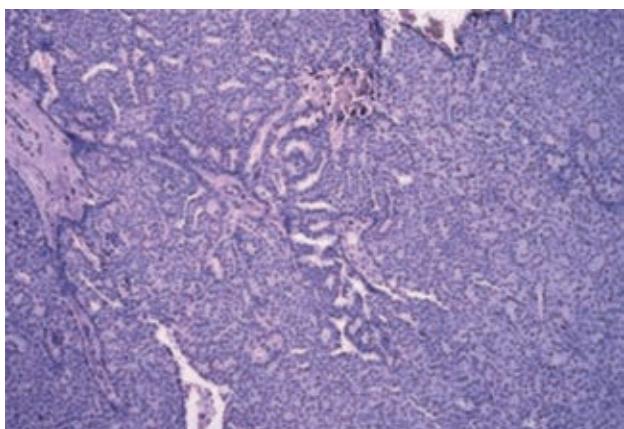


Figura 1.

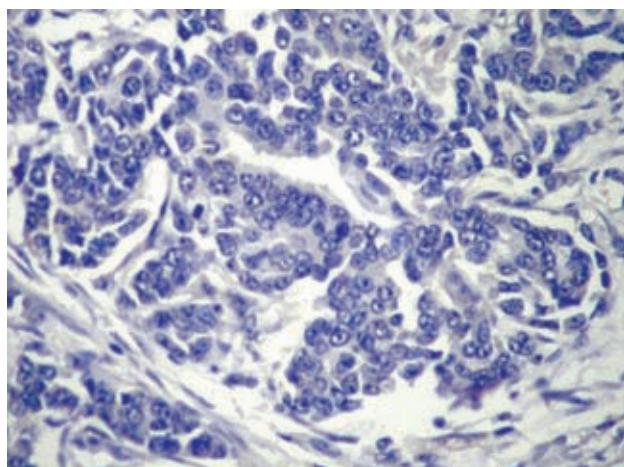


Figura 2.

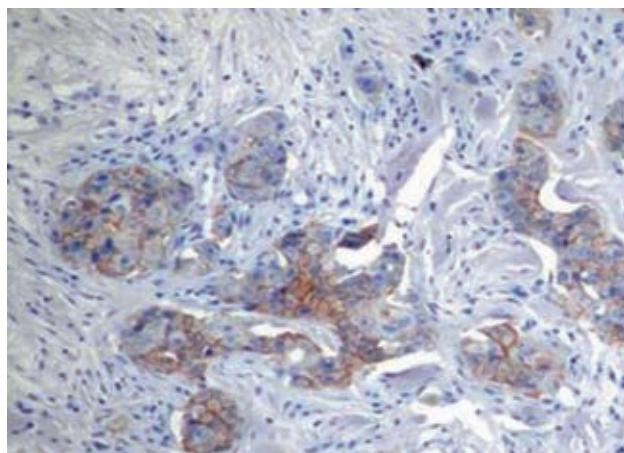


Figura 3.

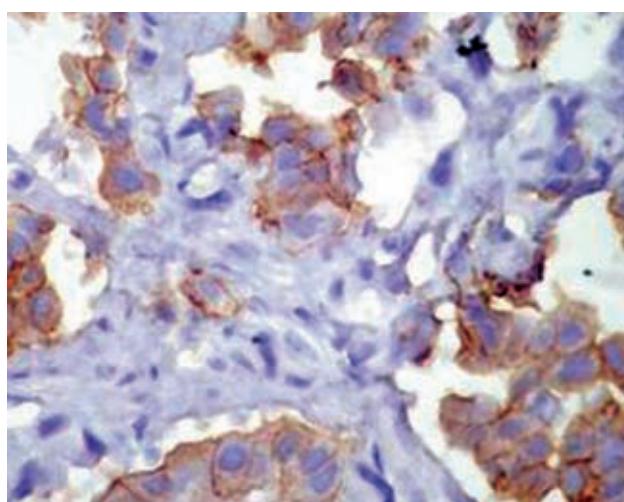


Figura 4.

no uniforme o de intensidad débil, pero completa o circunferencial en 10% o más de células. (Figuras 5 y 6). Otro resultado, de escasa incidencia, que se considera también indeterminado, es la expresión de membrana intensa y completa pero no superior a 30% de células. En FISH se considera indeterminado un número de copias por núcleo entre 4 y 6 o un cociente HER2/CEP17 entre 1.8 y 2.2.

