

Estudio de la expresión de *cerbB-2* en el adenocarcinoma de próstata

P. San Miguel Fraile, J.E. Dos Santos*, E. Pélaez Boismorand, J.A. Ortiz Rey,
B. Iglesias Rodríguez, J. Cambronero Santos*, J.L. Fajardo Seijo, J.M. Rodríguez Costas,
M. Fernández Regueiro

*Servicio de Anatomía Patológica. *Servicio de Urología. Centro Médico POVISA. Vigo. Pontevedra.*

Actas Urol Esp 2005; 29 (1): 64-69

RESUMEN

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE *cerbB-2* EN EL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

Objetivos: Determinar la expresión de la oncoproteína *cerbB-2* en carcinomas de próstata con técnicas de inmunohistoquímica de próstata y comparar estos resultados con diversos factores pronósticos clínicos e histológicos.

Material y métodos: Se realizó tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo *cerbB-2* (DAKO) en 32 piezas de prostatectomía radical infiltradas por un adenocarcinoma. La expresión de *cerbB-2* fue evaluada de 0 (no-tinción) a 3+ (tinción intensa y continua en la membrana celular) según protocolo. Se analizó la asociación estadística entre la expresión de *cerbB-2* con algunos parámetros clínicos e histológicos.

Resultados: Se demostró positividad de membrana en 14 de las 32 neoplasias evaluadas (44%). La sobreexpresión de *cerbB-2* se correlacionó estadísticamente con el índice de Gleason ($p=0.04$) y estadio clínico ($p=0.038$).

Conclusiones: 1) Nuestro estudio muestra que aproximadamente el 44% de los carcinomas prostáticos expresan *cerbB-2* con técnicas de inmunohistoquímica. 2) Esta serie permite deducir la necesidad de estandarizar la técnica inmunohistoquímica de *cerbB-2* en el adenocarcinoma prostático. 3) En nuestro trabajo existe asociación estadística significativa de la expresión de *cerbB-2*, según el método modificado, con el estadio clínico e índice de Gleason.

Palabras claves: Carcinoma de próstata. *cerbB-2*. Pronóstico. Prostatectomía radical.

ABSTRACT

EXPRESSION OF THE *cerbB-2* (HER-2/neu) ONCOPROTEIN IN PROSTATIC ADENOCARCINOMA

Objectives: Our aim is to determine the expression of the *cerbB-2* oncoprotein in prostate cancers using an immunohistochemistry staining and to compare these results with several clinical and histological prognostic factors.

Methods: An immunohistochemical staining using the *cerbB-2* monoclonal antibody (Dako) was performed in 32 radical prostatectomy specimens diagnosed of adenocarcinoma. The intensity of *cerbB-2* expression was evaluated with a scale that varied from 0 (no staining) to 3+ (strong complete membrane staining) according to published guidelines. Association of *cerbB-2* index immunoreactivity with clinical and histological prognostic factors was examined.

Results: Definite positive membranous staining was detected in 14 of 32 neoplastic cases (44%). Such overexpression was correlated with higher Gleason grade ($p=0.04$) and higher stage of disease ($p=0.038$).

Conclusions: 1) This study shows that 44% of all prostate cancer express the *cerbB-2* oncoprotein with immunohistochemical technique. 2) These findings suggest that is necessary to standardize the immunohistochemical staining procedure with *cerbB-2* in prostate adenocarcinoma. 3) The level of *cerbB-2* expression was correlated with Gleason grade and clinical stage.

Key words: Prostate cancer. *cerbB-2*. Prognosis. Radical prostatectomy.

El carcinoma de próstata es el tumor más frecuente en el hombre¹ y la segunda causa más frecuente de muerte por cancer en el varón². El pronóstico ha mejorado con el empleo de diferentes modalidades terapéuticas como la cirugía y la radioterapia; pero todavía los parámetros clínicos e histológicos no son suficientes para prever el pronóstico en todos los casos, ya que pacientes con características clínicas e histológicas similares tienen una evolución clínica muy diferente³. Por este motivo, se están estudiando nuevos marcadores moleculares. El estudio de

oncogenes, genes supresores y otros factores reguladores del crecimiento tumoral han sido extensamente estudiados en múltiples neoplasias⁴⁻⁸, pero están insuficientemente analizadas en los tumores prostáticos.

