

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER, IAP
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

Hibridación in situ Cromogénico CISH como alternativa para el estudio del oncogén
Her2/neu en el Cáncer de Mama en México: comparación entre CISH, FISH e IHQ

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA
PRESENTA:
DRA. KARLA HERNÁNDEZ DE DIEGO ZÁRATE

PROFESOR TITULAR DEL CURSO: DR. JESÚS SIMÓN DOMÍNGUEZ
ASESORES: DR. JESÚS SIMÓN DOMÍNGUEZ
DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO

MÉXICO, D.F. OCTUBRE DEL 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JOSE J ELIZALDE GONZALEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. JESÚS SIMÓN DOMÍNGUEZ
PROFESOR TITULAR Y ASESOR

DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO
ASESOR

AGRADECIMIENTOS

- A mis maestros, Dr. Jesús Simón Domínguez, Dr. Carlos Ortiz Hidalgo, Dr. Luis Carlos Moreno, Dr. Pedro Álvarez Sánchez, Dr. Jesús Roy Aranda, Dr. Juan Alberto de la Cruz Canché Chan, Dr. Gomez, Dr. Gonzalo Álvarez Sánchez. Por su paciencia y enseñanzas, me llevo muchos buenos consejos. Gracias.
- A mis compañeras residentes
- A todo el personal de los laboratorios de patología quirúrgica, patología clínica y banco de sangre. En especial a José Evaristo Hernández Torres, que sin su ayuda y conocimientos este trabajo no hubiera sido igual.

DEDICATORIA

Para Vicente, mi esposo fiel, quien es motor en mi vida y quien me alienta en seguir adelante.

También dedico este trabajo a mis papas, Yolanda y Jorge Carlos, quienes me han dado su apoyo incondicional, además de ser ejemplo a seguir.

Yolis y Lolita, este trabajo también tiene inspiración por ustedes, que siempre están allí, en las buenas y en las malas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
<i>A. Conceptos básicos</i>	<i>4</i>
<i>B. Patología</i>	<i>12</i>
<i>C. Antecedentes</i>	<i>21</i>
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
V. OBJETIVOS	25
VI. HIPÓTESIS	26
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	27
<i>A. Tipo de estudio</i>	<i>27</i>
<i>B. Universo y muestra de estudio</i>	<i>27</i>
<i>C. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación</i>	<i>27</i>
<i>D. Procedimiento a seguir</i>	<i>27</i>
<i>E. Variables</i>	<i>30</i>
<i>F. Análisis estadístico</i>	<i>30</i>
VIII. RESULTADOS	31
IX. DISCUSIÓN	32
X. CONCLUSIONES	35
XI. RECOMENDACIONES	36
XII. ANEXOS	38
XIII. REFERENCIAS	45

RESUMEN

Es importante conocer el estado del gen Her2/neu para determinar el pronóstico y tomar decisiones en cuanto al tratamiento con trastuzumab (Herceptin) en pacientes con cáncer mamario. En nuestro hospital utilizamos como prueba-tamizaje a la inmunohistoquímica (IHQ) para estudiar su sobre-expresión protéica. Es una prueba sencilla y accesible; su baja especificidad se traduce en altos porcentajes de falsos-positivos. Se utiliza la hibridación in-situ fluorescente (FISH) como prueba confirmatoria¹, considerado como estándar de oro. Esta es muy sensible y específica pero, es compleja, costosa, requiere de equipamiento especial para fluorescencia y no se realiza en el hospital. Recientemente se sugiere una nueva metodología para estudiar al Her2/neu, como la hibridación in-situ cromogénica (CISH), que consiste en hibridar una sonda revelada por una reacción de peroxidasa (similar a IHQ); no requiere instrumental especial, de interpretación rápida, permite valoración histológica y la señal permanece.

Objetivo: Validar CISH como alternativa para FISH en el estudio de Her2/neu, realizar estudio piloto para en un futuro contar con estas pruebas en nuestro hospital.

Metodología: Se analizaron 36 tumores mamaros en parafina con resultado previo de FISH realizado por el laboratorio de referencia. Se les realizó CISH, FISH e IHQ en nuestro hospital, de forma ciega.

Resultados: Se obtuvo buena correlación entre FISH-referencia y CISH del 92%. La correlación entre CISH y FISH-experimental fue 97.2% (coeficiente kappa 0.93). Se encontró 30.5% de falsos-positivos por IHQ.

Conclusión: CISH es una prueba más sencilla, que FISH. CISH es una alternativa para FISH. Las IHQ positivas deben confirmarse por CISH/FISH.

Palabras clave: CISH, FISH, inmunohistoquímica, Her2/neu, Her2, cáncer de mama, México

A. INTRODUCCIÓN

Entre todas las neoplasias, el cáncer de mama es el más común entre la población femenina mundial, con 1 millón de casos nuevos anuales, es la segunda causa de muerte entre mujeres de 40 a 50 años¹. En México, ocupa el segundo lugar después del cáncer cervico-uterino², siendo la segunda causa de muerte entre las Mexicanas mayores de 40 años^{3 4 5 6 7}. Encontrándose en estadíos avanzados en el 60% de los casos^{8 9}.

Los factores genéticos son causantes del 5-10% del cáncer de mama, jugando un papel importante en el inicio y progresión¹⁰. Uno de los más estudiados es el protooncogén Her2/neu (Human Epidermal Growth Factor-2 o c-erbB2) ubicado en el cromosoma 17q11.2-q12¹¹, el cual presenta una alteración génica¹², amplificándose, y por ende sobre-expresando la proteína (Her2 o p185^{HER2/neu})¹³. Esta, es un receptor de membrana que tiene una parte homóloga al EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), además que comparten una actividad de tirosin cinasa¹⁴. La presencia de amplificación/sobreexpresión Her2/neu, se ha relacionado con un mal pronóstico, aneuploidia del DNA, mutación del p53 y metástasis¹⁵. El 20-30% de los cánceres mamarios presentan amplificación del Her2/neu. Estudios latinos reportan este porcentaje hasta en un 28%¹⁶. Sin embargo se expresa infrecuentemente en carcinoma mamario tubular¹⁷. El Her2/neu es factor pronóstico y es indispensable para la toma de decisión sobre la terapéutica en el cáncer mamario^{18 19}

20 21 22 23 24 25

Trastuzumab (Herceptin^R, Roche Ltd, Basel, Switzerland), es un nuevo medicamento para el manejo del cáncer de mama, consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado contra la parte extracelular de la proteína Her2^{26 27}. Este inhibe la proliferación de células tumorales que amplifican al Her2/neu, sin los efectos secundarios (alopecia, mucositis, neutropenia) encontrados en la quimioterapia convencional²⁸. Tiene un efecto sinérgico cuando es utilizado en combinación con

cisplatino y carboplatino, docataxel y radiación ionizante, y efectos añadidos cuando se utiliza con doxorubicina, ciclofosfamida, metotrexate y paclitaxel ²⁹.

Se han utilizado varias metodologías de laboratorio para el estudio de las alteraciones del Her2/neu, incluyendo Southern, Northern y Western blotting, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Monopex y LightCycler)^{30 31}, PCR por transcriptasa reversa (RT)- PCR, ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA)³², inmunoensayo enzimático (EIA), entre otros ^{33 34 35}. La más utilizada como prueba de tamizaje es la inmunohistoquímica (IHQ). Esta prueba es sencilla, rápida, accesible y permite la valoración de la histología de la muestra. Detecta la sobre expresión del Her2 en la membrana celular, por medio de un anticuerpo y una reacción de peroxidasa, tiñendo a la membrana de color café. La interpretación va a depender de la cantidad de receptores en la membrana, y su interpretación corresponde a la siguiente equivalencia teórica: <20,000 (0); 100,000 (1+); 500,000 (2+) y 2,300,300 (3+) ³⁶. Sin embargo, la IHQ tiene limitaciones, reportando del 3 al 15% falsos-positivos ^{37 38}. Existen en el mercado varios anticuerpos para la detección, como el monoclonal CB11, policlonal R60, monoclonal 10H8, HercepTest tinción inmunoenzimática; se han realizado estudios comparativos obteniendo resultados controversiales ^{39 40 41 42 43}.

La hibridación in situ fluorescente (FISH), el estándar de oro para la determinación de la amplificación del Her2/neu ^{44 45 46 47}, se utiliza como prueba confirmatoria de los casos positivos por IHQ. Este, por medio de la hibridación, va a marcar al oncogén Her2/neu con una sonda que lleva una señal fluorescente en los núcleos celulares. Puede realizarse con 1 sonda naranja (marca al Her2/neu. DAKO, Copenhagen, Denmark), o puede utilizar dos sondas simultáneamente, naranja y verde (marca al Her2/neu y al centrómero del cromosoma 17. Vysis-Abbot), haciendo sencilla la distinción de una amplificación verdadera de una aneuploidia. Los resultados son interpretados según el cociente de Her2/neu (señales naranjas) entre el cromosoma 17 (señales verdes). Si es >2 es positivo, <2 es negativo. Tiene por desventaja que es una tecnología compleja, requiere de microscopio de epifluorescencia, objetivos especiales, filtros para fluorescencia multi-bandpass,

cámara digital (la fluorescencia se pierde en semanas), la mayoría de los patólogos no están relacionados con la interpretación por fluorescencia y es difícil la interpretación de la histología de la muestra.

Recientemente se ha introducido la hibridación in situ cromógena (CISH). Esta, detecta la amplificación de Her2/neu, por medio de una hibridación con una sonda que se revela con un cromógeno (DAB) y una reacción de peroxidasa. Estudios lo han considerado como alternativa para FISH por su concordancia, y su similitud en cuanto sensibilidad y especificidad ^{48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61}. Se sugiere que en amplificaciones leves debe ser confirmado por FISH ⁶². Sus ventajas radica en que es una metodología sencilla, requiere de un microscopio de luz, la señal no desaparece, permite analizar la histología, es más barato que FISH, los patólogos están familiarizados con señales por inmunoreacción ^{63 64 65 66 67}. Estudios sugieren el uso de CISH como calibrador de IHQ, o como control de calidad ^{68 69 70}.

MARCO TEÓRICO

a. Conceptos básicos

El ADN es la abreviatura del ácido desoxirribonucleico. Constituye el principal componente del material genético, junto con el ARN. Es el componente químico primario de los cromosomas y el material en el que los genes están codificados. En las bacterias, el ADN se encuentra en el citoplasma mientras que en organismos más complejos, tales como plantas, animales y otros organismos multicelulares, la mayoría del ADN reside en el núcleo celular. Su función es codificar las instrucciones esenciales para crear un ser vivo idéntico a aquel del que proviene (o casi similar, en el caso de mezclarse con otra cadena como es el caso de la reproducción sexual).

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas (o púricas) denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidínicas (o pirimídicas) denominadas citosina (C) y timina (T). La estructura del ADN es una pareja de largas cadenas de nucleótidos. La estructura de doble hélice del ADN fue descubierta en 1953 por James Watson y Francis Crick de modo que el ADN se podía "desenrollar" para que fuera posible su lectura o copia. Una larga hebra de ácido nucleico está enrollada alrededor de otra hebra formando un par entrelazado. Dicha hélice mide 3,4 nm de paso de rosca y 2,37 nm de diámetro, y está formada, en cada vuelta, por 10,4 pares de nucleótidos enfrentados entre sí por sus bases nitrogenadas. El rasgo fundamental es que cada base nitrogenada de una hebra "se aparea" con la base de la otra, en el sentido de que la adenina siempre se enfrenta a la timina (lo que se denomina A-T) y la guanina siempre a la citosina (G-C). La adenina se une a la timina mediante dos puentes de hidrógeno, mientras que la guanina y la citosina lo hacen mediante tres puentes de hidrógeno; de ahí que una cadena de ADN que posea un mayor número de parejas de C-G sea más estable. Se

estima que el genoma humano haploide tiene alrededor de 3.000 millones de pares de bases. Dos unidades de medida muy utilizadas son la kilobase (kb) que equivale a 1.000 pares de bases, y la megabase (Mb) que equivale a un millón de pares de bases.

El modelo de doble hélice permite explicar las propiedades del ADN:

- Capacidad para contener información: lenguaje codificado en la secuencia de pares de nucleótidos.
- Capacidad de replicación: dar origen a dos copias iguales.
- Capacidad de mutación: justificando los cambios evolutivos.

