



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“ASOCIACIÓN ENTRE EL RESULTADO DE CISH (HIBRIDACIÓN IN-SITU  
CROMOGENICA) CON EL INMUNOFENOTIPO EN BASE A LA CLASIFICACIÓN  
MOLECULAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:**

**ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**PRESENTA**

**DR. VICENTE EMMANUEL SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**ASESOR DE TESIS:**

**DR. VICTOR ALBERTO OLGUIN CRUCES**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**SEPTIEMBRE**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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).

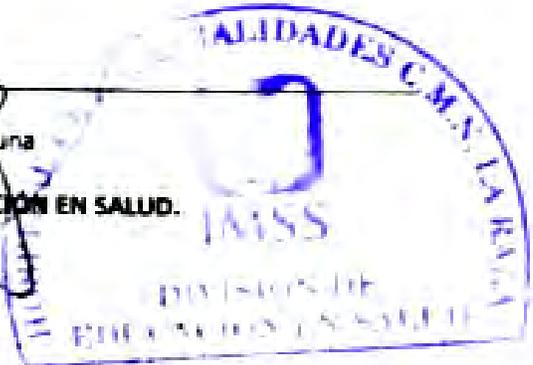
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



---

Dr. Jesús Arenas Osuna

JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD.



---

Dr. VICTOR MANUEL MONROY HERNANDEZ

TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACION EN ANATOMÍA PATOLÓGICA.



---

Dr. VICENTE EMMANUEL SÁNCHEZ SÁNCHEZ.

RESIDENTE DEL TERCER AÑO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.

No. Registro 2017-3606-14

# ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	6
Material y métodos	11
Resultados	12
Discusión	18
Conclusiones	21
Bibliografía	22

#### **4. RESUMEN.**

El gen HER2/neu se encuentra amplificado en alrededor del 20-30% de los cánceres de mama. Existe un gran número de métodos disponibles para la detección y medición de la expresión de HER2/neu.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, descriptivo y transversal para determinar la asociación entre el resultado de CISH (hibridación in-situ cromogénica) con el inmunofenotipo en base a la clasificación molecular en pacientes con cáncer de mama. Se utilizó estudio de chi cuadrada para ver la asociación que existe entre el reporte de CISH y el inmunofenotipo molecular.

**RESULTADOS:** Se analizaron 301 casos de carcinoma de mama en biopsias y piezas quirúrgicas. La edad media fue de 56.7 años. El 10 % (31 casos) de los carcinomas tuvieron tinción de inmunohistoquímica indeterminada para Her-2. 65.8 % (198 casos) fueron negativos y 23.9 % positivos. Posterior a la aplicación de la técnica de CISH a los Her2 indeterminados se pudo agrupar a los 31 tumores en los cuatro grupos moleculares de la siguiente forma: Luminal A 49.2%, Luminal B 29.9 %, HER2/neu 11.3 % y triple negativo 9.6 %.

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:** Es fundamental una determinación exacta y precisa de la amplificación del oncogén HER2, las evaluaciones con resultados falsos negativos negaran a las pacientes el acceso a un tratamiento específico que podría prolongar sus vidas.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer de mama, CISH, HER2/neu, inmunohistoquímica, clasificación molecular de mama, México.

## SUMMARY.

The HER2/neu gene is found to be amplified in about 20-30% of breast cancers. There are a large number of methods available for the detection and measurement of HER2/neu expression.

**MATERIAL AND METHOD:** An observational, retrospective, descriptive and cross-sectional study was conducted to determine the association between the result of CISH (chromogenic in-situ hybridization) and immunophenotype based on molecular classification in patients with breast cancer. A chi square study was used to see the association between the CISH report and the molecular immunophenotype.

**RESULTS:** A total of 301 cases of breast carcinoma were analyzed in biopsies and surgical specimens. The mean age was 56.7 years. 10% (31 cases) of the carcinomas had undetermined immunohistochemical staining for HER2/neu. A 65.8% (198 cases) were negative and 23.9% were positive. After the application of the CISH technique to indeterminate HER2, the 31 tumors in the four molecular groups could be grouped as follows: Luminal A 49.2%, Luminal B 29.9%, HER2 / neu 11.3%, and triple negative 9.6%.