El oncogen Her-2/neu, situado en el brazo largo del cromosoma 17, codifica una proteína transmembrana (p185HER2) con actividad tirosin-kinasa que actúa como un factor de crecimiento. Su alteración se traduce en una sobreexpresión en la membrana celular, generalmente secundaria a la amplificación del gen. Ha sido

detectada con expresión variable, en una gran variedad de tumores malignos, como marcador pronóstico adverso, especialmente adenocarcinomas como: mama (20%)⁵⁻⁸, ovario (33%)⁶ y estómago (20%)⁹.

En el carcinoma de próstata la sobreexpresión es muy variable¹⁰⁻²⁵ y la causa de mayor discrepancia parece ser el método empleado²³. Nosotros analizamos la sobreexpresión del oncogen *cerbB-2* con técnicas de inmunohistoquímica en 32 piezas de prostatectomía y evaluamos su relación con diferentes variables histopatológicas y clínicas: estadio clínico, volumen tumoral, índice de Gleason, niveles de PSA, infiltración perineural y afectación ganglionar.

MATERIAL Y MÉTODO

Selección de pacientes

Se han estudiado retrospectivamente piezas de prostatectomías correspondientes a 32 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma prostático entre los años 1998 y 2003; y que fueron tratados mediante cirugía con intención curativa. Ninguno de los pacientes recibió tratamiento hormonal y/o radioterapia previa a la cirugía. En todos los casos se revisaron las biopsias para confirmación del diagnóstico histológico y se realizó determinación de la expresión del oncogen *cerbB-2* en la sección más representativa del tumor.

La serie estudiada se compuso de 32 varones con un rango de edad entre 48 y 77 años y una edad media de 60,78 años. El seguimiento medio fue de 34 meses (65 a 5 meses).

Estudio histológico e inmunohistoquímico

En el estudio histopatológico se consideraron los siguientes parámetros para su análisis: Volumen tumoral, grado de Gleason, estadio tumoral, infiltración perineural y afectación ganglionar.

El estadio tumoral, afectación ganglionar (metástasis o no), infiltración perineural (sí o no) y volumen tumoral aproximado en la pieza de prostatectomía se categorizó tras el estudio histopatológico de las piezas quirúrgicas.

La determinación de la expresión del oncogen *cerbB-2* se realizó en muestras de tejido tumoral incluidas en parafina. La técnica de inmunohistoquímica se realizó de dos formas:

- **Método 1 (método estándar):** Se utilizó la olla a presión durante 5 minutos en tampón citrato a pH6. Posteriormente se realizó una inhibición de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario *cerbB-2* (A0485, DAKO Diagnósticos S.A.) diluidos en proporción 1:200 con el anticuerpo diluyente (DAKO, 50809) durante 30 minutos. El método utilizado para la detección fue el de estreptoavidina-biotina marcada con peroxidasa y el cromógeno del revelado fue diaminobencidina (DAB).

- **Método 2 (método modificado)²³:** Se utilizó la olla a presión durante 5 minutos en tampón citrato a pH9. Posteriormente se realizó una inhibición de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario *cerbB-2* (A0485, DAKO Diagnósticos S.A.) diluidos en proporción 1:200 con el anticuerpo diluyente (DAKO, 50809) durante 30 minutos. El método utilizado para la detección fue el de estreptoavidina-biotina marcada con peroxidasa y el cromógeno del revelado fue DAB.

Valoración de la expresión inmunohistoquímica

Antes de proceder a la cuantificación de los resultados de inmunohistoquímica, se valoró en todos los casos la calidad de la técnica y se seleccionaron las áreas con más positividad, evitando mediciones en áreas periféricas, zonas desvitalizadas, con necrosis o artefacto. Todas las muestras fueron evaluadas sin saber en ningún momento de que pacientes procedían y la cuantificación de la técnica de inmunohistoquímica se realizó según está especificado en la Tabla 1.