En un gen, la secuencia de los nucleótidos a lo largo de una hebra de ADN se transcribe a un ARN mensajero (ARNm) y esta secuencia a su vez se traduce a una proteína que un organismo es capaz de sintetizar o "expresar" en uno o varios momentos de su vida, usando la información de dicha secuencia.

La relación entre la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la proteína viene determinada por el código genético, que se utiliza durante el proceso de traducción o síntesis de proteínas. La unidad codificadora del código genético es un grupo de tres nucleótidos (triplete), representado por las tres letras iniciales de las bases nitrogenadas (ejemplo: ACT, CAG, TTT). Cuando estos tripletes están en el ARN mensajero se les llama codones. En el ribosoma cada codón del ARN mensajero interacciona con una molécula de ARN de transferencia (ARNt) que contenga el triplete complementario (denominado anticodón). Cada ARNt porta el aminoácido correspondiente al codón de acuerdo con el código genético, de modo que el ribosoma va uniendo los aminoácidos para formar una nueva proteína de acuerdo con las "instrucciones" de la secuencia del ARNm. Existen 64 codones posibles, por lo cual corresponde más de uno para cada aminoácido; algunos codones indican la terminación de la síntesis, el fin de la secuencia codificante; estos codones de terminación o codones de parada son UAA, UGA y UAG.

El 3% del genoma humano tiene exones que codifican proteínas. La función del resto por ahora sólo es especulación, es conocido que algunas secuencias tienen afinidad hacia proteínas especiales que tienen la capacidad de unirse al ADN (como los homodominios, los complejos receptores de hormonas esteroides, etc.) que tienen un papel importante en el control de los mecanismos de transcripción y replicación. Estas secuencias se llaman frecuentemente secuencias reguladoras, y los investigadores asumen que sólo se ha identificado una pequeña fracción de las que realmente existen.

Algunas secuencias de ADN desempeñan un papel estructural en los cromosomas: los telómeros y centrómeros contienen pocos o ningún gen codificante de proteínas, pero son importantes para estabilizar la estructura de los cromosomas. Algunos genes codifican ARN: ARN ribosómico, ARN de transferencia), ARN de interferencia (ARNi, que son ARN que bloquean la expresión de genes específicos). La estructura de intrones y exones de algunos genes (como los de inmunoglobulinas y protocadherinas) son importantes por permitir cortes y empalmes alternativos del pre-ARN mensajero que hacen posible la síntesis de diferentes proteínas a partir de un mismo gen (sin esta capacidad no existiría el sistema inmunológico). Algunas secuencias de ADN no codificante representan pseudogenes que tienen valor evolutivo ya que permiten la creación de nuevos genes con nuevas funciones. Otros ADN no codificantes proceden de la duplicación de pequeñas regiones del ADN; esto tiene mucha utilidad ya que el rastreo de estas secuencias repetitivas permite estudios sobre el linaje humano.

La información almacenada en el ADN se traduce en las proteínas. Estas pueden ser estructurales como las proteínas de los músculos, cartílagos, pelo, etc., o funcionales como las de la hemoglobina, o enzimas. La función principal de la herencia es la especificación de las proteínas, siendo el ADN una especie de guía para la síntesis proteica. A la modificación del ADN que provoca disfunción proteica se le llama enfermedad, otras veces, en sentido beneficioso, dará lugar a lo que conocemos como evolución.

Las más de treinta mil proteínas diferentes en el cuerpo humano están hechas de veinte aminoácidos diferentes, y una molécula de ADN debe especificar la secuencia en que se unan dichos aminoácidos.

El ADN en el genoma de un organismo podría dividirse conceptualmente en dos, el que codifica las proteínas y el que no codifica. En el proceso de elaborar una proteína, el ADN de un gen se lee y se transcribe a ARN. Este ARN sirve como mensajero entre el ADN y la maquinaria que elaborará las proteínas y por eso recibe el nombre de ARN mensajero. El ARN mensajero instruye a la maquinaria que elabora las proteínas, para que ensamble los aminoácidos en el orden preciso para armar la proteína.

El dogma central de la biología molecular plantea que el flujo de actividad y de información es: $ADN \rightarrow ARN \rightarrow proteína$; En la actualidad se asume que este dogma es cierto en la mayoría de los casos, pero se conocen importantes excepciones: retrovirus con la "transcripción inversa o reversa" . Adicionalmente, se ahora se sabe que existen secuencias de ADN que se transcriben a RNA y son funcionales como tales, sin llegar a traducirse a proteína nunca.

Los seres humanos tienen 46 cromosomas. Estos son segmentos de ADN largos contenidos en el núcleo celular. Existen 23 pares de cromosomas o 46 cromosomas en total. La otra parte del ADN que contienen las células se encuentra en las mitocondrias, las cuales tienen genes importantes en su propia hebra de ADN, denominada en ocasiones "el cromosoma número 47". Los genes del cuerpo están contenidos dentro de estos 46 cromosomas nucleares y en el cromosoma mitocondrial.

El Genoma Humano es el número total de cromosomas del cuerpo. Los cromosomas contienen aproximadamente 80.000 genes, los responsables de la herencia. La información contenida en los genes ha sido decodificada y permite a la ciencia conocer mediante exámenes genéticos, qué enfermedades podrá sufrir una persona en su vida.

En el cromosoma 17, en el brazo largo en la posición 11.2 (17q11.2-q12) se encuentra el Her2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor-2) que es un oncogen (gen potencial de desarrollar

cáncer) implicado en el crecimiento y desarrollo anormales de la célula cancerígena. El estado Her2/neu positivo se asocia a células tumorales agresivas y predice un pronóstico pobre, reduciendo la respuesta a la quimioterapia.

En los últimos años, se han realizado avances importantes para conocer cómo las células normales cambian, o se transforman, en células cancerosas. Algunos de estos avances han llevado a conocer cómo unas sustancias químicas que producen cáncer, denominadas carcinógenos, interactúan con los genes de nuestro organismo, alterando su función normal.

El gen Her2/neu, responsable de la producción de la proteína Her2, lo que significa que, aunque la proteína Her2 desempeña un papel regulador en las células con función normal, un error aleatorio en el gen Her2 podría dar lugar, al desarrollo del cáncer.

En cantidades normales, la proteína Her2 desempeña un papel importante en el crecimiento y el desarrollo de una amplia variedad de células, denominadas células epiteliales. Estas células componen el revestimiento externo e interno del organismo, así como el tejido glandular. Las células de las glándulas mamarias son ejemplos básicos de células epidérmicas.

La proteína Her2 se puede encontrar dispersa en la membrana celular. Transmite señales que dirigen el crecimiento celular, desde el exterior de la célula hacia el núcleo que se encuentra dentro de la célula. Unas moléculas pequeñas, denominadas factores de crecimiento, se adhieren a la proteína Her2 y transmiten señales a la célula para que crezca de forma normal ⁷¹.

Cada célula contiene normalmente dos copias del gen Her2/neu y estas deben producir una cantidad apropiada de la proteína Her2 en la superficie celular. Algunas veces, el gen Her2/neu está amplificado y ello da lugar a la generación de múltiples copias del gen y la producción de una cantidad excesiva de la proteína Her2. Cuando esta se produce en cantidades excesivas, transmite señales a las células para que se dividan, multipliquen y crezcan a mayor velocidad que las células normales, contribuyendo, de este modo, a la aparición y la progresión del cáncer.

Las proteínas tirosina quinasas constituyen una clase principal de oncoproteínas, y se dividen en dos grupos generales: receptores de membrana para factores de crecimiento; y enzimas citoplasmáticas. Los receptores de muchos factores de crecimiento tienen actividad quinasa. Tienden a ser proteínas integrales de membrana de gran tamaño, con dominios dispuestos en forma de módulos de diversas fuentes. El receptor del EGF es el paradigma para los receptores tirosin quinasa. Es un receptor del grupo I con su N-terminal en la superficie extracelular, tiene una única región que atraviesa la membrana, y tiene su extremo C dentro de la célula. La región N-terminal extracelular une el ligando que activa al receptor. La región C-terminal intracelular incluye un dominio que tiene actividad tirosin quinasa.

La dimerización de un dominio extracelular de un receptor activa la actividad tirosin quinasa del dominio intracelular. Cuando los dominios citoplasmáticos de los monómeros se ponen en contacto, desencadenan una reacción de autofosforilación, en la cual cada monómero fosforila a otro. (Figura 1)

El oncogén v-erb es una versión truncada de c-erbB, el gen que codifica para el receptor del EGF. La oncoproteína retiene los dominios tirosina quinasa y de membrana, pero carece de la parte N-terminal de la proteína que une a EGF, y no tiene c-terminal. Las deleciones en ambos extremos pueden ser necesarias para la oncogenia. El cambio en el dominio N-terminal extracelular permite a la proteína dimerizarse espontáneamente; y la deleción del C-terminal pierde a un dominio citosólico que inhibe la actividad transformadora. Existe también una mutación activadora en el dominio catalítico. Por lo que la base para la oncogenia es la combinación de mutaciones que activan al receptor constitutivamente.

El erbB2, codifica para un receptor íntimamente relacionado con el receptor del EGF. Una forma oncogénica consta de una mutación clave en su región de membrana; esto incrementa la posibilidad de que los monómeros del receptor formen dímeros.

La inmunohistoquímica (IHQ) se basan en la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), y consisten en incubar el Ag que queremos detectar, (en este caso el Her2), frente a un Ac (anti-Her2); y mediante un sistema de amplificación junto con el empleo de un sistema revelador; esta unión pueda ser visualizada al microscopio óptico. De esta forma el Ag protéico Her2 va a ser marcado con un cromógeno color café, y el marcaje se va a llevar a cabo en la membrana de la célula. Entre más Her2 se encuentre en esta membrana la señal de la marca va a ser mayor (Figura 2).

La hibridación es un fenómeno de importante aplicación práctica en todas las áreas de la Biología Molecular e Ingeniería Genética, y en especial en la Patología Molecular. La hibridación está basada en el proceso de renaturalización de dos cadenas sencillas de un DNA, que se observa, por ejemplo, al enfriar lentamente una solución del DNA dúplex previamente desnaturalizado por calor. La sensibilidad del apareamiento por puentes de hidrógeno entre bases complementarias (A-T, A-U o C-G), presentes en cadenas sencillas contiguas, da lugar a estructuras de doble hebra, de gran estabilidad. Éstas pueden ser híbridos DNA-DNA, híbridos RNA-RNA o híbridos DNA-RNA.

Al igual que las proteínas, los ácidos nucleicos se desnaturalizan por efecto de agentes químicos o físicos, perdiendo su conformación tridimensional, en especial la forma duplohelicoidal del DNA. La desnaturalización se debe tanto a la rotura de los puentes de hidrógeno entre pares de bases como de las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas. Al desnaturalizarse las dos hebra de DNA se separan y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, pues no hay ruptura de enlaces covalentes. En el caso de los RNAs, con muy distinta conformación tridimensional a pesar de su analogía en estructura primaria, la desnaturalización afecta fundamentalmente a los RNAt y RNAr, ya que son los que presentan regiones de doble hélice. Al no dar lugar a aplicaciones experimentales.

La desnaturalización se puede llevar a cabo con calor gradual llegando hasta los 95°C, o por agentes químicos como la urea, formamida o formaldehído.

La hibridación in situ fluorescente (FISH) es una técnica que se realiza sobre preparaciones en porta de cromosomas metafásicos o prometafásicos, tratados con fijadores para preservar las características morfológicas del cromosoma. Para hacer accesible la secuencia del DNA, se trata la muestra con enzimas proteolíticas y se desnaturaliza el DNA por calor, álcali o formamida para permitir su hibridación con la sonda. Inicialmente se emplearon sondas radiactivas, pero problemas técnicos en la detección de la señal limitan su utilidad. Se ha conseguido aumentar la sensibilidad y resolución con el empleo de sondas marcadas con fluorescencia. En esta técnica la detección se hace bajo microscopio de fluorescencia, bien de forma directa o por un método indirecto ⁷². (Figura 2)

En cuanto a sus aplicaciones, dada la gran detectabilidad de los fluorocromos actuales se puede emplear el FISH con fines muy diversos y se ha convertido en una técnica con elevado potencial diagnóstico en cromosopatías, genes tumorales, virología y trasplantes ⁷³.