**DISCUSSION AND CONCLUSION:** An accurate and accurate determination of Her-2 oncogene amplification is essential today, since evaluations with false negative results deny patients access to a specific treatment that could prolong their lives.

**KEY WORDS:** Breast cancer, CISH, HER2/neu, immunohistochemistry, molecular classification of breast, Mexico.

## INTRODUCCIÓN.

El gen HER2/neu (por sus siglas en inglés, human epidermal growth factor receptor 2, también conocido como erb-B2). Pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico constituido por cuatro miembros: HER1 (erb-B1), HER2 (erb-B2), HER3 (erb-B3) y HER4 (erb-B4). Se encuentra localizado en el cromosoma 17, en la posición 17q21, este proto-oncogén codifica para una glicoproteína transmembrana de 185 kDa, con actividad intrínseca tirosina quinasa (1).

El oncogén HER2 se encuentra amplificado en alrededor del 20-30% de los cánceres de mama, desempeñando un importante papel en su patogénesis y agresividad biológica. (2) Aquellas pacientes con amplificación del HER2-neu tienen tumores poco diferenciados con una mayor tasa de proliferación celular, adenopatías axilares positivas y una disminución en la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona con resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia y terapia hormonal, estas características confieren un incremento en el riesgo de recurrencia y muerte (3).

Actualmente el surgimiento del anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 específico dirigido contra el receptor HER2 (anti-HER2 o trastuzumab), el cual frena el crecimiento de estas células neoplásicas y por lo tanto el desarrollo tumoral, ha conllevado a un análisis en la amplificación de HER2 como requisito esencial para la selección de los pacientes de esta terapia blanco (4).

Por tal sentido el estado de HER2 forma parte del diagnóstico anatomopatológico rutinario del cáncer de mama pues permite establecer pronóstico, predecir la respuesta terapéutica, definir el tratamiento y evaluar el empleo de trastuzumab (5).

Existe un gran número de métodos disponibles para la detección y medición de la expresión de HER2/neu; unos se basan en la sobreexpresión de la proteína, con el uso de inmunohistoquímica, y otros evalúan la amplificación del gen con diferentes técnicas, como son: la FISH y CISH.

La inmunohistoquímica es una técnica semicuantitativa usada para la cuantificación de la expresión de proteínas; revela diferentes epítopes de la proteína presentes en la superficie celular de tejido fijado en formol e incluidos en parafina, y es la técnica más usada en laboratorios de patología para detectar y cuantificar la proteína HER2/neu en primera instancia. (6) Son muchas las variables que afectan el resultado de la inmunohistoquímica: fijación, almacenamiento de los tejidos, recuperación antigénica, tipo de anticuerpo, sistema de medición y variabilidad de interpretación entre los observadores. (7)

Para evitar el problema en algunas de las variables mencionadas, se ha estandarizado la técnica de inmunohistoquímica mediante la introducción de los kits: Pathway anti-HER2/neu (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona), In Site HER-2/neu (Biogenex, San Ramon, California) y Bond Oracle (Leica Biosystems, Wetzbr, Alemania), HercepTest (Dako-Agilent, Glostrup, Dinamarca), sistemas aprobados por la FDA. Siendo este ultimo el mas conocido y preciso en el mercado (8).

La interpretación de los resultados de inmunohistoquímica se basa en la valoración de la intensidad de la coloración de las membranas celulares y el porcentaje de células tumorales positivas. La Guía de Recomendaciones del Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad de Oncología Clínica (Wolf et al. 2013) lo define como sigue:

- 3+ (POSITIVO): Se tiñe de manera intensa la totalidad de la membrana celular en >10% de las células neoplásicas.
- 2+ (EQUÍVOCO): Tinción de membrana completa o incompleta y de intensidad débil o moderada en >10% de las células. También se clasifican como 2+ aquellos casos en que se observa positividad intensa y completa en 10% de las células. En estos casos se recomienda realización de técnicas de hibridación in situ (HIS) en la misma muestra o determinación mediante IHQ o HIS en una nueva muestra si se dispone de la misma.
- 1+ (NEGATIVO): Se tiñen las membranas de forma incompleta y apenas perceptible en >10% de las células neoplásicas.
- 0 (NEGATIVO): Cuando no se observa tinción de membrana o se tiñen las membranas de forma incompleta y apenas perceptible en 10% de las células neoplásicas.
- INDETERMINADO: Aquel caso que por razones técnicas no puede ser diagnosticado como positivo, negativo o equívoco (8).