Tabla 1

Esquema representativo de la valoración de la expresión de *cerbB-2* con técnicas de inmunohistoquímica.

Resultados	Interpretación
Negativo:	
• 0	• Ausencia de tinción
• 1+	• Tinción débil y discontinua en membrana celular.
Positivo:	
• 2+	• Tinción moderada y continua en membrana celular
• 3+	• Tnción intensa y continua en membrana celular.

Estudio estadístico

Para determinar la asociación entre las variables se empleó el test de χ^2 o la prueba exacta de Fisher. Previamente las variables fueron estratificadas de la siguiente forma:

- Índice de Gleason: 5, 6, 7, 8, 9.
- Estadio Tumoral: pT2a, pT2b, pT2c, pT3a, pT3b, pT4.
- Infiltración perineural: si, no.
- Afectación ganglionar: si, no.
- Volumen tumoral: $\leq 15\%$, 15-30%, $>30\%$.
- Niveles de PSA: ≤ 10 , 10-15, >15 .

Como nivel de significación estadístico se consideró un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Las características clínico-patológicas de los 32 casos de adenocarcinoma prostáticos evaluados se muestran en la Tabla 2. Con el método

Tabla 2

Relación estadística de la expresión de cerbB-2 con diferentes parámetros clínicos e histológicos.

	cerB-2 positivo 14 casos (45%)	cerB-2 negativo 17 casos (55%)	Valor p
Gleason			
5	0	1	P = 0,04
6	1	3	
7	7	13	
8	3	0	
9	3	0	
Estadio			
pT2A	0	3	P = 0,038
pT2B	0	5	
pT2C	4	3	
pT3A	5	5	
pT3B	4	1	
pT4	1	0	
Infiltración perineural			
Si	14	14	P = 0,10
No	0	3	
Afectación ganglionar			
Sí	1	1	P = 0,75
No	8	15	
No conocido	5	1	
Volumen tumoral			
$\leq 15\%$	5	4	P = 0,74
15-30%	6	9	
$>30\%$	3	4	
Niveles de PSA			
≤ 10	10	8	P = 0,28
10-15	0	3	
>15	1	3	
No conocido	3	3	

de inmunohistoquímica estándar no se demostró positividad en la expresión para cerbB-2 en ningún caso (3 casos 1+, 29 casos 0) y se demostró positividad en la expresión para cerbB-2 según el método modificado de Sánchez et al²² en 14 casos (44%), mientras que en 17 casos (53%) la tinción fue negativa y en un caso fue no valorable (3%) (Tabla 3). Las Figuras 1 y 2 representa ejemplos de negatividad (a y b) y positividad (c y d) para cerbB-2. Para el estudio estadístico únicamente se valoraron los resultados obtenidos según el método modificado.

No se demostró asociación estadística significativa entre la expresión de cerbB-2 en el tumor con la infiltración perineural, afectación ganglionar, volumen tumoral y niveles de PSA. Sin embargo, si observamos asociación estadística significativa entre la expresión de cerbB-2 con el índice de Gleason ($p=0,04$) y el estadio tumoral ($p=0,038$).

En nuestra serie se observó una relación directa entre el índice de Gleason y el estadio tumoral con la expresión de cerbB-2 en las células tumorales. De forma que cuanto mayor era el índice de Gleason, o el estadio del tumor era más avanzado aumentaba la expresión de cerbB-2. En el grupo de pacientes con estadio tumoral pT2 4 de los 15 pacientes (26%) mostraban amplificación para cerbB-2 en sus células tumorales, mientras que en los casos con estadio pT3 9 de los 15 pacientes (60%) mostraban amplificación para cerbB-2 y el 100% para el estadio pT4 (Fig. 3). Algo similar ocurre con el índice de Gleason apreciándose una amplificación del 0% para los tumores con índice de Gleason 5, una amplificación del 100% para los tumores con índice de Gleason 8 y 9 y una ampli-

Tabla 3

Comparación de los resultados según los dos métodos de inmunohistoquímica analizados.