Uno de los métodos surgidos de la hibridación in situ cromosómica es el denominado pintado de cromosomas, donde se usa como sonda una mezcla de fragmentos de DNA procedentes de un mismo cromosoma, con lo cual se observa fluorescencia en el cromosoma completo. Se facilita así la identificación visual de cada cromosoma (o varios simultáneamente, si se emplean sondas con distintos fluorocromos), en lo que se ha llamado un “cariotipo molecular”. Esto es útil para estudiar grandes reorganizaciones de los cromosomas, que tienen lugar por ejemplo en procesos cancerosos.

La hibridación in situ cromogénica (CISH) es una técnica de hibridación in situ en donde su diferencia con FISH consiste, en que en vez de utilizar un fluorocromo para marcar al gen Her2/neu, se utiliza un marcaje a base de un cromógeno, que va a teñir al gen de color café. Observándose en microscopía de luz células con dos marcas café en el núcleo en caso de que sea negativo, o más de 5 señales café en el núcleo en caso de positivo. En el momento de interpretar las laminillas, se puede realizar conjuntamente una evaluación histológica, haciendo esto más sencillo localizar el área con tumor mamario. (Figura2)

b. Patología

El cáncer de mama es la segunda enfermedad más común después del cáncer cervico-uterino en mujeres mexicanas mayores de 40 años. En EU junto con el cáncer de piel, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte seguida por el cáncer de pulmón. La probabilidad de desarrollar un cáncer de mama aumenta con la edad. La incidencia del cáncer mamario ha aumentado pero la mortalidad ha permanecido igual.

Factores de riesgo

- Edad y género: en la mayoría de los cánceres la edad es un factor importante. El 77% de los casos nuevos y 84% de las muertes por cáncer de mama ocurren en mujeres de 40 años o más. Más del 80% de todos los casos ocurre en mujeres de más de 50 años y menos del 1% ocurre en hombres. El riesgo de cáncer de mama está claramente relacionado con influencias hormonales, pero aún no está claro cómo afectan éstas la enfermedad y particularmente los tipos de enfermedad. Además se ha visto que la raza blanco tiene un factor agregado.
- Antecedentes familiares: mujeres con hermanas o mamá con cáncer de mama aumenta el riesgo 3 o 4 veces. El riesgo es mayor en pacientes cuyas mamas o hermanas padecieron de cáncer mamario antes de la menopausia o que hayan sido bilaterales, o en donde dos o más parientes se hayan enfermado. Sin embargo en el 75% de las pacientes con cáncer no han tenido familiares enfermas ⁷⁴.
- Factores genéticos: Algunos cánceres heredados se han asociado con el cromosoma 17. Este gen, BRCA1, se ha encontrado mutado en familias con una presentación temprana del cáncer mamario y ovárico. El 85% de las mujeres con mutación el BRCA1 van a presentar cáncer

de mama. Otros genes también se han encontrado relacionados como el BRCA2 (Her2/neu) en el 27-30% de los cánceres, TP53 (gen supresor tumoral). TP53 se ha encontrado en 1% de los cánceres mamarios en mujeres de 40 años. Existen otros como el BRCA3 y el Noey2 (enfermedad heredada por vía paterna). Las hormonas son importantes porque estimulan el crecimiento celular. Los altos niveles hormonales durante los años reproductivos de una mujer, especialmente cuando éstos no han sido interrumpidos por los cambios hormonales del embarazo, parecen aumentar las posibilidades de que las células genéticamente dañadas crezcan y causen el cáncer. Cuando el tumor expresa alteración en el Her2/neu, este va a tener un desarrollo más rápido, la metástasis va a ser en etapas más tempranas, la quimioterapia no es suficiente para el manejo de estas pacientes es necesario combinarla o no con trastuzumab (Herceptin).

- Pacientes nulíparas o mujeres cuyo primer embarazo fue después de los 35 años, aumentando el riesgo 1.5 veces.
- Menarquia y menopausia: mujeres con una menarquia tardía o menopausia artificial tienen una incidencia baja, en menarquia temprana (antes de los 12 años) o una menopausia natural tardía (después de los 50 años) tienen un mayor riesgo.
- Enfermedad fibroquística: cuando además hay cambios proliferativos, papilomatosis o hiperplasia epitelial atípica aumenta la incidencia.
- Mujeres que tuvieron cáncer de mama en un seno, tiene riesgo de desarrollar cáncer en el otro seno.
- Mujeres con cáncer uterino tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer mamario. Y el cáncer de mama aumenta el riesgo de cáncer endometrial.
- Anticonceptivos orales: los anticonceptivos orales pueden aumentar ligeramente el riesgo de cáncer de mama, dependiendo de la edad, el tiempo de uso y otros factores. No se sabe por

cuánto tiempo se mantiene este efecto después de suspenderlos. Este es controversial si se debe considerar como factor de riesgo o no.

- Terapia de reemplazo hormonal: se ha demostrado que el uso de la terapia de reemplazo hormonal aumenta el riesgo de sufrir cáncer de mama.
- Características físicas: como la obesidad; se ha asociado a los altos niveles de producción estrogénica en estas mujeres. Dieta alta en grasas.
- Consumo de alcohol: el alto consumo de alcohol (más de 1 ó 2 tragos al día) se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de mama.
- Químicos: varios estudios han señalado que la exposición a sustancias químicas similares a los estrógenos, que se encuentran en pesticidas y ciertos productos industriales, puede aumentar también este riesgo.
- DES: las mujeres que tomaron dietilstilbestrol (DES) para evitar abortos pueden tener un riesgo alto de sufrir cáncer de mama después de los 40 años.
- Radiación: las personas que han estado expuestas a la radiación, particularmente durante su infancia, pueden tener igualmente un riesgo alto de cáncer de mama en su vida adulta, sobre todo quienes recibieron radiación en el tórax por cánceres anteriores.
- Otros factores de riesgo: varios estudios han mostrado que el haber tenido tumores previos en las mamas, útero, ovarios o colon, y antecedentes de cáncer en la familia aumentan el riesgo de sufrir cáncer de mama. Tales antecedentes pueden ser indicio de factores genéticos descritos anteriormente.

Síntomas:

- El 70% de las pacientes presenta una tumoración indolora de firme a dura, y, por lo general, con bordes irregulares en el seno. Es raro pero pueden ser dolorosas. Estas masas generalmente se encuentran en el cuadrante superior externo (60%).
- Protuberancias o masas en la axila
- Cambio en el tamaño o forma de las mamas
- El pezón puede presentar secreción anormal de tipo sanguinolento, claro a amarillento, verdoso o purulento. Además de presentar erosión, cambios en color, retracción, alargamiento o comezón en pezón.
- Disminución de tamaño de la mama. Venas acentuadas en la superficie de la mama.
- Dolor, aumento de tamaño o molestia sólo de un lado
- Cualquier protuberancia, dolor, sensibilidad u otro cambio en las mamas de un hombre
- En enfermedad avanzada: dolor óseo, pérdida de peso, inflamación de un brazo y ulceración cutánea.
- Brazo edematizado
- Cuando hay metástasis: dolor óseo, ictericia, pérdida de peso.

Signos y exámenes

- En laboratorio se puede encontrar la VSG aumentada, aumento de fosfatasa alcalina, hipercalcemia en estados avanzados. Los marcadores tumorales más utilizados son ACE, CA

15-3, CA 27-29. Además el análisis de los receptores, tanto estrógenos como de progesterona, depara mejor información sobre la respuesta al tratamiento hormonal ⁷⁵.

- El estudio de la variación de la secuencia del gen BRCA1 está indicado en pacientes con neoplasia maligna de mama y de ovario. Los pacientes con una mutación heredada del gen BRCA1 tienen una probabilidad del 87% de padecer una neoplasia maligna de mama y alrededor del 33% de padecer un cáncer de ovario a lo largo de su vida. El estudio de la variación de secuencia del gen BRCA2 también está indicado ⁷⁶.
- La mamografía radiológica puede ayudar a identificar la masa mamaria.
- El ultrasonido puede mostrar si la protuberancia es sólida o contiene líquido.
- La aspiración con aguja o biopsia con aguja de las masas de la mama pueden mostrar si están llenas de líquido y proveer material para enviar al laboratorio para su análisis. En el caso de anomalías muy pequeñas, visibles sólo en la mamografía, son necesarias técnicas especiales.
- Una biopsia quirúrgica o extracción de una masa de la mama brinda una porción o toda una masa de la misma para estudio en el laboratorio. El 60% de las lesiones que clínicamente parecen malignas resultan ser benignas, el 30% de las lesiones que parecen ser benignas resultan ser malignas ⁷⁷.

Si se diagnostica un cáncer de mama, deben practicarse otros exámenes, incluyendo radiografías de tórax y exámenes de sangre. Luego puede indicarse cirugía, radiación, quimioterapia o una combinación de éstas, no sólo para el tratamiento, sino para ayudar a determinar la etapa en que está la enfermedad. La estadificación es importante para orientar tanto el tratamiento como el seguimiento y para tener una idea acerca de lo que se debe esperar en el futuro.

Etapas del cáncer de mama (según el American Joint Committee on Cancer): (Anexo 1)

ETAPA 0: enfermedad in situ, células cancerosas dentro del tejido mamario. Se le llama carcinoma canalicular in situ (DCIS) o carcinoma lobulillar in situ (LCIS). Sólo un pequeño porcentaje de tumores DCIS progresan a invasivos.

ETAPA I: tumor menor a 2 cm de diámetro sin diseminarse fuera de la mama.

ETAPA IIA: tumor de 2 a 5 cm de diámetro, sin diseminación a ganglios linfáticos axilares, o tumor de menos de 2 cm con diseminación a dichos ganglios.

ETAPA IIB: tumor mayor a los 5 cm de diámetro sin diseminación a ganglios linfáticos axilares o tumor de 2 a 5 cm con diseminación a estos ganglios.

ETAPA IIIA: tumor menor de 5 cm con diseminación a ganglios axilares unidos entre sí o a otras estructuras, o tumor mayor de 5 cm con diseminación a estos ganglios.

ETAPA IIIB: tumor con invasión a la piel de la mama o a la pared torácica, o que se ha diseminado a ganglios linfáticos dentro de la pared torácica a lo largo del esternón.

ETAPA IV: tumor de cualquier tamaño diseminado más allá de la mama y la pared torácica, como al hígado, los huesos o los pulmones.

Numerosos subtipos patológicos de cáncer mamario pueden ser identificados histológicamente.

(Anexo 2) estos tipos son distinguidos por la apariencia histológica y el patrón de crecimiento del tumor. En general, el cáncer mamario surge de la línea epitelial de los ductos (ductal) o del epitelio terminal de los ductos de los lóbulos (lobular). El cáncer puede ser in situ o invasivo.

Tratamiento

La selección del tratamiento inicial está basada en muchos factores. Para los cánceres en etapas I, II ó III, las principales consideraciones son tratar adecuadamente el cáncer y evitar la recurrencia, ya sea en el lugar del tumor original (local) o en cualquier otra parte del cuerpo (metastásica). Para la etapa IV, el objetivo es mejorar los síntomas y prolongar la supervivencia, sin embargo, en la mayoría de los casos, el cáncer en etapa IV no se puede curar.

La cirugía puede consistir en mastectomía parcial o radical, por lo general con la extracción de uno o más ganglios linfáticos de la axila. Se puede utilizar la técnica de ganglio centinela para encontrar a los ganglios linfáticos metastatizados.

Se puede utilizar la radiación dirigida al tejido.

La quimioterapia se utiliza para ayudar a eliminar las células cancerosas que aún puedan quedar en la mama o que ya se hayan diseminado a otras partes del cuerpo.

Las drogas, como el trastuzumab (Herceptin), se puede usar sola o con quimioterapia. Esta droga afecta el crecimiento y funcionamiento de las células cancerosas y del 20 al 25% de los cánceres de mama responden a ella. El trastuzumab no es quimioterapia pero se puede combinar con ésta. De hecho, estudios recientes muestran que agregarle trastuzumab a la quimioterapia o hacer un tratamiento con trastuzumab después de la quimioterapia ayuda a prevenir la recurrencia del cáncer y puede hacer que las personas que tengan cáncer de mama positivo para Her2 vivan por más tiempo.