Los algoritmos de decisión terapéutica acordados y utilizados hasta la actualidad, asumiendo un alto nivel de concordancia entre IHQ y FISH, recomiendan la utilización de IHQ como test primario, indicando FISH sólo en los casos de positividad intermedias, no concluyentes (2+). Los casos de alta positividad (3+) y los de positividad baja (1+) o nula se informan como positivos o negativos, respectivamente (9).

La hibridación in situ de fluorescencia (FISH) es un método molecular citogenético que permite cuantificar el número de copias de un gen, en este caso el HER2 mediante el empleo de sondas marcadas con fluorocromos. La técnica consiste en preparar cortas secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, las que son complementarias de las secuencias de DNA a estudiar. Estas sondas son marcadas con fluorocromos y posteriormente se hibridan o unen al DNA complementario, permitiendo así localizar las secuencias en las que se

encuentran. Se aplica sobre cortes de tejido o extensiones citológicas y se observa la fluorescencia al microscopio de epifluorescencia con filtros específicos (10). Existen tres kits disponibles: Oncor, PathVysion y Dako, estos dos últimos con marcaje centromérico; utilizan una sonda locus específica para el gen HER2 y una segunda sonda centromérica para el cromosoma 17, realizándose un cociente entre el número de copias de HER2 y el número de centrómeros del cromosoma 17 y, por lo tanto, detecta tanto la amplificación del gen HER2 como las aneusomías del cromosoma (11).

La FISH es considerada actualmente el estándar de oro para evaluar la amplificación del HER2/neu. Adicionalmente, la FISH tiene una sensibilidad y especificidad del 98% y 100%, respectivamente. (12) Sin embargo, la técnica de FISH requiere equipo (microscopio fluorescente con filtros especiales) y reactivos costosos, que no están disponibles en muchos laboratorios; consume más tiempo ya que requiere el desarrollo de un protocolo, la estandarización para los diferentes especímenes de tejido, y, además, tiene la necesidad de diseñar y combinar las sondas para las aplicaciones específicas, lo que se traduce en una labor intensa, por lo menos de dos días, adicional a que la técnica depende de la habilidad del patólogo para su interpretación. Por estas razones, no es práctico el uso de FISH para medir rutinariamente la expresión de HER2/neu en el laboratorio (13).

La hibridación cromogénica in situ (CISH, por sus siglas en inglés) es el método más recientemente descrito para la detección de la amplificación de HER2/neu. Este método combina características de las técnicas de FISH e inmunohistoquímica. La CISH, al igual que la FISH, permite cuantificar el número de copias de un gen, identificar translocaciones en los cromosomas y hacer conteos cromosómicos. La técnica CISH utiliza sondas de ADN marcadas con digoxigenina específicas para el locus del gen HER2 en el cromosoma 17q para hibridarla con los ácidos nucleicos complementarios presentes en la muestra de cáncer de mama. La sonda marcada con HER2 se elabora usando la Subtraction Probe Technology (SPT, Tecnología de sonda por sustracción), una técnica patentada y registrada, que crea sondas específicas, eliminando significativamente las secuencias repetitivas que se encuentran en los ácidos nucleicos humanos. La técnica CISH permite evaluar aberraciones genéticas bajo un microscopio de luz mediante detección cromogénica. Los resultados de tinción por CISH pueden verse claramente con un microscopio de luz estándar y una lente de 40X. El estado de amplificación del gen Her2 puede visualizarse en el contexto de la morfología del tejido circundante (14).