Resultados modificado	Método estándar (casos)	Método (casos)
Negativo:		
0	29	1
1+	3	16
Positivo:		
2+	0	7
3+	0	7
No valorables:	0	1

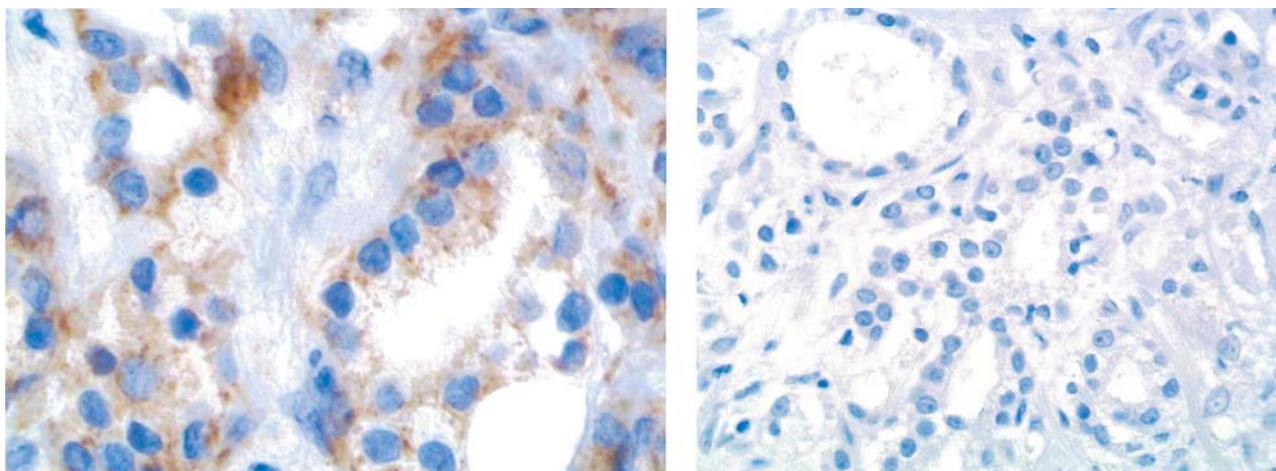


FIGURA 1. Ejemplo de tinción inmunohistoquímica para *cerbB-2*: Adenocarcinoma de próstata con expresión de membrana negativa (0 y 1+).