Se utiliza terapia hormonal con tamoxifeno para bloquear los efectos del estrógeno que de otra manera puede ayudar a las células cancerosas a sobrevivir y crecer. La mayoría de las mujeres con cánceres de mama que presentan estrógeno o progesterona en su superficie se benefician del tratamiento con tamoxifeno. Una nueva clase de medicamentos denominados inhibidores de la aromatasa, como Aromasin, han demostrado ser tan buenos como o posiblemente mejores que el tamoxifeno en mujeres con cánceres de mama en la etapa IV.

La mayoría de las mujeres recibe una combinación de estos tratamientos. Para los tumores en etapa 0, el tratamiento estándar es la mastectomía o tumorectomía más radiación. Sin embargo, existe alguna controversia sobre la mejor manera de tratar el DCIS. Para los casos en etapas I y II, el tratamiento estándar es la tumorectomía (más radiación) o mastectomía con la extirpación de al menos el "ganglio centinela".

Después de la cirugía, se puede recomendar quimioterapia con o sin trastuzumab, terapia hormonal o ambas. La presencia de cáncer de mama en los ganglios linfáticos axilares es muy importante para la estadificación, y el tratamiento y seguimiento apropiados.

Las pacientes en la etapa III por lo general se tratan con cirugía seguida de quimioterapia con o sin terapia hormonal. También se puede considerar la radioterapia bajo circunstancias especiales.

El cáncer de mama en etapa IV se puede tratar con cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal o una combinación de éstas.

Pronóstico

La etapa clínica del cáncer de mama es el mejor indicativo para el pronóstico, además de otros factores. Las tasas de supervivencia a cinco años para los individuos con cáncer mamario que reciben el tratamiento apropiado son aproximadamente:

- ~ 95% para la etapa 0
- ~ 88% para la etapa I
- ~ 66% para la etapa II
- ~ 36% para la etapa III
- ~ 7% para la etapa IV

Los ganglios linfáticos axilares son la vía principal que las células cancerosas deben utilizar para llegar al resto del cuerpo y su compromiso en cualquier momento afecta significativamente el pronóstico.

La quimioterapia y la terapia hormonal pueden, por el contrario, mejorar el pronóstico en todos los pacientes y aumentar las posibilidades de curación en pacientes con tumores en las etapas I, II y III.

Si el tumor sobre expresa al Her2 o esta amplificado el Her2/neu el pronóstico es de peor expectativa, si no se recibe el tratamiento adecuado (Herceptin) la supervivencia disminuye del 5 hasta el 20%.

Complicaciones

Incluso con tratamientos agresivos y apropiados, el cáncer mamario puede metastatizar a pulmones, hígado y huesos. La tasa de recurrencia es de aproximadamente el 5% después de una mastectomía total y extirpación de los ganglios linfáticos de la axila cuando se encuentra que dichos ganglios no tienen cáncer. La tasa de recurrencia es del 25% en aquellos individuos con tratamientos similares cuando los ganglios tienen cáncer.

Otras complicaciones pueden ser resultado de la cirugía, la alteración del drenaje de la linfa desde el brazo, los cambios causados por la radiación y el tratamiento con quimioterapia y tamoxifeno. Sin embargo, las consecuencias de retrasar o evadir la detección temprana y el tratamiento del cáncer de mama son mucho más devastadoras y con frecuencia mortales.

Prevención

- ~ Dieta baja en grasas
- ~ Auto examen de mamas
- ~ Mamografía, a partir de los 40 años una vez al año.
- ~ Uso de antiestrogénicos: tamoxifeno (Nolvadex®) y raloxifeno (Evista®). Inhibidores de la aromataasa.
- ~ Mastectomía preventiva. En pacientes a quienes ya se les practicó una mastectomía parcial por esta enfermedad, mujeres con una herencia importante de cáncer de mama y aquellas que presentan mutación de genes p53, BRCA1 o tienen el gen BRCA2 (Her2/neu).

c. Antecedentes

La biología molecular tiene sus principios desde los babilonios (1.000a.C.) en donde polinizaban las palmeras, hasta la actualidad en donde se esta trabajando con la ingeniería genética para tratar de corregir las bases aberradas en enfermedades. Durante estos 3000 años, miles de investigadores, científicos, médicos, químicos, biólogos, microbiólogos, genetistas, etc., han trabajado arduamente, algunos de ellos han sido reconocidos con el Premio Nobel y muchos otros permanecen en el anonimato. Gracias a todos sus conocimientos y sus aportaciones es que ahora contamos con estas técnicas de hibridación in situ, y que les podemos dar cierta interpretación y así utilizarlas como herramientas en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento, seguimiento en enfermedades, y así poder ayudar a nuestros pacientes.

Durante la historia han sido un sin fin de eventos y de autores que aparecen, cada uno con una importancia significativa. En este trabajo me es imposible hacer memoria de cada uno, pero haré mención de algunos de ellos.

- 1.000 a.C.: los babilonios celebran con ritos religiosos la polinización de las palmeras.
- 323 a.C.: Aristóteles especula sobre la naturaleza de la reproducción y la herencia.
- 1838 se descubre que todos los organismos vivos están compuestos por células.
- 1859 Darwin hace pública su teoría sobre la evolución de las especies.
- 1866 Gregor Mendel, monje austriaco describe en los guisantes las unidades fundamentales de la herencia (genes).
- 1868 Friedrich Miescher, biólogo sueco, quien aísla DNA de las células de pus obtenidas de vendajes quirúrgicos y en el esperma del salmón. Lo llamó “nucleína”, aunque no fue reconocida hasta 1943 gracias al experimento realizado por Oswald Avery.
- 1871 se aísla el ADN en el núcleo de una célula.
- 1910 se descubre que los genes están en los cromosomas.

- 1925 se descubre que la actividad del gen está relacionada con su posición en el cromosoma.
- 1943 el ADN es identificado como la molécula genética.
- 1940-50: se descubre que cada gen codifica una única proteína.
- 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod, y Maclyn McCarty. Genetistas estadounidenses que demuestran el principio de “transformación” la manera de pasar la herencia por generaciones.
- 1962 James D. Watson y Frances H. Crick. En 1953, proponen un modelo tridimensional de la estructura del ADN: molécula de doble hélice formada por dos cadenas, cada una compuesta de azúcar y grupos fosfatos, conectadas por bases nitrogenadas. Junto con Maurice Wilkins reciben el Premio Nobel de medicina en 1962.
- 1973 tienen lugar los primeros experimentos de ingeniería genética en los que genes de una especie se introducen en organismos de otra especie y funcionan correctamente.
- 1980 Frederick Sanger, Alan Coulson, Alan Maxam, y Walter Gilbert. Científicos británicos, en los EUA desarrollaron técnicas de secuenciación de ADN. Equipos automatizados hacen que la velocidad de la secuenciación sea de rutina en laboratorios. Ganan el Premio Nobel de Química en 1980.
- 1983 se inventa la técnica PCR, que permite replicar (copiar) genes específicos con gran rapidez.
- 1987 propuesta comercial para establecer la secuencia completa del genoma humano (proyecto Genoma), compuesto aproximadamente por 100.000 genes.
- 1990 Charles Sibley y Jon Ahlquist fueron los pioneros en utilizar la cinética del ADN para investigar relaciones evolutivas utilizando la hibridación entre cadenas de DNA.
- 1997 Clonación del primer mamífero, una oveja llamada "Dolly".

JUSTIFICACIÓN

Este estudio pretende demostrar que el CISH puede ser una alternativa de FISH para el estudio de Her-2/neu en pacientes con cáncer de mama ductal invasor.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio del estado del Her-2/neu es importante para conocer el pronóstico y sobrevida de una paciente con cáncer de mama, además que es fundamental para tomar una decisión en cuanto a una terapéutica a base de Herceptin.

La IHQ es muy sensible, dando porcentajes importantes de falsos-positivos, por lo que se requiere corroborar con una prueba más específica.

FISH es una técnica que requiere de una infraestructura compleja, como microscopio de fluorescencia, cámara digital (señal dura 1 mes), una capacitación compleja para el personal tomando en cuenta que no se tiene tanta experiencia con la fluorescencia, además es una prueba costosa.

Es por esto que se requiere de una prueba sencilla y familiar como la IHQ, pero tan específica como el FISH. Una alternativa podría ser el CISH.

OBJETIVOS

- Validar las pruebas de CISH y FISH
- Demostrar que el CISH puede ser una alternativa para el FISH
- Comparar las tres metodologías CISH, FISH e IHQ

HIPÓTESIS

El CISH será una alternativa para el FISH en el estudio del oncogén Her2/neu en pacientes con cáncer de mama

Hipótesis nula: El CISH no se podrá utilizar como alternativa para el FISH en el estudio del oncogén Her2/neu en pacientes con cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Tipo de estudio

Este es un estudio analítico, transversal, de estudios diagnósticos.

b. Universo y muestra de estudio

El universo son todos los bloques de parafina con tejido tumor mamario recolectados desde el 2004 hasta junio del 2006. Se obtuvieron 96 bloques.

c. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

- Inclusión: Se incluyeron todos los bloques que tuvieran un reporte de FISH anterior realizado por el laboratorio de referencia, Quest Diagnostics- Nichols Institute (considerados como valores verdaderos) desde enero del 2004 a junio del 2006.
- Exclusión: Se excluyeron los bloques sin muestra tumoral.
- Eliminación: los bloques que fueran solicitados por el paciente o médico tratante. Los bloques que no cumplieran con los lineamientos de control de calidad.

d. Procedimiento a seguir

Todos los tejidos de mama fueron fijados en formol y luego incluidos en parafina. Estos bloques se conservan en el archivo de patología a temperatura ambiente.

De cada bloque se realizaron 4 cortes, 3 de 4 μ m y uno de 1 μ m. 3 de ellos montados en portaobjetos electrocargados y 1 en portaobjetos sin electrocarga.

Se realizó una tinción de hematoxilina eosina (HE) para localizar el área de tumor, y así eliminar el resto del material sin tumor.

- **IHC**

Se realizaron cortes de 1.5µm, se desparafinaron. La recuperación antigénica se llevó a cabo en Trilogy (CellMarque. 100 Greenwood ave., Suit B, Hot Springs, AR 71913) en recuperador a 95°C, por 40 min. A continuación se llevó a cabo una serie de lavados con agua destilada. Posteriormente se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% por 10 minutos. Se realizó un lavado con PBS (Bufer de Fosfato Salino) a un pH de 7.6 por 5 min. Se colocó el anticuerpo primario anti-Her2 (CB11, CellMarque Corp USA) por 2 hrs a 20°C. El sistema de detección se realizó con polímero-HRP (DAKOCytomation) por 30 min a 20°C. Para la visualización se utilizó un complejo de avidina-biotina-peroxidasa, utilizando DAB como cromógeno. Finalmente se contratiñó con hematoxilina Harris (Merck), se deshidrató y se cubrió con Tissue-Tek SCA (Finetek Japón Co., LTD). Un control positivo se realizó por cada muestra.

Para la interpretación, se consideró 3+ cuando la membrana tiñó fuertemente en >50% de las células tumorales, 2+ cuando la tinción fue un poco más débil y por último 0/1+ cuando la tinción fue muy leve o nula.

- **FISH**

Se utilizó el kit de PathVysion (Vysis Inc., Downers Grove, IL). Se realizaron cortes de 4µm de espesor montados en laminillas electro-cargadas, se incubaron por la noche a 56°C. Posteriormente se desparafinaron con xilol (4x10min), y se deshidrataron en alcohol 100% (2x5min). El pretratamiento se llevó a cabo, en solución de pretratamiento (PathVysion) a 80°C por 1hr. A seguir el tratamiento con proteasa se realizó en solución de proteasa (PathVysion) a 37°C por 45min. La fijación de la muestra se ejecutó con formol amortiguado 10% a temperatura ambiente x 10min. Posteriormente se desnaturalizó el ADN a 72°C por 5 minutos utilizando formamida 70% (pH 7-8),

inmediatamente después se lavó con etanol seriado (70%, 85%, 10%). Se aplicó 10 µl de sonda (LSI HER-2/CEP17; Vysis Inc., Downers Grove, IL) sobre el tejido. La hibridación se llevó a cabo en el HYBrite (Vysis-Abbot) por 14-18hrs a 37°C. Al día siguiente se realizaron lavados en solución post-hibridación (PathVysion), primero en temperatura ambiente hasta que los cubreobjetos se desprendieron y posteriormente a 72°C por 2min. Ya secos se aplicó 10µl de tinción de contraste DAPI. Se cubrió y se colocó a -20°C en oscuridad por 30min antes de su lectura. Se incluyeron controles positivos y negativos.