Los criterios de evaluación establecidos por Tanner y colaboradores (2000) son los siguientes:

1. NO AMPLIFICADO: 1-5 señales HER2/núcleo en 50% de las células tumorales.
2. BAJA AMPLIFICACIÓN: 6-10 señales/núcleo o pequeños agregados de señales en 50% de células tumorales
3. AMPLIFICADO: >10 señales/núcleo o agregados de señales en > 50% células tumorales (15).

En general, los resultados del CISH son coincidentes con FISH aunque existe una menor precisión en algunos casos que presentan una baja amplificación y polisomía del cromosoma 17. En un estudio comparativo de FISH y CISH podemos ver que los resultados mostraron una concordancia del 99% en 206 casos analizados (IC 95%: 96,5%–99,9%), indicando una notable concordancia entre el Kit para HER2 mediante CISH SPOT-Light y el análisis para HER2 de PathVysion (16).

La CISH es una buena alternativa para los casos que requieren preservación de las características morfológicas del tumor, por ejemplo, los casos con focos pequeños de tumor invasor, mezclas complejas de carcinoma in situ e invasor, entre otros. La técnica de CISH contempla otras ventajas adicionales: reactivos menos costosos, señales permanentes en las placas histológicas (permite crear un expediente permanente de la prueba) y el no necesitar un microscopio adicional con características específicas. Para aquellos laboratorios que no tienen la capacidad de realizar la FISH, pero realizan pruebas de inmunohistoquímica rutinariamente, la técnica de CISH puede ser una opción (17).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea compuesta de un número creciente de subtipos biológicos reconocidos. De cualquier manera, independientemente del modelo predictivo utilizado, persiste una sustancial variabilidad en la evolución de la enfermedad dentro de cada categoría. Generalmente se acepta que los cursos clínicos variados de pacientes con tumores histológicamente idénticos son el resultado de diferencias moleculares. Se deduce que el análisis molecular detallado del cáncer pudiera aportar información que mejoraría la predicción pronóstica (18, 19).

Perou et al. (20). y Sorlie et al. (21). fueron los primeros en mostrar que los carcinomas mamarios pueden también subdividirse en base al análisis de la expresión génica. Estos estudios determinaron que existían al menos cuatro clases moleculares de cáncer de mama: a) tipo luminal, b) tipo basal, c) tipo parecido a mama normal y d) HER2 positivo. El tipo parecido a mama normal fue descartado posteriormente de las clases moleculares, al comprobarse que representaban características de tejido normal de la mama y no de tejido tumoral (22).

La forma de realizar la clasificación molecular es mediante los métodos antes mencionados. Actualmente, desde el punto de vista inmunohistoquímico, se reconocen las clases moleculares: a) luminal A, b) luminal B, c) HER2 y d) Triple negativo (23). Actualmente los tipos moleculares de carcinoma de mama están definidos de la siguiente manera: a) luminal A: Positivo (+) receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP), HER2 negativo (-); b) luminal B: RE o RP +, independientemente del marcaje de HER2; c) HER2 +: RE -, RP -, HER2 + y d) triple negativo: RE -, RP -, HER2 - (24-26).

El pronóstico y sensibilidad a la quimioterapia de los subgrupos moleculares es diferente. El tipo luminal tiende a tener mejor pronóstico que los otros, mientras los tumores tipo basal y HER2 positivo son de peor pronóstico, debido a que están asociados con una mayor agresividad biológica. No obstante, estos últimos tienen una alta tasa de respuesta a la quimioterapia y resistencia a los agentes quimioterapéuticos convencionales, respectivamente (27). Por su parte, los tipos luminales A presentan una alta tasa de respuesta a la terapia endocrina, mientras que el luminal B la respuesta a esta es variable (27, 28).

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, descriptivo y transversal para determinar la asociación entre el resultado de CISH (hibridación in-situ cromogénica) con el inmunofenotipo en base a la clasificación molecular en pacientes con cáncer de mama diagnosticados en el servicio de patología, del hospital de Ginecología número 4 “Dr. Luís Castelazo Ayala”.