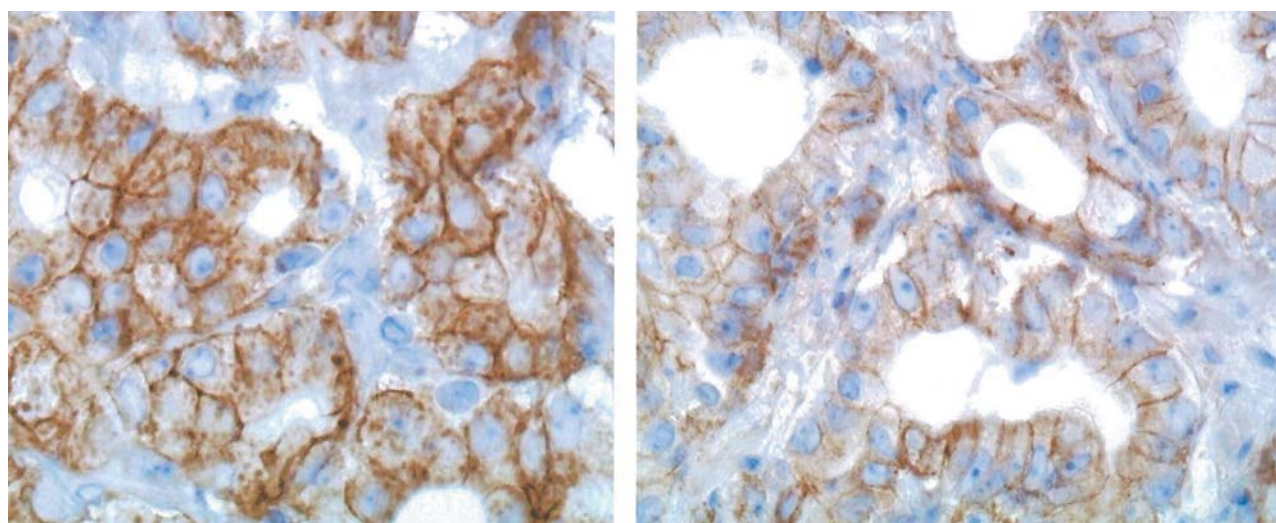


FIGURA 2. Ejemplo de inmunohistoquímica para *cerbB-2*: Adenocarcinoma de próstata con expresión de membrana positiva (2+ y 3+).

ficación del 22% y 35% para los tumores con índice de Gleason 6 y 7 respectivamente (Fig. 4).

DISCUSIÓN

Este estudio tiene un doble objetivo: evaluar los métodos semicuantitativos de expresión del *cerbB-2* con técnicas de inmunohistoquímica en pacientes con adenocarcinoma de próstata y analizar la correlación entre la expresión de *cerbB-2* detectadas por técnicas de inmunohistoquímica con las variables pronósticas clásicas.

La expresión de *cerbB-2* en adenocarcinomas prostáticos es muy variable (rango 0-100%)¹⁰⁻²⁵, con un porcentaje medio en la mayoría de los

estudios que oscila entre el 25 y el 40%²⁴. Esta discrepancia en las series se debe principalmente a la gran heterogeneidad de las mismas y a la diversidad de métodos empleados para su determinación²³.

Los resultados con los dos métodos inmunohistoquímicos analizados fueron muy diferentes. Con la técnica estándar, no se demostró positividad en ningún caso; mientras que con la técnica modificada, la expresión fue del 44%. Estos resultados son totalmente superponibles a los aportados por Sánchez et al²³, que según la literatura revisada, es el único trabajo en el que también se analiza la expresión de este marcador

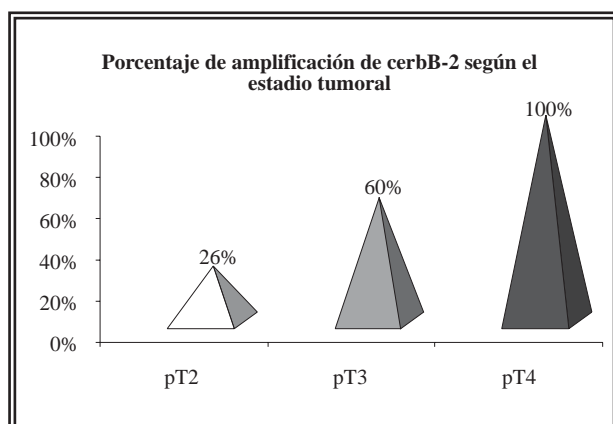


FIGURA 3. Porcentaje de amplificación de cerbB-2 según el estadio tumoral.

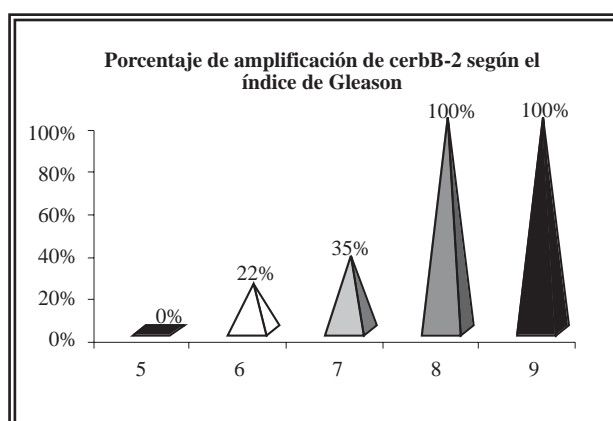


FIGURA 4. Porcentaje de amplificación de cerbB-2 según el grado de Gleason

con dos métodos inmunohistoquímicos diferentes. En este último, la expresión media de cerbB-2 fue del 3 y 50% con el método estándar y modificado, respectivamente. Nuestra serie y la de Sánchez et al²³ nos permite deducir la necesidad de estandarizar la técnica en función del tipo de tejido a analizar con la finalidad de disminuir el número de falsos negativos.

