

Estudio comparativo de la amplificación de Her2/neu mediante FISH y PCR cuantitativa en tiempo real en tumores de mama

C. M. Cabrera Morales

Resumen

El protooncogen Her2/neu se encuentra amplificado o sobre-expresado en el 20-30% de los tumores de mama, y su determinación es importante para evaluar a aquellas pacientes que son susceptibles de tratamiento con trastuzumab. En este estudio hemos comparado las técnicas de FISH y PCR cuantitativa *en tiempo real* en la determinación de la amplificación de Her2/neu en 40 tumores de mama, 21 tumores FISH positivos, y 19 tumores FISH negativos. Encontrando que existe una buena concordancia entre ambas técnicas, con un 100% de coincidencia entre el grupo de tumores FISH-negativos, y un 80.95% entre el grupo de tumores FISH-positivos. Por lo tanto la PCR cuantitativa *en tiempo real* representa una técnica reproducible y útil para la determinación del estatus de amplificación de Her2/neu en los tumores de mama.

Palabras clave:

Cáncer de mama. Her2/neu. FISH. PCR cuantitativa *en tiempo real*.

Oncología, 2005; 28 (10):472-476

Summary

The HER2/*neu* protooncogene is amplified or over-expressed in 20 to 30% of breast tumors and its determination is important to evaluate the susceptible patients to be treated with trastuzumab. We compare in this study the FISH and real-time quantitative PCR techniques in the determination of HER2/*neu* amplification of 40 breast tumors. The FISH procedure showed 21 FISH-positive and 19 FISH-negative tumors. These results proved to have a good concordance with the PCR technique, that was of 100% for the FISH-negative and 80.95% for the FISH-positive breast tumors. Therefore, the real-time quantitative PCR represents a useful technique for establishing the HER2/*neu* status in breast cancer.

Key words: Breast cancer. HER2/*neu*. FISH. Real-time quantitative PCR.

Introducción

El protooncogen Her2, conocido también como neu o ErbB2, pertenece a la familia de receptores celulares de membrana ErbB con actividad tirosinquinasa en su dominio intracitoplasmático¹. Codifica una glicoproteína de 185kDa, y se localiza en la región cromosómica 17q12-21². La amplificación del gen Her2 se ha encontrado en el 25-30% de los tumores de mama estudiados, y resulta en un aumento de expresión de la proteína^{3,4}. Slamon y colaboradores³ fueron los primeros en observar una relación significativa entre la amplificación del oncogen Her2 y el desarrollo de un mal pronóstico en las pacientes con cáncer de mama. En estudios retrospectivos se ha puesto de manifiesto que en aquellas pacientes con cáncer de mama que presentan amplificación de Her2 existe una gran probabilidad de resistencia al tratamiento con tamoxifeno⁵. Sin embargo, no se conocen las señales intracelulares implicadas en la vía de señalización mediada por el receptor Her2, así como tampoco se conoce cual es su ligando extracelular.

La importancia de la determinación del estatus de Her2 radica en que aquellas pacientes que tienen cáncer de mama en estadios avanzados de la enfermedad y que además presentan amplificación de Her2 tienen una mayor resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia y tratamiento hormonal⁶, además de una menor tasa de supervivencia. Sin embargo, responden mejor al tratamiento combinado de quimioterapia con trastuzumab (Herceptin), un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige contra el dominio extracelular del re-

ceptor Her2, aumentando la tasa de supervivencia de las pacientes⁷.

El estudio de la amplificación de Her2 se ha llevado a cabo mediante diferentes métodos analíticos que incluyen, southern, northern, y western -blot, inmunohistoquímica, y ELISA⁸; sin embargo la técnica empleada hasta el momento considerada como la más sensible o gold standard es la hibridación in situ mediante fluorescencia (FISH, fluorescente in situ hybridization)⁹. Recientemente se ha introducido un nuevo método basado en la amplificación de Her2 mediante PCR cuantitativa en tiempo real¹⁰.