Se seleccionaron a todas las pacientes que contaban con reporte histopatológico y de Inmunohistoquímica de carcinoma invasor de mama así como los casos de inmunohistoquímica indeterminados para HER2/neu que contaban con CISH , durante el periodo del primero de enero del año 2012 al 31 de diciembre del año 2016.

Se recabaron los siguientes datos: nombre del paciente, número de afiliación, edad, número de estudio histopatológico, resultados de Inmunohistoquímica (RE, RP y HER2, CISH, así como la fecha de última regla, para posteriormente clasificarlos de acuerdo al inmunofenotipo como Luminal A, Luminal B, HER2 y Triple negativo.

Análisis estadístico: Estadística descriptiva, se realizó estudio de chi cuadrada para ver la asociación que existe entre el reporte de CISH y el inmunofenotipo molecular. Para la descripción de datos se empleó frecuencias y porcentajes, e intensidad.

## RESULTADOS.

Se analizaron 301 casos de carcinoma de mama en biopsias y piezas quirúrgicas entre el periodo del primero de enero del año 2012 al 31 de diciembre del año 2016, en el servicio de patología, del hospital de Ginecobstetricia número 4 "Dr. Luís Castelazo Ayala".

La edad media de las pacientes con carcinoma de mama al momento del diagnóstico fue de 56.7 años, con un rango de 28 a 79 años. Se hicieron nueve grupos de edad y el más frecuente fue de 56 a 60 años. Un 9 % tenía menos de 40 años y el 91 % tenía más de 40 años de edad (Tabla I).

**TABLA I. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DE LA EDAD AGRUPADA DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA DE MAMA.**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos <= 35	8	2,7	2,7	2,7
36 - 40	19	6,3	6,3	9,0
41 - 45	9	3,0	3,0	12,0
46 - 50	46	15,3	15,3	27,2
51 - 55	37	12,3	12,3	39,5
56 - 60	74	24,6	24,6	64,1
61 - 65	60	19,9	19,9	84,1
66 - 70	37	12,3	12,3	96,3
71+	11	3,7	3,7	100,0
<b>Total</b>	<b>301</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

En relación a las variantes histológicas de carcinoma de mama de nuestra población estudiada la mayoría fueron adenocarcinomas ductales de tipo no específico con un 81,4 % (254 casos). Los menos frecuentes pertenecieron a carcinomas de tipo específico como el metaplasico y el papilar con un 0.7 % (2 casos) cada uno (Tabla II).

**TABLA II. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DE LAS VARIANTES HISTOPATOLÓGICAS DE CARCINOMA DE MAMA.**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos ADENOCARCINOMA DUCTAL INVASIVO	245	81,4	81,4	81,4
ADENOCARCINOMA LOBULILLAR INVASIVO	30	10,0	10,0	91,4
ADENOCARCINOMA MUCINOSO	10	3,3	3,3	94,7
ADENOCARCINOMA TUBULAR	12	4,0	4,0	98,7
CARCINOMA METAPLASICO	2	,7	,7	99,3
CARCINOMA PAPILAR INVASIVO	2	,7	,7	100,0
<b>Total</b>	<b>301</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

El grado histológico (escala de Scarf Bloom Richardson) que predominó fue el grado 2 con un 45.8 % (138 casos). Y el de menor porcentaje 18.9 % (57 casos) fue el grado 3 o poco diferenciado (Tabla III).

**TABLA III. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DEL GRADO HISTOLÓGICO DE CARCINOMA DE MAMA.**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	106	35,2	35,2	35,2
2	138	45,8	45,8	81,1
3	57	18,9	18,9	100,0
Total	301	100,0	100,0	

El 75.1 % (226 casos) de los carcinomas de mama estudiados mostraron positividad a la expresión de inmunohistoquímica de receptores de estrógeno (Tabla IV).

**TABLA IV. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DE EXPRESIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO EN CARCINOMAS DE MAMA.**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos NEGATIVO	75	24,9	24,9	24,9
POSITIVO	226	75,1	75,1	100,0
Total	301	100,0	100,0	

El 61.5 % (185 casos) de los carcinomas de mama estudiados mostraron positividad a la expresión de inmunohistoquímica de receptores de progesterona (Tabla V).