La expresión de cerbB-2 es un factor pronóstico de máxima importancia en varias neoplasias como el cáncer de cervix⁹, mama¹⁰⁻¹², ovario¹¹ y estómago¹³. El cáncer de próstata, no parece ser una excepción, aunque los resultados hayan sido menos concluyentes. En la próstata la expresión de cerbB-2 es mayor en los tumores metastásicos que en los localizados y su expresión podría ser un marcador de progresión tumoral²². Además son varias las publicaciones previas, con series

amplias y estudios estadísticos que han investigado el valor pronóstico de la expresión de cerbB-2 y su asociación con otros parámetros clínico-patológicos^{10,15,16,22,23}. En algunos de estos estudios se confirma que existe asociación estadística entre la expresión de la oncoproteína y el estadio clínico^{15,16,23}. En este sentido, nuestra serie es equiparable ($p=0.038$) y el porcentaje de tumores con expresión para el cerbB-2 según el estadio clínico fue del 27%, 60% y 100% para los tumores en estadio pT2, pT3 y pT4, respectivamente. Estos datos sugieren que la expresión de cerbB-2 es un factor pronóstico adverso en el adenocarcinoma prostático que este asociado a la progresión tumoral, ya que su expresión es mayor en los tumores con estadios clínicos más avanzados.

Con respecto la relación entre el índice de Gleason y la expresión de cerbB-2, nuestros resultados son similares a los aportados por Ware¹⁰ y Sánchez²³. Nosotros observamos mayor expresión de cerbB-2 en los tumores con mayor índice de Gleason. Otros autores^{14,15,22, 24} no demostraron correlación entre la expresión de la oncoproteína y el índice de Gleason, aunque sí, con el pronóstico del tumor. Las discrepancias entre las series pueden reflejar heterogeneidad en la selección de los pacientes²⁴, tratamientos²⁴ y técnicas de inmunohistoquímica empleadas²³.

Por último, en nuestra serie no encontramos asociación estadística de la expresión de la oncoproteína con la infiltración perineural, afectación ganglionar, volumen tumoral y niveles de PSA. Tan sólo dos autores^{22, 26} han encontrado una relación directa entre que la expresión de cerbB-2 y los niveles de PSA. Estos resultados deben de ser confirmados mediante estudios en series más amplias. En lo que conocemos, ningún estudio ha analizado la asociación entre expresión de cerbB-2 y la infiltración perineural, afectación ganglionar y volumen tumoral. Morote et al no observaron diferencias en la inmunotinción con el cerbB-2 y la existencia de metástasis óseas o extraóseas.

En resumen, nuestros resultados:

- Sugieren la necesidad de estandarizar la técnica inmunohistoquímica de cerbB-2 en función del tipo de tejido a analizar, con la finalidad de disminuir el número de falsos negativos.

• La expresión de *cerbB-2* podría estar relacionado con el estadio tumoral e índice de Gleason en el adenocarcinoma de próstata. Estos resultados deben ser confirmados mediante estudios en series más amplias.