La técnica anterior consiste en 2 sondas de DNA marcadas. La sonda Her2 hibridiza con el gen Her2/neu, de color naranja. La sonda CEP17 marca de verde al centrómero del cromosoma 17p11.1-a11.1

Las señales se enumeraron en 20-60 células morfológicamente intactas y sin sobreposición. Para la captura de las imágenes se utilizó el sistema de Isis (Zeizz) y un microscopio Zeizz Axioskop 2 Plus. La amplificación se determinó por el cociente del gen/cromosoma. Cocientes <2, fueron considerados negativos, relaciones >2 positivos ⁷⁸.

▪ CISH

Se utilizó el reactivo de SPOT-Light de Zymed. Los cortes y deparafinación fueron similares a FISH. La recuperación antigénica se realizó con una incubación a 121°C por 15 min, en solución Tirlogy (Zymed) en olla a presión. Posteriormente se deshidrató con alcohol. Se colocó 10µl de sonda marcada con digoxigenina para Her2/neu (2 clonas BAC, Zymed), se cubrió y selló. La desnaturalización (10 min a 95°C) e hibridación (14-18hrs a 37°C) se realizaron en el HYBrite. Al día siguiente el lavado se llevó a cabo, primero en temperatura ambiente en TBST hasta que los cubreobjetos se separaron. Y luego a 72°C en solución de HybriWash (Zymed) por 5 min. Para la detección de la sonda de Her2/neu se realizaron incubaciones secuenciales con anti-digoxigenina, polímero de peroxidasa-antirratón y con cromógeno de diaminobenzidina (DAB) según las

instrucciones del fabricante (Zymed Inc., South Francisco, CA). Finalmente se realizó una ligera contratinción con hematoxilina y se cubrió ⁷⁹. Control positivo y negativo se incluyó en todas las corridas.

El SPOT-Light de Zymed detecta sondas marcadas con digoxigenina. Utiliza un sistema de detección HRP/DAB para localizar las sondas marcadas. El DAB crea depósitos café en el complejo de antígeno/anticuerpo/enzima.

Para su evaluación se utilizó un microscopio Axiostar de Zeiss con objetivos x40 y x100 (inmersión). Una muestra no amplificada se definió como <5 señales por núcleo, en el 50% de las células; la amplificación fue definida como >6 señales en el 50% de las células tumorales o cuando haya un cúmulo de señales. Imágenes fueron capturadas por una cámara digital Zeizz Axiocam MRC.

e. Variables

Variable independiente: resultados de FISH realizados por Quest Diagnostics.

Variable dependiente: sensibilidad, especificidad, VPP,VPN

f. Análisis estadístico

Se utilizaron hojas de Excel para el vaciado de información. Se calculó el coeficiente kappa, mediante el software SPSS para Windows versión 11, siendo la máxima concordancia de 1, y la mínima de 0 ^{80 81}.

Utilizando las tablas de contingencia (Tabla 1), sensibilidad se consideró como $(a/a+c)$, especificidad $(d/d+b)$, valor predictivo positivo (VPP) $(a/a+b)$, valor predictivo negativo (VPN) $(d/c+d)$. (Tabla 1)

H. RESULTADOS

En las figuras 3 y 4 se muestran ejemplos de las fotografías obtenidas por CISH Y FISH en el estudio del Her2/neu, se omiten resultados de IHQ.

De los 36 casos, 17 (47.2%) eran amplificadas y 19 (52.8%) no amplificadas. Por FISH se encontraron 15 (41.7%) amplificadas y 21 (58.3%) no amplificadas. (Tabla 2) Por CISH encontramos 14 (38.9%) de amplificadas y 22 (61.1%) no amplificadas. (Tabla 2) En IHQ encontramos 26 positivos (72.2%) y 10 (27.8%) negativos. (Tabla 2)

En cuanto a FISH se encontró que su sensibilidad es del 88.2% y su especificidad del 100%, su VPP del 100% y el VPN del 90.5%. En CISH se observó una sensibilidad del 82.4%, con una especificidad del 100%, VPP del 100% y un VPN del 86.4%. Y en la IHQ se confirma la baja especificidad del 52.6% con una sensibilidad del 100%, un VPP del 65.4% y un VPN del 100%. (Tabla 2)

Se encontró una alta concordancia de FISH del 94.5%, de CISH fue de 91.7% y de IHQ de 75%. Los coeficientes kappa fueron altos en FISH y CISH del 0.888 y 0.831 respectivamente y de 0.512 en IHQ ($p < 0.001$) (Tabla 3).

Se correlacionó FISH con CISH, en donde se obtuvieron 14 casos amplificadas, 21 casos no amplificadas; hubo 1 caso amplificado por FISH pero no por CISH (Tabla 4). Se encontró una concordancia del 97.2% (coeficiente kappa del 0.942, $p < 0.001$)

Se comparó la sobre expresión del Her2 por IHQ con la amplificación del Her2/neu por CISH y FISH (Tabla 5). Encontrándose que la IHQ es pobremente específica, obteniendo 30.5% de falsos-positivos. En los casos de 2+ , el 66.7% fueron falsos-positivos; en 3+, el 21.4% (Tabla 4). La concordancia con FISH fue de 69.5% (coeficiente kappa 0.431), la concordancia con CISH fue de 66.7% (coeficiente kappa 0.393).

I. DISCUSIÓN

Actualmente el estudio del oncogén Her2/neu en casos de cáncer mamario invasor se ha vuelto rutinario, gracias a su valor pronóstico y a la importancia que representa para la toma de decisión ante la terapéutica a base de Herceptin^{82 83 84 85}. Para tratar a una paciente con este medicamento hay que tomar en cuenta uno de los efectos secundarios con mayor trascendencia, la cardiotoxicidad, sobre todo en pacientes mayores de 50 años que han sido sometidas a altas dosis de quimioterapia o antraciclina^{86 87}. Sin embargo, el costo-beneficio que ofrece este medicamento hace que sea empleado ya sea solo, o en combinación con algún otro quimioterapéutico⁸⁸, en pacientes que sobre expresan al Her2 en 2+ o 3+ por IHQ.

Este estudio cumple con su objetivo de poder evaluar tanto FISH como CISH, como una posible nueva metodología dentro de nuestros laboratorios de patología. Los resultados muestran una concordancia satisfactoria de las técnicas de FISH y CISH realizados en nuestras instalaciones. Quedando abierta la propuesta para la iniciación de estas metodologías en nuestro hospital.

También por medio de este estudio pudimos demostrar que el CISH es una alternativa para la sustitución del FISH ya que se obtuvo una concordancia aceptable entre ambas metodologías.

La ventaja de utilizar FISH a dos colores (dos sondas simultáneas), estriba en que nos es posible diferenciar entre una amplificación real y una aneuploidia. Esta detección de polimorfismo cromosómico no es posible por la técnica de CISH, ya que utiliza solo un cromógeno para el gen, percibiendo posibles amplificaciones sin poderlo diferenciar de una polisomía. En nuestro caso nos fue posible detectar aneuploidia, pero hay estudios en donde presentan casos de falsos-positivos, sobre todo en leve amplificación. Por esto se sugiere confirmar con FISH o por índice de ploidia (citometría), cuando se sospeche de aneuploidia.

Encontramos las siguientes ventajas CISH sobre FISH:

- 1.- Es posible estudiar la morfología celular y tisular del área analizada en forma simultánea.
- 2.- CISH requiere de un microscopio de luz convencional contra uno de fluorescencia.
- 3.- La señal es permanente.
- 4.- La evaluación es más rápida.
- 5.- Es menos costoso.
- 6.- La capacitación es más sencilla porque los patólogos se encuentran familiarizados con inmunoreacciones.
- 7.- El pre-tratamiento, la incubación en la olla a presión y la corta digestión enzimática, hacen innecesario el ajuste de técnica para cada corrida de muestras. En FISH se recomienda el ajuste del pretratamiento de acuerdo al tiempo de inclusión en parafina.

En cuanto a la IHQ, en nuestro hospital es la prueba de tamizaje utilizada. En la literatura se reportan porcentajes de falsos positivos, y de 5 a 10% en las IHQ de 3+, los resultados encontrados en nuestra población son del 21.4%, lo cual podría explicarse por la alta sensibilidad que presenta esta prueba (100%). Es por esto que se sugiere ampliamente la utilización de las pruebas confirmatorias ya sea por FISH o CISH, para evitar o disminuir la terapéutica inadecuada^{89 90 91 92 93}
^{94 95 96}. También existen algunas hipótesis sobre este comportamiento, este tipo de Her2 es más sensible a la tinción, o que sea un subgrupo que se sobre expresa sin amplificarse. Sin embargo hay autores que concluyen diciendo que una IHQ 3+ es suficiente para identificar neoplasmas con amplificación^{97 98}. Algunos autores recomiendan dar tratamiento a pacientes con IHQ 3+, sin confirmar la amplificación⁹⁹.

Es importante seguir con la investigación de este gen por sus implicaciones y utilización para una posible vacuna para tratar al carcinoma ductal o para prevenir su recurrencia^{100 101}. Su importancia en el estudio de nuevos medicamentos, es primordial, como es el caso del Lapatinib, hecho por

GlaxosmithKline para tratar a mujeres que sobre expresan el Her2/neu pero que son resistentes a Herceptin, este bloquea receptores internos de tirosin kinasa, inhibiendo la fosforilación del EGFR-2 suprimiendo la proliferación de tumores sólidos^{102 103 104}.

Este estudio, puede ser considerado como piloto para en un futuro realizar la validación de estas pruebas con una muestra mayor; y así poder hacer uso de estas técnicas en nuestro hospital, para decidir la terapéutica adecuada en pacientes con cáncer de mama; que desgraciadamente cada vez son más, aumentando en mujeres mayores de 40 años.

Concluimos que CISH es una buena alternativa para FISH en el estudio de la amplificación del gen Her2/neu en pacientes con cáncer de mama ductal invasivo; en base a la alta concordancia encontrada con FISH (estándar de oro). Resultó ser una técnica más sencilla, más barata, fácil de archivar, que no requiere instrumental especial; parecido a la IHQ. Además este estudio se puede utilizar como base para en un futuro contar con este tipo de estudios en nuestro hospital. Y por último concluimos que todas las IHQ positivas deben ser confirmadas por FISH o CISH.

J. CONCLUSIONES

- Se validaron los procedimientos de hibridación in-situ (CISH y FISH) para ser realizados en nuestro hospital.
- CISH es una buena alternativa de FISH para el estudio de pronóstico y terapéutica, en pacientes con cáncer de mama ductal invasivo.
- Se deben de corroborar a todas las IHQ positivas por una metodología más específica, ya sea FISH o CISH.

K. RECOMENDACIONES

La biología molecular es un área que ha ido tomando un papel muy importante en el área de diagnóstico de las enfermedades. Ya que estos estudios son muy sensibles y específicos cada vez más laboratorios implementan este tipo de estudios en sus corridas de rutina. Ha adquirido gran importancia en enfermedades hereditarias, oncológicas, hematológicas entre otras.

Se ha visto que la IHQ, no es lo suficientemente específica como para considerarla único estudio; por lo que se recurre al FISH, el estándar de oro.

FISH es una técnica compleja de realizar, cara, y requiere de instrumental y personal especial. Pero vimos que el CISH puede ser una buena alternativa.