**TABLA V. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DE EXPRESIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA EN CARCINOMAS DE MAMA.**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos NEGATIVO	116	38,5	38,5	38,5
POSITIVO	185	61,5	61,5	100,0
Total	301	100,0	100,0	

El 10 % (31 casos) de los carcinomas tuvieron tinción de inmunohistoquímica indeterminada para HER2. Un 65.8 % (198 casos) fueron negativos y 23.9 % fueron positivos (Tabla VI).

**TABLA VI. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DE EXPRESIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE HER-2 EN CARCINOMAS DE MAMA.**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje válido</b>	<b>Porcentaje acumulado</b>
<b>Válidos</b>	<b>I</b>	<b>31</b>	<b>10,3</b>	<b>10,3</b>	<b>10,3</b>
	<b>N</b>	<b>198</b>	<b>65,8</b>	<b>65,8</b>	<b>76,1</b>
	<b>P</b>	<b>72</b>	<b>23,9</b>	<b>23,9</b>	<b>100,0</b>
	<b>Total</b>	<b>301</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

Inicialmente con base a la expresión de RE, RP y HER2 se clasificaron solo un 89.7 % (270 casos) con las cuatro clases moleculares de mama; el luminal A fue el más frecuente (50.7 %, 137 de 270 casos), seguido del luminal B (26.6%, 80 de 270 casos), y el menos representativo fue el triple negativo (8.8 %, 24 de 270 casos). Hay que recordar que 31 casos no pudieron ser clasificados en dichos grupos moleculares debido a que tenían un resultado de inmunohistoquímica de 2+ (indeterminado) para la expresión de HER2.

Posterior a la aplicación de la técnica de CISH se pudo agrupar a los 31 tumores que inicialmente no fueron clasificados por que tenían un resultado indeterminado por inmunohistoquímica para la expresión de HER2. Los casos que no tuvieron HER2 amplificado fueron 22 y los que amplificaron para HER2 fueron 9 (Tabla VII).

**TABLA VII. FRECUENCIA DE AMPLIFICACIÓN CON TÉCNICA DE CISH EN CASOS DE CARCINOMAS DE MAMA INDETERMINADOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA EXPRESIÓN DE HER-2.**

	<b>Frecuencia</b>
<b>Válidos</b>	<b>270</b>
<b>AMPLIFICADO</b>	<b>9</b>
<b>NO AMPLIFICADO</b>	<b>22</b>
<b>Total</b>	<b>301</b>

De esta manera los 301 casos de carcinomas de mama se clasificaron en los cuatro grupos moleculares de la siguiente forma: Luminal A 49.2% (148 de 301 casos), Luminal B 29.9 % (90 de 301 casos), HER2/neu 11.3 % (34 de 301 casos) y triple negativo 9.6 % (29 de 301 casos). (Tabla IIX)

**TABLA IIX. FRECUENCIA, PORCENTAJE VALIDO Y PORCENTAJE ACUMULADO DE GRUPOS MOLECULARES DE CARCINOMAS DE MAMA.**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos HER2	34	11,3	11,3	11,3
LUMINAL A	148	49,2	49,2	60,5
LUMINAL B	90	29,9	29,9	90,4
TRIPLE NEGATIVO	29	9,6	9,6	100,0
Total	301	100,0	100,0	

La mayoría de los carcinomas ductales de tipo no específico fueron luminal A con 105 de 245 casos. Los menos frecuentes fueron los triples negativos con 22 de 245 casos. (Tabla IX).