Por ello el objetivo de este trabajo ha sido comparar la efectividad de ambas técnicas, PCR cuantitativa en tiempo real y FISH en la determinación del estatus de amplificación del protooncogen Her2 en muestras de cáncer de mama FISH positivas y negativas.

Material y Métodos

Selección de los tumores

Para este estudio se analizaron muestras de tumores de mama procedentes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada que fueron remitidas para su estudio al Servicio de Anatomía Patológica de este mismo hospital entre los años 2004 y 2005. Del total de muestras que se analizan para la expresión de Her2 en el Servicio de Anatomía Patológica se seleccionaron un total de 40 casos, 21 casos que fueron positivos mediante la técnica de FISH, y 19 negativos. Todos los tumores del estudio

seleccionados FISH positivos fueron aquellos que igualmente se diagnosticaron previamente con score 2+ mediante inmunohistoquímica⁸. Sin embargo se descartaron del estudio aquellos tumores que mediante inmunohistoquímica presentaban un score 2+, pero que por FISH fueron negativos (datos no mostrados). Todos los tumores incluidos en este estudio FISH negativos presentaron un score de 0 y 1+ por inmunohistoquímica (datos no mostrados).

Amplificación de Her2 mediante FISH

Cortes de tejido en parafina de 3 µm de grosor se hibridaron con la sonda PathVysion™ HER2 DNA probe (IZASA) siguiendo las recomendaciones del kit. La sonda en realidad es una mezcla formada por una sonda centromérica marcada con verde (*Spectrum Green*) que hibrida con el DNA satélite alfa, y otra marcada con naranja (*Spectrum Orange*) que hibrida específicamente con el gen Her2.

Se examinaron un total de 60 núcleos no-solapados por preparación. La tasa de amplificación de Her2 se determinó mediante el cociente: número de copias de Her2 (señales naranjas)/ número de señales verdes (centrómeros). Una tasa >2 indica amplificación del gen Her2, si la tasa es ≤ 2 se considera que no hay amplificación del protooncogen Her2.

PCR cuantitativa en tiempo real

El DNA fue extraído a partir de cortes de tejido en parafina de 8 µm de grosor (8-15 cortes por muestra) utilizando el kit de Qiagen (QIAamp®DNA Mini Kit, Wetsburg, Leusden, The Netherlands).

Para la PCR cuantitativa en tiempo real se utilizó el kit de cuantificación LightCycler-Her2/neu DNA Quantification kit (Roche Molecular Biochemicals). En la reacción de PCR se amplifica un fragmento de 112 pb del gen Her2 y otro de 133 pb de un gen de referencia (gastrina)⁹. Ambos genes se cuantifican con dos sondas en el mismo capilar (red-705 y red-640). Para la determinación de la tasa de amplificación de Her2 se empleó el software *Relative Quantification* versión 1.1 (Roche), una tasa >2 indica amplificación del gen Her2. En la Figura 1 se observan las gráficas de amplificación que se obtienen para Her2 con el aparato de PCR a tiempo real LightCycler (Roche) en muestras de tumores de mama.

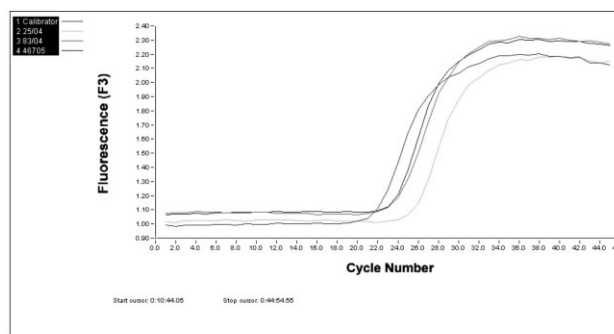


Figura 1. Curvas de amplificación de Her2 obtenidas en el LightCycler para el canal de fluorescencia F3 en muestras de tumores de mama.