Recomendaciones en cuanto a la metodología de FISH:

- ~ Si se manejan muestras fijadas en parafina por más de 3 meses, se debe de ampliar el tiempo en xilol, de lo que marca su inserto. 4 cambios de xilol de 10 minutos.
- ~ El tiempo en la solución de pretratamiento dejarlo por 60min. El doble de tiempo sugerido por el fabricante.
- ~ Y el tiempo del tratamiento con proteasa, aumentarlo a 45 min.
- ~ Temperatura, pH y tiempo preciso.
- ~ La cámara de hibridación Hybrite, debe permanecer húmeda. Se puede utilizar una gasa húmeda.
- ~ Utilizar agua estéril
- ~ Utilizar nuevos reactivos cada día
- ~ Utilizar guantes al aplicar la sonda

- ~ Realizar una tinción de HE al tumor para verificar el área de tumor, y el resto del tejido eliminarlo. De esta forma se utiliza menos cantidad de sonda.
- ~ Se puede utilizar 5 μ l de sonda.

- ~ Realizar la hibridación en el Hybrite. El inserto sugiere hacerlo en una estufa en cajas de plástico humidificadas.
- ~ Sellar las puntas del cubreobjetos con barniz de uñas

Recomendaciones en cuanto a la metodología de CISH:

- ~ Utilizar vasos coplin de plástico en la olla exprés
- ~ Utilizar agua estéril
- ~ Los pasos de lavado se pueden alargar un poco para eliminar los residuos.
- ~ Al aplicar las gotas de reactivo, secar con pañuelo de papel las orillas.
- ~ Utilizar el Hybrite para las incubaciones de 37°C. El inserto sugiere hacerlo en estufa en cajas de plástico humidificadas.
- ~ La contratinción con hematoxilina, por 3 segundos. Para dejar claros los núcleos y así poder observar las señales cafés.
- ~ Cubrir con resina líquida y cubreobjetos largo.
- ~ No hay tejidos de control hechos por el fabricante. Tener cortes ya preparados positivos y negativos para el uso de cada corrida.

L. ANEXOS

a. Cuadros de resultados

Figura 1: La activación del receptor de un factor de crecimiento implica la unión de un ligando, dimerización y autofosforilación. Un receptor oncogénico truncado que carece de la región de unión del ligando es constitutivamente activo porque no tener la represión de la terminal N.

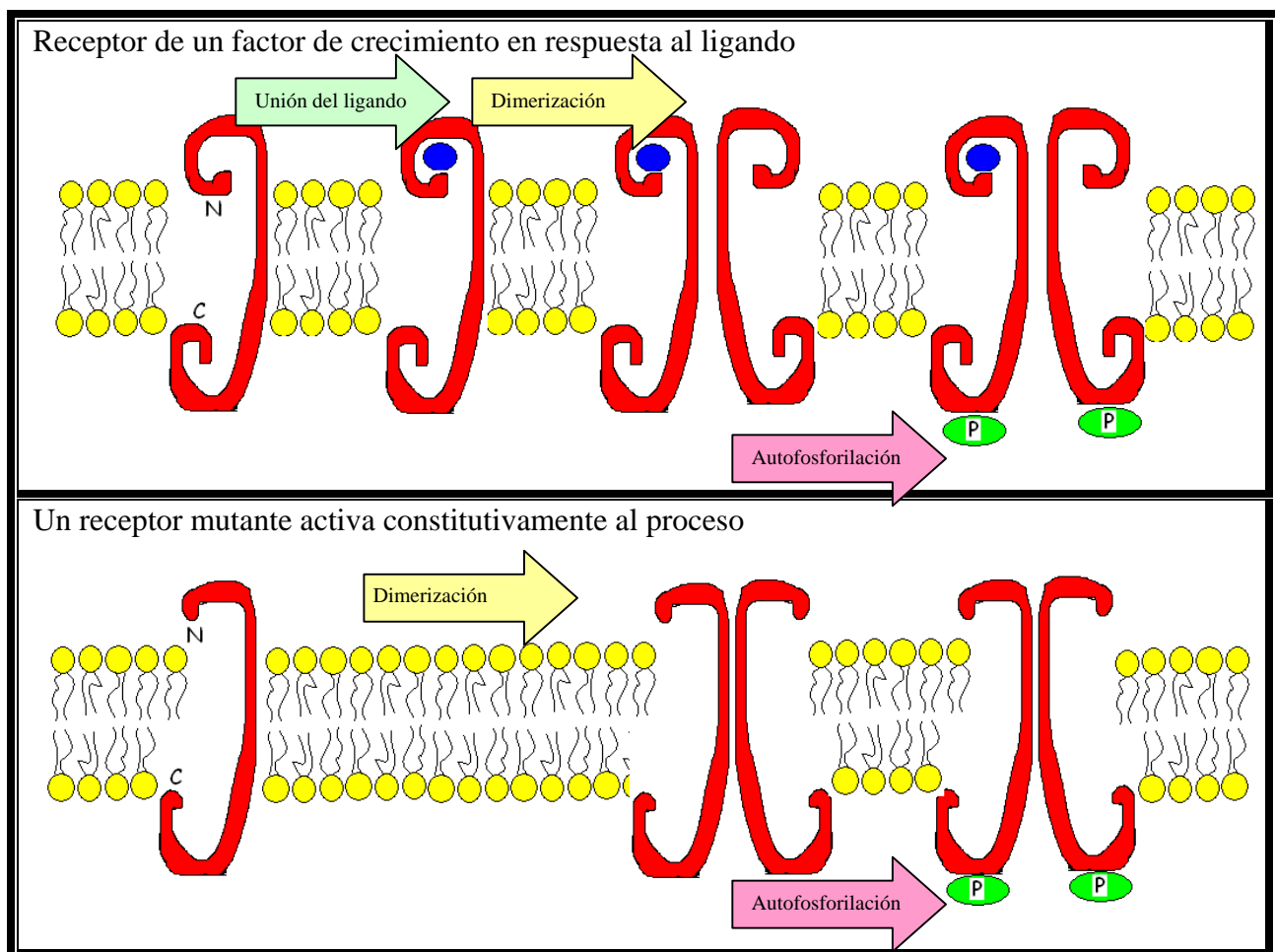
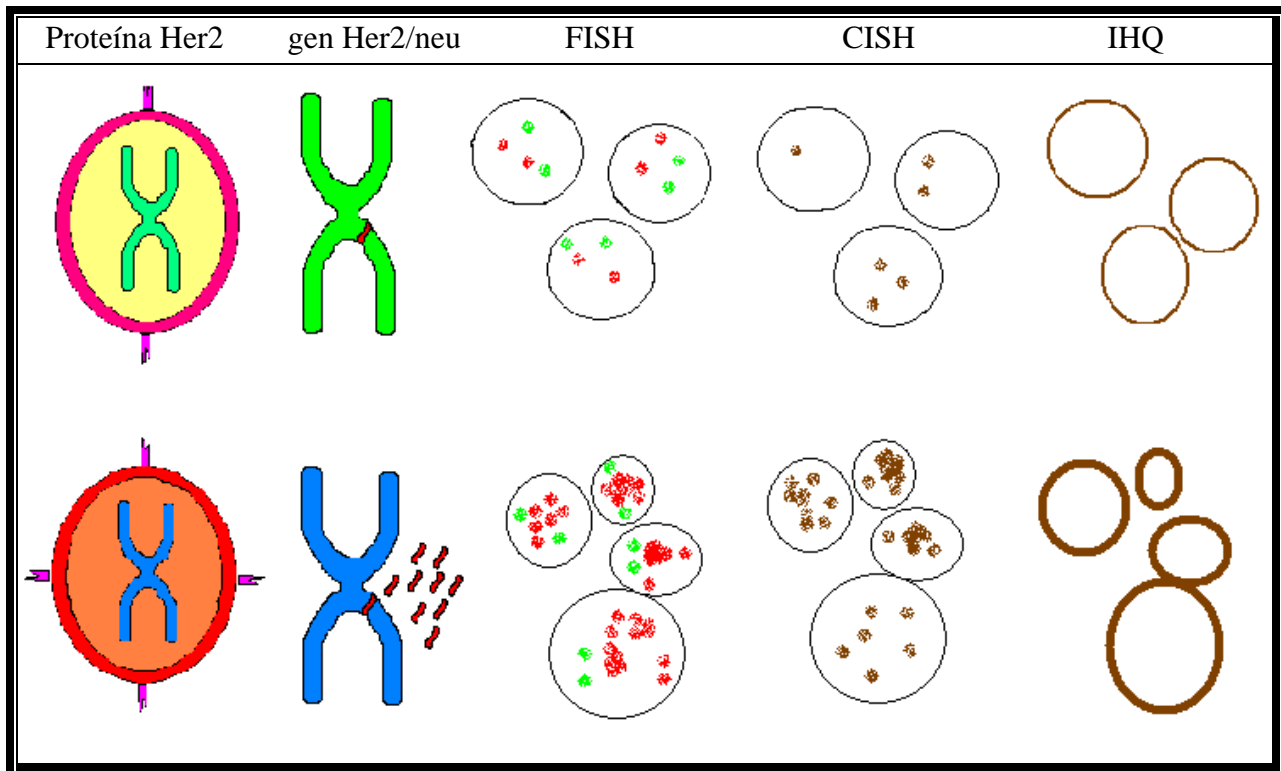


Figura 2. Esquema de los marcajes de FISH, CISH e IHQ. Arriba se observa una célula normal, en la parte inferior una célula con sobre expresión de Her2 y amplificación de Her2/neu.



Anexo 1. Estadificación por TNM en cáncer de mama

Etapa	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

TAMAÑO DEL TUMOR (T)	
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ; carcinoma intraductal, carcinoma lobular in situ, enf de Paget del pezón sin tumor.
T1	<2cm T1mic: microinvasión T1a: 0.1-0.5cm T1b: 0.5-1cm T1c:1-2cm
T2	2-5cm
T3	<5cm
T4	Tumor de cualquier tamaño T4a: Extensión a la pared torácica T4b: Edema o ulceración de piel en el seno o nódulos satelitales en el mismo seno T4c: ambos T4a y T4b T4d: carcinoma inflamatoria
NÓDULOS LINFÁTICOS (N)	
N0	Nódulos linfáticos regionales sin metástasis
N1	Nódulos linfáticos axilares ipsilaterales
N2	Nódulos linfáticos axilares ipsilaterales adheridos a otras estructuras
N3	Nódulos linfáticos internos mamarios ipsilaterales
METÁSTASIS A DISTANCIA	
M0	No metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Anexo 2. Tipos histológicos de cáncer de mama y su frecuencia.

TIPO	Frecuencia
Ductal infiltrante	80-90%
Medular	5-8%
Coloide (mucinoso)	2-4%
Tubular	1-2%
Papilar	1-2%
Lobular invasivo	6-8%
No invasivo	4-6%
Intraductal	2-3%
Lobular in situ	2-3%
Cánceres raros	<1%
Juvenil (secretorio)	
Epidermoide	
Sudoriferous	

Tabla 1. Tabla de contingencia.

Valores de referencia Valores experimentales	POSITIVOS	NEGATIVOS	
POSITIVOS	a	b	a+b
NEGATIVOS	c	d	c+d
	a+c	b+d	Total (a+b+c+d)

Figura 3. CISH para Her2/neu en cáncer de mama. Arriba se observan dos tumores con >5 copias, inclusive se observan acúmulos de señales considerados como positivos. Abajo dos tumores con <5 copias considerados negativos.