REFERENCIAS

- Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics 1991; *Ca*,41:19.
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
- Mydlo JH, Kral JG, Volpe M, Axotis C, Macchia RJ, Pertschuk LP. An analysis of microvessel density, androgen receptor, p53 and HER-2/neu expression and Gleason score in prostate cancer. Preliminary results and therapeutic implications. *Eur Urol* 1998;34:426-432.
- Hale R, Buckley C, Fox H, Williams J. Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:594-596.
- Wright C, Angus B, Nicholson S et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:2087-2090.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712.
- Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/ neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:4332-4337.
- Koepfen HKW, Wright BD, Burt AD, et al. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 2001;38:96-104.
- Falck VG, Gullick WJ. c-erbB-2 oncogene product staining in gastric adenocarcinoma. An immunohistochemical study. *J Pathol* 1989;159:107-111.
- Ware JL, Maygarden SJ, Koontz WW, Strom S. Immunohistochemical detection of c-erbB-2 protein in human benign and neoplastic prostate. *Hum Pathol* 1991;22:254-258.
- Mellon K, Thomston S, Charlton RG, et al. P53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J Urol* 1992;147:496-499.
- Berner A, Nesland JM, Waehre H, Side J, Fossa SD. Hormone resistant prostatic adenocarcinoma: an evaluation of prognostic factors in pre- and post-treatment specimens. *Br J Cancer* 1993;68:380-384.
- Kokuho M, Yoshiki R, Hamaguchi A, Okada Y, Tomoyoshi T, Higuchi K. Immunohistochemical study of c-erbB-2 protooncogene product in prostatic cancer. *Jpn J Urol* 1993; 84:1872-1878.
- Giri DK, Wadhwa SN, Upadhaya SN, Tawar GP. Expression of NEU/HER-2 oncoprotein (p185neu) in prostate tumors: an immunohistochemical study. *Prostate* 1993;23:329-336.
- Sadasivan R, Morgan R, Jennings S, et al. Over-expression of HER-2/NEU may be an indicator of poor prognosis in prostate cancer. *J Urol* 1993;150:126-131.
- Kuhn EJ, Kurnot RA, Sesterhenn IA, Chang EH, Moul JW. Expression of the c-erbB-2 (Her-2/neu) oncoprotein in prostate cancer. *J Urol* 1993;150:1427-1433.
- Myers RB, Srivastava S, Oelschlager DK, Grizzle WE. Expression of p160erbB-3 and p185erbB-2 in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1140-1145.
- Fox SB, Persad RA, Coleman N, Day CA, Silcocks PB, Collins CC. Prognostic value of c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor in stage A1 (T1a) prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol* 1994;74:214-220.
- Lyne JC, Naraghi RM, Melhem MA et al. Human prostate cancer cells respond to but do not express neu differentiation factor (NDF) in spite of HER2/neu gene amplification and protein overexpression. *Cancer J Sci Am* 1995;3:21-30.
- Cohen RJ, Cooper K, Haffejee Z, Robinson E, Becker PJ. Immunohistochemical detection of oncogene proteins and neuroendocrine differentiation in different stages of prostate cancer. *Pathology* 1995;27:229-232.
- Gu K, Mes-Masson A, Gauthier J, Saad F. Overexpression of Her-2/neu in human prostate cancer and benign and malignant prostate. *Cancer* 1996;99:185-189.
- Morote J, Torres I, Caceres C, Vallejo C, Schwartz S, Reventos J. Prognostic value of immunohistochemical expression of the c-erbB-2 oncoprotein in metastatic prostate cancer. *Int J Cancer* 1999;84:421-425.
- Sánchez KM, Sweeney CJ, Mass R, et al. Evaluation of HER-2/neu expression in prostatic adenocarcinoma. A request for a standardized, organ specific methodology. *Cancer* 2002;95:1650-1655.
- Fossa A, Lilleby W, Fossa SD, Gaudernack G, Torlakovic G, Berner A. Independent prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in pN0 prostate cancer undergoing curative radiotherapy. *Int J Cancer* 2002;99:100-105.
- Lara PN, Meyers FJ, Gray CR, et al. Her-2/neu is overexpressed infrequently in patients with prostate carcinoma. Results from California cancer consortium screening trial. *Cancer* 2002;94:2584-2589.
- Zhou HE, Wan DS, Zhou J, Miller GJ, Von Eschenbach AC. Expression of *cerbB-2/neu* proto-oncogene in human prostatic-cancer tissues and cell lines. *Mol Carcinogen* 1992;5:320-327.

Dra. P. San Miguel Fraile
 Servicio de Anatomía Patológica.
 Centro Médico POVISA. C/ Salamanca, nº 5.
 36211 Vigo (Pontevedra).

(Trabajo recibido el 1 junio de 2004)