HER2 positivo

En IHQ consiste en positividad de membrana intensa y uniforme (3+) en más de 30% de células neoplásicas invasivas. (Figuras 7 y 8). En FISH sin sonda centromérica se define por la identificación de 6 o más copias del gen por núcleo; en FISH con sonda centromérica por un

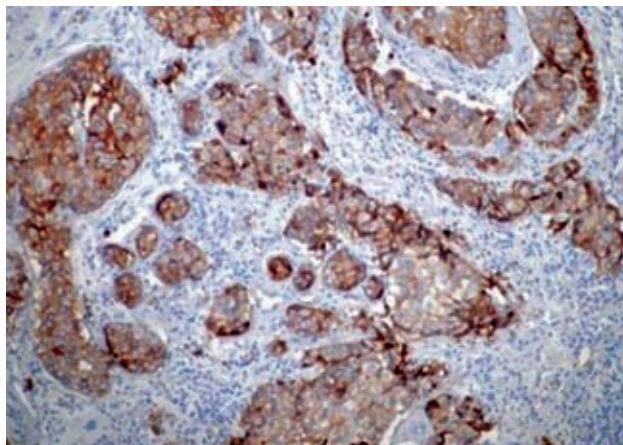


Figura 5.

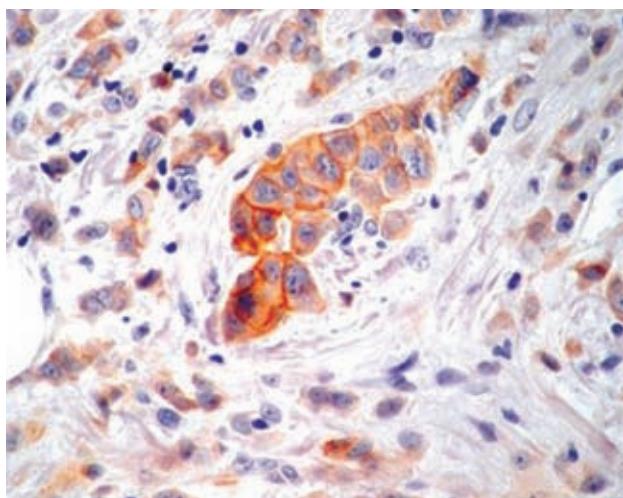


Figura 6.

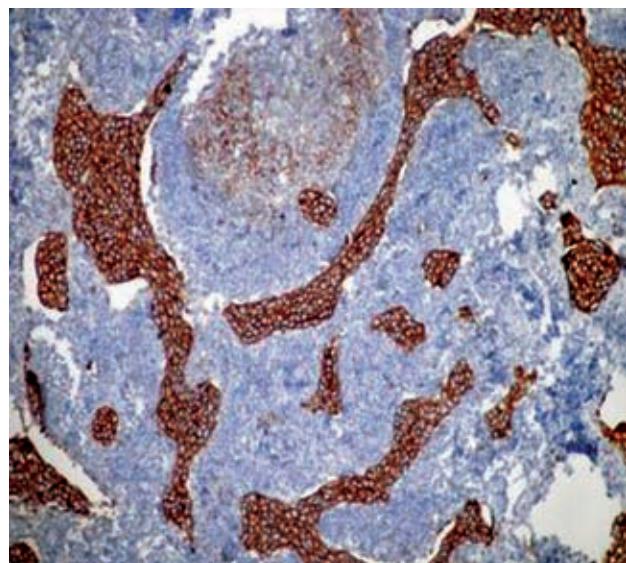


Figura 7.

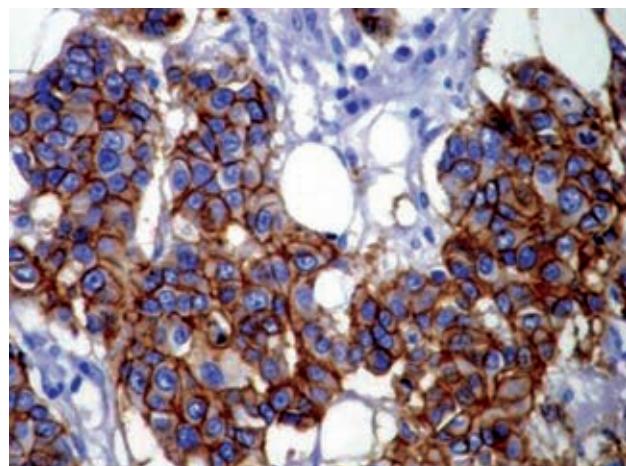


Figura 8.

cociente HER2/CEP17 superior a 2.2, siendo CEP17 la señal centromérica del cromosoma 17.

DISCUSIÓN

El desarrollo de la inmunopatología en los últimos 20 años ha producido grandes avances desde el punto de vista de la precisión diagnóstica cualitativa (especificidad exacta de la estirpe en los tumores indiferenciados o linfomas) como en los campos de la orientación terapéutica y del perfeccionamiento de la formulación pronóstica en enfermos oncológicos.