Resultados

Los valores de la tasa de amplificación de Her2 obtenida mediante PCR cuantitativa en tiempo real en los tumores de mama positivos y negativos para FISH se recogen en la Tabla I. De los 21 casos de tumores de mama positivos para FISH, 4 de 21 (19.05%) presentaron una tasa de amplificación de

TABLA I

Valores de amplificación de Her2 mediante PCR cuantitativa en tiempo real en tumores de mama FISH positivos y negativos

Tumores FISH>2	DNA Her2/gastrina	Tumores FISH<2	DNA Her2/gastrina
1	3.10	1	1.81
2	2.86	2	1.81
3	3.31	3	1.3
4	1.82	4	1.17
5	2.99	5	1.91
6	2.86	6	1.81
7	3.24	7	1.90
8	1.78	8	1.53
9	1.71	9	1.90
10	2.40	10	1.68
11	2.89	11	1.81
12	2.24	12	1.86
13	2.17	13	1.75
14	4.38	14	1.78
15	8.09	15	1.79
16	3.73	16	1.75
17	9.86	17	1.77
18	4.58	18	1.82
19	1.93	19	1.76
20	4.21		
21	3.75		

Her2 <2, y el resto (80.95%) una tasa >2, por lo tanto el nivel de concordancia de ambas técnicas en este grupo de tumores es del 80.95%. En el grupo de tumores de mama FISH negativos la concordancia de ambas técnicas fue del 100% (Tabla I).

Discusión

El estudio de la expresión del protooncogen Her2/neu se ha abordado a diferentes niveles, DNA, mRNA, y a nivel de proteína. Actualmente existen diferentes técnicas para la determinación del estatus de Her2 con diferentes ventajas e inconvenientes. Por razones prácticas la inmunohistoquímica ha sido mayoritariamente la técnica de elección. Se trata de una técnica estándar en todos los laboratorios de patología que puede ser utilizada sobre tejido parafinado. Sin embargo la gran desventaja de la inmunohistoquímica es que es una técnica semicuantitativa y con diferentes variaciones dependiendo del observador, existiendo variabilidad en los resultados¹⁰. Igualmente existe variabilidad dependiendo del anticuerpo monoclonal anti-Her2 empleado¹¹, que conjuntamente con diferencias en el proceso de fijación del tumor, el método de desenmascaramiento antigénico, y la propia técnica de inmunohistoquímica empleada, contribuyen a la imprecisión del ensayo.

La hibridación in situ con fluorescencia (FISH) es un método alternativo para la determinación de la amplificación de Her2. A diferencia de la inmunohistoquímica, la técnica de FISH representa una medida más objetiva y cuantitativa de Her2, y actualmente es considerada como la técnica *gold standard* para la determinación de Her2. Sin embargo, es una técnica laboriosa y cara, que además requiere de un equipo especializado de detección de fluorescencia, y de una amplia experiencia en la visualización de las preparaciones. En cambio, mediante la introducción de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real se solventan la mayoría de los problemas planteados por las técnicas de FISH e inmunohistoquímica. Es una técnica que puede realizarse tanto a partir de tejido en fresco, en congelación y muestras conservadas en parafina, tiene un bajo coste, es un método rápido, muy específico y sensible. Así, si hacemos una estimación del coste económico por muestra empleando las técnicas de inmunohistoquímica, FISH, y PCR cuantitativa en tiempo real ten-

dríamos los siguientes valores: inmunohistoquímica (Kit Hercep Test-Dako) 61,94 €; FISH (IZASA) 99,5 €; y PCR cuantitativa en tiempo real (Roche) 55,67 €. En cuanto al tiempo empleado en el análisis de las muestras, para una PCR cuantitativa en tiempo real únicamente se requiere una extracción de DNA de cualquier origen (fresco, congelación, o tejido conservado en parafina) que cómo mucho dependiendo del método de extracción empleado tiene una duración de 1 hora; seguida de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real con una duración aproximada de 2 horas. Es decir, desde que llega la muestra al laboratorio y se procesa en un sólo día estarían los resultados de expresión de Her2, cosa que no ocurre con las técnicas de inmunohistoquímica y FISH que requieren de varios días.