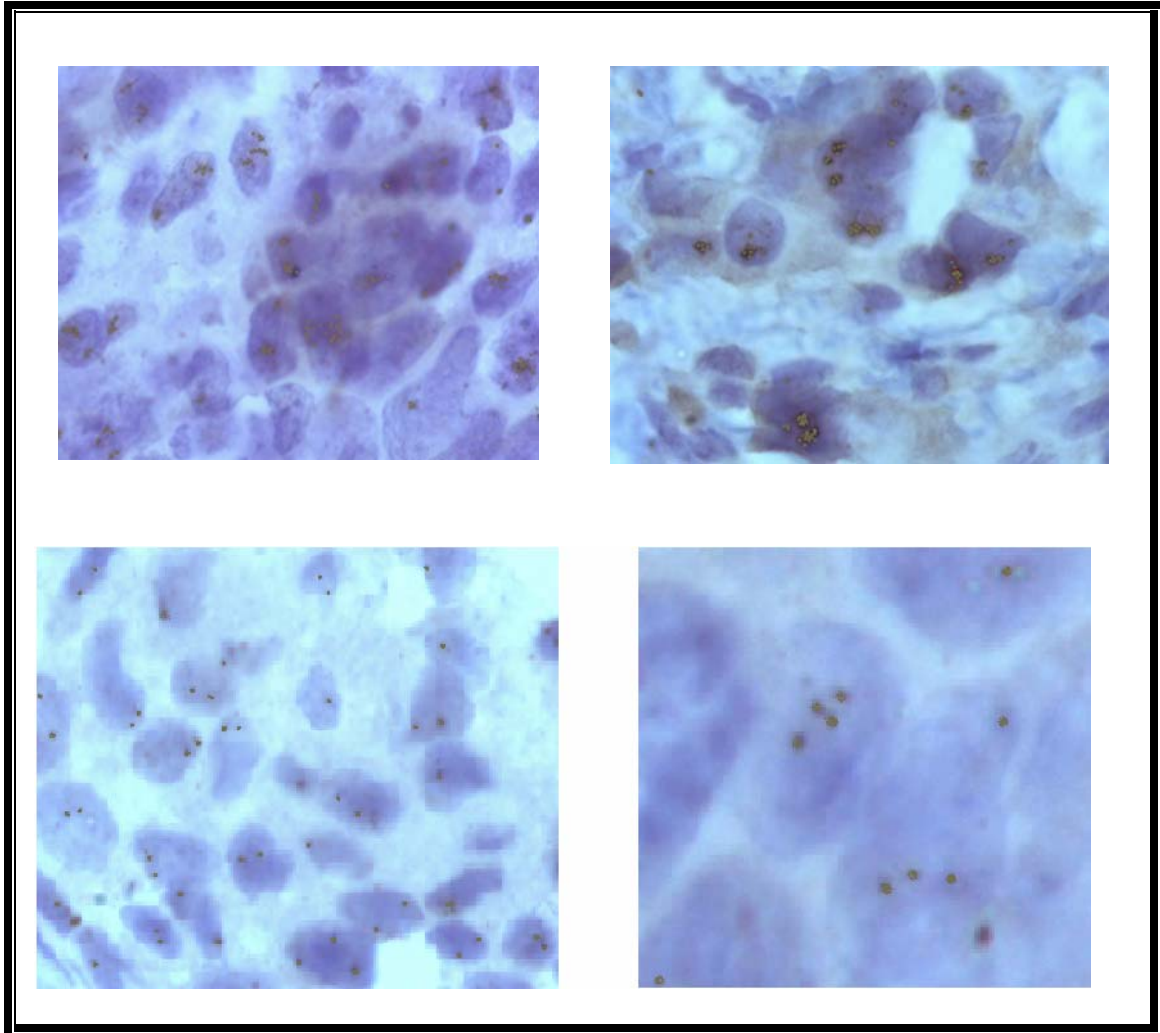
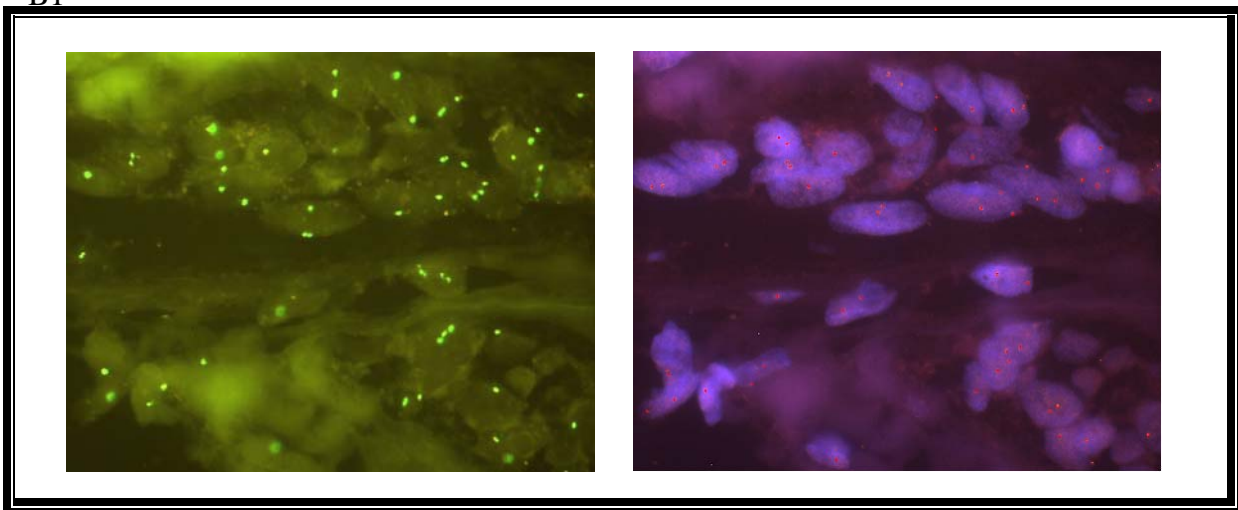


Figura 4. FISH para Her2/neu en cáncer mamario. B1: relación <2 , sin amplificación. B2: relación >2 , amplificado. En verde se observa el centrómero del cromosoma 17q, en naranja se observa el Her2/neu.

B1



B2

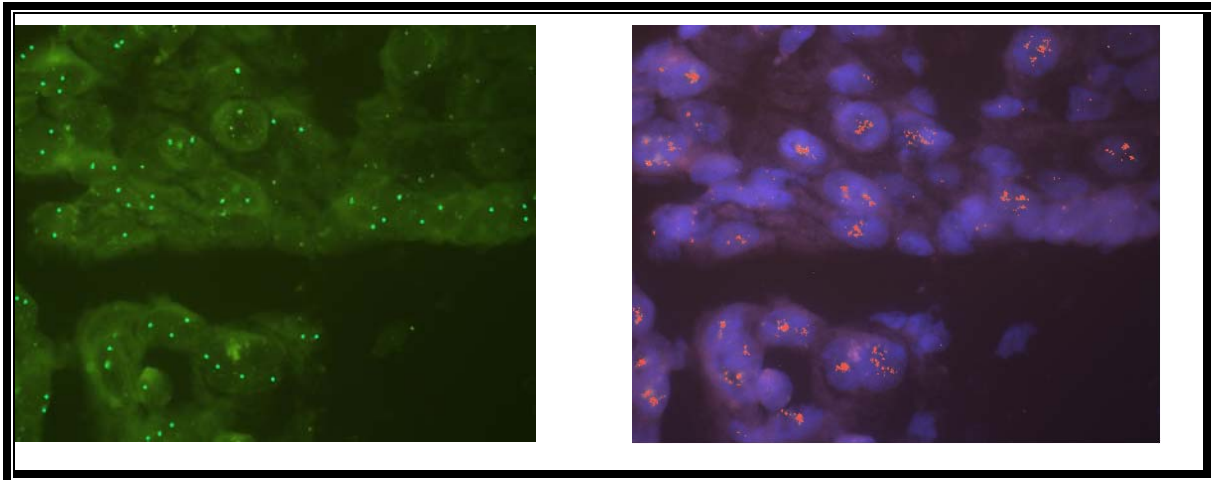


Tabla 2. Tablas de contingencia entre FISH, CISH e IHQ en la detección del Her2/neu en 36 casos de cáncer mamario.

		REFERENCIA		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
FISH	POSITIVO	15	0	15
	NEGATIVO	2	19	21
CISH	POSITIVO	14	0	14
	NEGATIVO	3	19	22
IHQ	POSITIVO	17	9	26
	NEGATIVO	0	10	10
TOTAL		17	19	36

Tabla 3. Coeficiente kappa y concordancia entre FISH, CISH e IHQ, en 36 casos de cáncer mamario.

Método	No. positivos/ No. negativos	Coeficiente kappa	Concordancia
FISH	15/21	0.888	94.5%
CISH	14/22	0.831	91.7%
IHQ	26/10	0.512	75%

Tabla 4. Comparación entre CISH y FISH en el estudio de Her2/neu en 36 muestras con cáncer de mama.

		FISH Experimental		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
CISH experimental	POSITIVO	14	0	14
	NEGATIVO	1	21	22
TOTAL		15	21	36

Tabla 5. Relación entre FISH y CISH con IHQ, en 36 casos de cáncer mamario.

		FISH Experimental		CISH Experimental		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
IHQ Experimental	POSITIVO	15	11	14	12	26
	NEGATIVO	0	10	0	10	10
TOTAL		15	21	14	22	36

M. REFERENCIAS

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321(7261):624-628
2. Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol* 2005; 16(3): 489-511
3. Robles-Vidal CD, Lizano-Soberón M, Wójcik EJ. Epidemiología del Cáncer Mamario. En: Tratado de las enfermedades de la glándula mamario. Ed: Sánchez Basurto, Sánchez Forgach Gerson Cwilich. Manual Moderno 2003; pp.133-40
4. Castelazo Rico G, Molotla Xolalpa D, Basavilvazo Rodríguez MA, Angeles Victoria L, Zárate A, Hernández Valencia M. Survival of breast cancer patients treated with inhibitors of the aromatase vs tamoxifen. *Ginecol Obstet Mex* 2004; 72: 493-9
5. Vidal-Millan S, Zeichner-Gancz I, Flores-Estrada D, Vela-Rodríguez BE, Vazquez-López MI, Robles-Vidal CD, Ramirez-Ugalde MT, Chávez-MacGregor M. A descriptive study of second primary malignancies associated to breast cancer in a mexican Hispanic population. *Med Oncol* 2005; 22(1): 17-22
6. Valladares A, Salamanca F, Madrigal-Bujaidar E, Arenas D. Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152(2): 163-6
7. Mun Govea ME, Gaxiola Robles R, Balderas Peña LM, Barragán Ruiz JA, Salas González E, González Ojeda A. Epidemiology of cancer in Hospital de Ginecoobstetricia, Centro Médico Nacional de Occidente. *Ginecol Obstet Mex* 2003; 71: 626-32
8. Gerson-Cwilich R, Serrano-Olvera A, Villalobos-Prieto A. Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. *Clin Transl Oncol* 2006; 8(3): 200-7
9. Medina-Franco H, Garza E, Gabilondo B, Gaona-Luviano P. Risk of invasive breast cancer in Mexican population and patterns of screening and prophylaxis. *Rev Invest Clin* 2004; 56(4): 422-6
10. Todorovic-Rakovic N, Jovanovic D, Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D. Comparison between immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization in assessing HER-2 status in breast cancer. *Pathol Intl* 2005, 55(6):318-323
11. Ross JS, Fletcher JA: The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 1998, 3(4):237-252.
12. van der Groep P, Bouter A, van der Zanden R, Siccama I, Menko FH, Gille JJP, van Kalken C, van der Wall E, Verheijen RHM. Distinction between hereditary and sporadic breast cancer on the basis of clinicopathological data. *J Clin Pathol* 2006;59:611-617
13. Funkhouser WK, Kaiser-Rogers K. Significance of, and optimal screening for HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast carcinoma. *Ann Clin Lab ACI* 2001; 31:349-58
14. Rojas-Atencio AE, Valbuena I, Urdaneta K. Relación entre la amplificación del oncogén C-erbB-2 y parámetros histológicos con sobrevida libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama. *Rev Med Chile* 2005; 133:151-7
15. Cuesta-Mejías T, Mendoza-Ramon H, Alcaraz-Silva J, Torres J, Ortiz-Hidalgo C. Marcadores biológicos en carcinomas mamarios con alta sobreexpresión de proteína Her2. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69:161-6
16. Alvarez RI, Escobar X, Camacho R, Orozco M, Llanes L, Cruz J, Guerra M. Determinación inmunohistoquímica del HER2 en una muestra de pacientes con cáncer de mama del INOR. 2004. VI Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.
17. Oakley GJ, Tubbs RR, Crowe J, Sebek B, Budd GT, Patrick RJ, Procop GW. HER-2 Amplification in Tubular Carcinoma of the Breast. *Am J Clin Pathol* 2006; 126:55-58
18. Ross JS, Fletcher JA: HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999, 112:S53-S67