El oncogén HER2, cuando está amplificado indica una disminución de la supervivencia y los intervalos libres de enfermedad, define en el cáncer de mama a un subgrupo de pacientes con alto riesgo de recidiva y metástasis aunque por otros criterios parecieran tener buen pronóstico (estadio bajo, con ganglios negativos y receptores hormonales positivos). Las pacientes con metástasis a ganglios axilares y HER2 positivo se benefician de una quimioterapia más agresiva de la habitual. Están indicados sólo cuando hay un diagnóstico morfológico previo, firme e indeterminado, de carcinoma de mama.⁶

La reacción primaria entre el antígeno y el anticuerpo específico es amplificada con un anticuerpo secundario biotinilado que actúa como puente; esta reacción se demuestra a través del complejo estreptavidina-peroxidasa y la adición del cromógeno diaminobencidina que evidencia la reacción al formar un compuesto colorido que permite observar al microscopio un patrón de tinción esperado.

Anteriormente las pacientes con cociente entre 2 y 2.2, que constituyen alrededor de 3% de los casos, se consideraban candidatas a terapia con trastuzumab y no hay datos suficientes para excluirlas. Aproximadamente 8% de las muestras presentan polisomía del cromosoma 17 y generalmente coinciden con resultado indeterminado.¹⁴ En general, las pacientes con prueba HER2 indeterminada constituyen un subgrupo poco estudiado y su respuesta al tratamiento es aún incierta.

Los resultados indeterminados de IHQ requieren confirmación por FISH. Si la prueba primaria utilizada es el FISH los resultados indeterminados requieren conteo adicional o repetir la prueba completa. Si persiste el resultado indeterminado debe efectuarse IHQ.¹³

CONCLUSIONES

Se presenta un modelo de validación de acuerdo con la guía de recomendaciones ASCO/CAP. La prueba debe ser validada por el laboratorio antes de su aplicación asistencial, demostrar 95% de concordancia en comparación con una prueba de referencia validada anteriormente y realizada en paralelo. Los laboratorios que no dispongan de ninguna prueba previamente validada deben efectuarla en paralelo con otro laboratorio que pueda ofrecerla. El número de casos a estudiar en paralelo puede oscilar entre 25 y 100 dependiendo de la variabilidad de resultados.

En general existe acuerdo en recomendar que no se efectúe el estudio en laboratorios con escaso volumen anual. Los procedimientos de estudio deben estar estandarizados y cualquier desviación del método debe justificarse con un proceso de revalidación.

En los laboratorios con múltiples patólogos es recomendable que un número reducido de ellos concentre el estudio de HER2 para acumular mayor experiencia y, entre ellos, debe mantenerse una concordancia en la interpretación de resultados de 95%. El análisis de imagen puede ser útil en la interpretación pero sus resultados siempre debe confirmarlos un patólogo y los equipos deben estar correctamente calibrados y con programas de mantenimiento y control de calidad interno.

Los laboratorios que efectúan el estudio de HER2 deben participar en un programa de capacitación específico para cada método empleado. Este programa distribuirá muestras al menos tres veces al año, incluyendo un número suficiente de casos para asegurar la valoración adecuada de la capacidad del laboratorio.

Es conveniente, adicionalmente, comparar los resultados de pacientes con parámetros de referencia publicados anualmente y evaluar la variabilidad de resultados entre los patólogos.

REFERENCIAS

1. Wolff A, Hammond E, et al. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Special Article. Arch Pathol Lab Med 2007;131:18-43.
2. David J. Dabbs. Diagnostic Immunohistochemistry. 2a ed. USA:Churchill Livingstone, 2002. pp: 699-745.
3. Larry W. Clark, et al. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. NCCLS. 2002;22:14.
4. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer—guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch 2010;457:299-307.
5. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. For the ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010;376:687-697.
6. Slamon DJ, Clark GM, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-182.
7. Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, et al. Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy

- and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol* 2004;24:201-209.
- 8. Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, et al. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol* 2006;45:590-596.
 - 9. Hayes DF, Thor A, Dressier L, et al. HER2 predicts benefit from adjuvant paclitaxel after AC in node-positive breast cancer: CALGB 9344. *J Clin Oncol* 2006;24:5S.
 - 10. Joensuu H, Kellokumpu- Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:809-820.
 - 11. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in Her2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94:S5.
 - 12. Geyer CE, Bryant JL, et al. Four year update of cardiac dysfunction on NSABP B-31: A randomized trial for AC>paclitaxel vs AC>paclitaxel with trastuzumab in HER2 positive, node positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:23S.
 - 13. Ellis IO, et al. Best practice No 176. Updated recommendations for Her2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2004;57:233-237.
 - 14. Dal Lago L, Durbecq V, et al. Correction for chromosome 17 is critical for determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2572-2579.
 - 15. Persons DL, Tubbs RR, et al. HER-2 fluorescence in situ hybridization: Results from the survey program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:325-331.