En el presente trabajo comparamos la efectividad de las técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real y FISH en la determinación de la amplificación del oncogen Her2 en tumores de mama. De los 40 casos de tumores de mama analizados por ambas técnicas, se obtiene una concordancia del 100% en el grupo de tumores FISH-negativos, en cambio la concordancia fue menor en el grupo de tumores FISH-positivos (80.95%). Estos resultados son coincidentes con estudios previos, donde igualmente se ha demostrado que ambas técnicas presentan una concordancia muy alta^{9, 12}. Sin embargo en nuestro estudio nos encontramos con 4 casos (4/21) en donde por PCR cuantitativa en tiempo real no se encontró amplificación de Her2 (Tabla I) en contraposición a la técnica de FISH. Una causa probable que puede explicar esta diferencia encontrada puede atribuirse a la dilución existente ente el DNA tumoral con sobre-expresión de Her2 y el material no tumoral, ya que el DNA se extrae de cortes de tejido con tejido tumoral y estroma circundante. Sin embargo este potencial problema que presenta la PCR cuantitativa en tiempo real puede solventarse con el empleo de la técnica de microdissección tisular^{9, 12}, gracias a la cual pueden extraerse de secciones de cortes de tejido células tumorales sin contaminación de estroma. Otro posible problema que se puede presentar con la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real es la presencia de falsos positivos cuando se estudian muestras que contienen componente in situ con sobre-expresión de Her2 en tumores que tienen componente invasivo Her2 negativo¹², aunque por estudios previos parece ser que los falsos positivos carecen de

relevancia¹³. Igualmente la técnica de FISH puede dar lugar a la aparición de falsos positivos que pueden deberse a causas diversas: a) imprecisión del observador, b) presencia de polisomía del cromosoma 17 sin amplificación de Her2; c) solapamiento de las señales de las sondas y de los núcleos en las preparaciones; d) heterogeneidad del tumor; etc.

Por tanto, con los datos expuestos en el presente estudio se deduce que existe una buena concordancia entre ambas técnicas de medida: PCR cuantitativa en tiempo real y FISH. A pesar de que en tumores heterogéneos con amplificación de Her2 la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real pueda dar falsos negativos (tumores con amplificación de Her2 no detectados) por efecto de la dilución del DNA tumoral con tejido normal, problema que quedaría resuelto con el empleo de la técnica de microdissección.

Correspondencia:
Dra. C. M. Cabrera
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Edificio de Gobierno - 4ª Planta
Avenida Fuerzas Armadas, 2
E-18014 Granada
mcabrm@fundacionhvn.org

Bibliografía

1. Albanell Mestres J, Muñoz Mateo M, Gascón P. ErbB tyrosine kinase receptor inhibitors in breast cancer. *Rev Oncol* 2004; 6:12-21.
2. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; 4:362-366.
3. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-182.
4. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-712.
5. Taucher S, Rudas M, Madder RM, et al. Do we need Her2/neu testing for all patients with primary breast cancer? *Cancer* 2003; 98:2547-2553.
6. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998; 34:791-808.
7. 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; 344:783-792.
8. Salido M, Solé F, Tusquets I, et al. A comparative study of HER2/neu amplification and over-expression using fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC) in 101 breast cancer patients. *Rev Oncol* 2002; 4:255-259.
9. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER2/neu analysis. *J Mol Diag* 2004; 6:42-51.
10. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. Her2/neu in breast cancer: inter-observer variability and performance of immunohistochemistry with four antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2001; 14:1079-1086.
11. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of Her2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54:2771-2777.
12. Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexø E. Quantitative PCR -a new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: Her2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64:511-522.
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.