19. Isola J, Tanner M, Forsyth A: Interlaboratory Comparison of HER-2 Oncogene Amplification as Detected by Chromogenic and Fluorescence in situ Hybridization. *Clin Cancer Res* 2004, 10:4793-8
20. Hanna WM, Kwok K: Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol* 2006, 19:481-487
21. Ross JS, Flethcer JA, Bloom KJ: Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004, 3:379-398
22. Stamatina K, Lee T, Beiyun C. Her-2/ neu and Breast Cancer. *Diag Molec Pathol* 2001; 10(3):139-152.
23. Fernández-Sánchez M; Gamboa-Dominguez A; Uribe N; García-Ulloa AC; Flores-Estrada D; Candelaria M; Arrieta O. Clinical and pathological predictors of the response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Med Oncol* 2006; 23(2): 171-83
24. Muñoz-Gonzalez D, Zeichner-Gancz I, Candelaria M, Ramirez-Ugalde MT, Perez-Sanchez M, Cervantes-Vazquez G, Cantu-de Leon D, Mora-Tizcareño A, Leonor-Ortíz J. Her-2/neu expression as a predictive factor for response to anthracycline-based chemotherapy in a mexican population of locally advanced breast cancer patients. *Med Oncol* 2005; 22(1): 23-8
25. Nahta R, Esteva FJ. HER-2-Targeted Therapy: Lessons Learned and Future Directions. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5078-5084.
26. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosin kinases as targets for cancer therapy. *N Eng J Med* 2005; 353:172-87.
27. Shak S: Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 1999, 6:71-77
28. Cobleigh M, Vogel C, Tripathy D, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter J, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. *J Clin Oncol* 1999; 17(9): 2639
29. Norum J, Risberg T, Olsen JA. A monoclonal antibody against HER2 trastuzumab for metastatic breast cancer: a model based cost effectiveness analysis. *Ann Oncol* 2005; 16(6):909-914
30. Suo Z, Daehli K, Lindboe C, Borgen E, Bassarova A, Nesland J. Real-Time PCR Quantification of c-erbB-2 Gene is an Alternative for FISH in the Clinical Management of Breast Carcinoma Patients. *Intl J Surg Pathol* 2004,12(4):311-318
31. Suo Z, Daehli K, Lindboe C, Borgen E, Bassarova A, Nesland J. Real-Time PCR Quantification of c-erbB-2 Gene is an Alternative for FISH in the Clinical Management of Breast Carcinoma Patients. *Intl J Surg Pathol* 2004; 12(4):311-318
32. Kong SY, Kang JH, Kwon Y, Kang HS, Chung KW, Kang SH, Lee DH, Ro J, Lee ES. Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 373-736
33. Tsuda H, Tani Y, Hasegawa T, Fukutomi T. Concordance in judgements among c-erbB-2 (HER2/ neu) overexpression detected by two immunohistochemical tests and gene amplification detected by Southern blot hybridization in breast carcinoma. *Pathol. Int.* 2001; 51: 26-32.
34. Hauser-Kronberger C, Dandachi N. Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. *J Mol Histol* 2004; 35(6): 647-53
35. Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher D. Determination of Her-2/ neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000; 13: 37-45.

36. Piña-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C. Biomarcadores como factores pronósticos y predictivos en carcinoma de glándula mamaria. Criterios actuales de interpretación por inmunohistoquímica. *Patología* 2006;44(1):45-49.
37. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ: Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994, 54:2771-2777
38. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al: Specificity of HercepTest in determining Her-2/neu status of breast cancer using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 17: 1983-1987, 1999
39. Press M, Slamon D, Flom K, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of Her-2/neu Gene Amplification and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens. *J Clin Oncol* 2002; 20(14):3095-3105
40. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ: Specificity of Hercep Test in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999, 17:1983
41. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ: Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:1974
42. Mitchell MS, Press MF: The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Semin Oncol* 1999, 26:108-116
43. Espinoza F, Anguiano A, Roche PC, Ingle JN: The HercepTest assay: another perspective. *J Clin Oncol* 1999, 17:2293B
44. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW: Amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:5321-5325
45. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ: Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996, 13:63-72
46. Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Crafa P, Naldi N, Cascinu S. HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Ann Oncol* 2002; 13(9):1398-1403.
47. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ: HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997, 15:2894-2904
48. Denoux Y, Arnould L, Fiche M, Lannes B, Couturier J, Vincent-Salomon A, Penault-Llorca F, Antoine M, Balaton A, Baranzelli MC, Becette V, Bellocq JP, Bibeau F, Ettore F, Fridman V, Gnassia JP. HER2 gene amplification assay: is CISH an alternative to FISH? *Ann Pathol* 2003; 23(6): 617-22
49. Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER2neu status in breast carcinoma Application in screening of patients for trastuzumab Herceptin therapy. *Pathol Int* 2001; 51(8):579-584.
50. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart M, Isola J: Chromogeni 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):1467-1472
51. Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2003; 119(3): 381-7

52. Rummukainen J, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola J. Amplification of c-myc Oncogene by Chromogenic and Fluorescence In Situ Hybridization in Archival Breast Cancer Tissue Array Samples. *Lab Invest* 2001; 81(11):1545-1551
53. Loring P, Cummins R, O'Grady A, Kay E. HER2 Positivity in Breast Carcinoma A Comparison of Chromogenic In Situ Hybridization With Fluorescence In Situ Hybridization in Tissue Microarrays With Targeted Evaluation of Intratumoral Heterogeneity by In Situ Hybridization. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2005;13(2):194-200
54. van de Vijver M, Rueschoff J, Penault-Llorca F, Bilous M, Hanna W. Chromogenic in situ hybridisation CISH compared with FISH and IHC for detection of HER2 gene amplification an international validation ring study. *Breast Cancer Research & Treatment* 2003; 82(1):S75
55. Kim GY, Oh YL. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER2neu status in cytological samples of breast carcinoma. *Cytopathol* 2004; 15(6):315-320
56. Dandachi N, Dietze O, Hauser Kronberger C. Evaluation of the clinical significance of HER2 amplification by chromogenic in situ hybridization in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res* 2004, 24(4):2401-6
57. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol* 2005; 18(8): 1015-21
58. Wixom C, Albers E, Weidner N. Her2 Amplification Correlation of Chromogenic In Situ Hybridization With Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2004; 12(3):248-251.
59. Sartelet H, Lagonotte E, Lorenzato M, Duval I, Lechki C, Rigaud C, Cucherousset J, Durlach A, Graesslin O, Abboud P. Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:864-871.
60. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. *Oncologist* 2003; 8(4):307-325.
61. Kyeongmee P, Kyoung-Mee K. Comparing Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and chromogenic in situ hybridization to determine the HER2/neu status in breast cancer. *An Oncol* 2003, 14(3)
62. Lin F, Shen T, Prichard JW. Detection of Her-2/neu oncogene in breast carcinoma by chromogenic in situ hybridization in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol* 2005; 33(6): 376-80
63. Chang E, Lee A, Lee E, Lee H, Shin O, Oh S, Kang C. HER-2/neu oncogene amplification by chromogenic in situ hybridization in 130 breast cancers using tissue microarray and clinical follow-up studies. *J Korean Med Sci* 2004, 19(3):390-6
64. Li-Ning-T E, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino M. Role of Chromogenic in Situ Hybridization CISH in the Evaluation of HER2 Status in Breast Carcinoma Comparison with Immunohistochemistry and FISH. *Intl J Surg Pathol* 2005; 13(4):343-351
65. Zhao J, Wu R, Au A. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15:657-665
66. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization. A novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82:1007-1014.
67. Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology* 2006; 38(2):120-4
68. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, Mathieu MC, Vincent-Salomon A, Vilain MO, Couturier J. Agreement between chromogenic in situ

- hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88(10): 1587-91
69. Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, Sneige N, Wiley EL. The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(4): 501-7
 70. Vocaturo A, Novelli F, Piperno G, Scordati P, Cianciulli A, Merola R, Marandino F, Giannarelli D, Benevolo M, Buglioni S, Mottolese M. Chromogenic in situ Hybridization CISH a Novel Method to Determine Her2 Amplification in Histological Samples. *Ann Oncol* 2003; 14(4):81
 71. Lewin B. Genes VII. Marbán. España, 2001; 896-898.
 72. Luque J, Herráez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Harcourt 2001;163-173.
 73. Gonzales JM. Técnicas y Métodos de LABORATORIO CLÍNICO. MASSON 2ª edición 2004; 368.
 74. Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. Current Medical Diagnosis & Treatment 2003. Lange Medical Books/McGraw-Hill, 42a edición 2003; 677
 75. Wallach J. Interpretación Clínica de las Pruebas de Laboratorio. Masson4a edición 2003; 1185-1186.
 76. Fuentes X, Castiñeiras MJ, Ferré M. Códex del Laboratorio Clínico, Indicaciones e interpretación de los exámenes de laboratorio. ELSEVIER 2003;301-303
 77. Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. Current Medical Diagnosis & Treatment 2003. Lange Medical Books/McGraw-Hill, 42a edición 2003; 682
 78. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J. Recommendations for Her2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2000;53:890-2.
 79. Madrid MA. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):593-600
 80. López- Ullibarrí I, Pita-Fernández S. Medidas de concordancia: el índice Kappa. *Cad Aten Primaria* 1999; 6: 169-171.
 81. Landis J, Koch G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-174.
 82. 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;344:783-92.
 83. Murray S. Trastuzumab (Herceptin) and HER2-positive breast cancer. *CMAJ Canadian Medical Association Journal* 2006; 174(1):36-37
 84. Vos CB, Ter Haar NT, Peterse JL, Cornelisse CJ, van de Vijver MJ: Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 1999, 187:279-284
 85. Pegram MD, Slamon DJ. Combination therapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin Oncol* 1999;26:89-95.
 86. Mokbel K, Hassanally D. From HER2 to Herceptin. *Curr Med Res Opin* 2001;17(1):51-59.
 87. Bengala C, Zamagni C, Pedrazzoli P, Matteucci P, Ballestrero A, Da Prada G, Martino M, Rosti G, Danova M, Bregni M, Jovic G, Guarneri V, Maur M, Conte PF. Cardiac toxicity of trastuzumab in metastatic breast cancer patients previously treated with high dose chemotherapy a retrospective study. *Br J Cancer* 2006; 94(7): 1016-20
 88. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001; 19:2714-21.
 89. Ellis CM, Dyson MJ, Stephenson TJ, Maltby EL. HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation

- using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J. Clin. Pathol* 2005; 58: 710 - 714.
90. Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, Beuzeboc P, Mouret E, Zafrani B, Sastre-Garau X. Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (Her-2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13:1238-1243.
 91. Kakar S, Puangsuwan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov M. Her-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn* 2000;5:199-207.
 92. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, Dupuis B, Parker RL. Her-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2001; 14:1079-1086.
 93. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004;291:1972-7.
 94. Kounelis S, Kapranos N, Malamos N, Kouri-Bairaktari E. Evaluation of HER2 gene status in breast cancer by chromogenic in situ hybridization: comparison with immunohistochemistry. *Anticancer Res* 2005; 25(2A): 939-46
 95. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol* 2000;53:374-81.
 96. García-Caballero T, Menéndez MD, Vázquez-Boquete A, Gallego R, Forteza J, Fraga M. HER2 status determination in breast carcinomas A practical approach. *Histol Histopathol* 2006; 21(3): 227-36
 97. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C. 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: 354-63
 98. Willmore C, Holden J, Layfield L. Correlation of HER2 Gene Amplification with Immunohistochemistry in Breast Cancer as Determined by a Novel Monoplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2005; 13(4):333-341
 99. Menard S. Testing to define the target Her2neu. *Breast Cancer Research & Treatment* 2003; 81(1):63-66
 100. Kepple J, Henry-Tillman R, Klimberg VS, Layeeque R, Siegel E, Westbrook K, Korourian S. The receptor expression pattern in ductal carcinoma in situ predicts recurrence. *Am J Surg* 2006; 192(1)
 101. Esserman L.J., Lopez T., Montes R.E., et al. A vaccine to prevent the progression of Her-2/neu overexpressing tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46:24-27.
 102. Nelson MH, Dolder CR. Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. *Ann Pharmacother* 2006; 40(2): 261-9
 103. American Cancer Society: Statistics: ACS News Center—Selected Cancers: Breast. [Http://www.cancer](http://www.cancer).
 104. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, Untch M, Rusnak DW, Spehar G, Mullin RJ, Keith BR, Gilmer TM, Berger M, Podratz KC, Slamon DJ. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2 overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(3):1630-9