**TABLA IX. ASOCIACIÓN ENTRE GRUPOS MOLECULARES Y VARIANTES HISTOLÓGICAS DE LOS CARCINOMAS DE MAMA.**

	TIPOHIST					TIPOHIST CARCINOM A PAPILAR INVASIVO	Total
	ADENOCARCI NOMA DUCTAL INVASIVO	ADENOCARCI NOMA LOBULILLAR INVASIVO	ADENOCARCI NOMA MUCINOSO	ADENOCARCI NOMA TUBULAR	CARCINOM A METAPLASIC O		
CLASMOL HER2	34	0	0	0	0	0	34
LUMINAL A	105	22	10	9	0	2	148
LUMINAL B	84	3	0	3	0	0	90
TRIPLE NEGATIVO	22	5	0	0	2	0	29
Total	245	30	10	12	2	2	301

	Valor	gl	Sig. asintótica ...
Chi-cuadrado de Pearson	52,981 <sup>a</sup>	15	,000
Razón de verosimilitudes	54,459	15	,000
<b>N de casos válidos</b>	<b>301</b>		

Con la asociación entre la clasificación molecular y los grados histológicos se observó que los carcinomas luminales A corresponden en su mayoría a un grado 1, los luminal B a un grado 2, los HER2 a un grado 3 y los triples negativos a un grado 3. Esta relación fue estadísticamente significativa ( $p < 0,000$ ) (Tabla X).

**TABLA X. ASOCIACIÓN ENTRE CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y GRADO HISTOLÓGICOS DE LOS CARCINOMAS DE MAMA.**

		GRADO			Total
		1	2	3	
CLASMOL	HER2	4	12	18	34
	LUMINAL A	71	68	9	148
	LUMINAL B	29	50	11	90
	TRIPLE NEGATIVO	2	8	19	29
<b>Total</b>		<b>106</b>	<b>138</b>	<b>57</b>	<b>301</b>

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica ...
Chi-cuadrado de Pearson	92,816 <sup>a</sup>	6	,000
Razón de verosimilitudes	82,642	6	,000
<b>N de casos válidos</b>	<b>301</b>		

La mayoría de los carcinomas de mama con expresión de inmunohistoquímica de HER/2 indeterminada perteneció al grupo molecular luminal A con 11 casos, seguido del luminal B con 10 casos. (Tabla XI).

**TABLA XI. ASOCIACIÓN ENTRE CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN INDETERMINADA DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE HER/2 EN LOS CARCINOMAS DE MAMA.**

		HER2			Total
		I	N	P	
CLASMOL	HER2	5	0	29	34
	LUMINAL A	11	137	0	148
	LUMINAL B	10	37	43	90
	TRIPLE NEGATIVO	5	24	0	29
<b>Total</b>		<b>31</b>	<b>198</b>	<b>72</b>	<b>301</b>

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica ...
Chi-cuadrado de Pearson	168,638 <sup>a</sup>	6	,000
Razón de verosimilitudes	206,133	6	,000
<b>N de casos válidos</b>	<b>301</b>		

La mayoría de los casos con expresión indeterminada de inmunohistoquímica para HER2 no amplificaron el gen con técnica de CISH (22 de 31 casos). (Tabla XI)

**TABLA XI. ASOCIACIÓN ENTRE CLASIFICACIÓN Y LOS CASOS QUE SE LES REALIZÓ TÉCNICA DE CISH A LOS CARCINOMAS DE MAMA.**

	CISH			Total
		AMPLIFICADO	NO AMPLIFICAD...	
CLASMOL HER2	29	5	0	34
LUMINAL A	137	0	11	148
LUMINAL B	80	4	6	90
TRIPLE NEGATIVO	24	0	5	29
<b>Total</b>	<b>270</b>	<b>9</b>	<b>22</b>	<b>301</b>

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica ...
Chi-cuadrado de Pearson	28,362 <sup>a</sup>	6	,000
Razón de verosimilitudes	27,323	6	,000
<b>N de casos válidos</b>	<b>301</b>		

## **DISCUSIÓN.**

Es muy importante hacer la medición de la amplificación del gen HER2/neu o de la expresión de la proteína como factor predictivo de terapia (hormonoterapia y quimioterapia), y de pronóstico de supervivencia (2,3). Proponemos La hibridación cromogénica in situ como un método implementado recientemente que cuenta con la habilidad de poder marcar el ADN a partir de la unión de sondas de hibridación in situ a secciones específicas del ácido nucleico complementario en la muestra, que son detectadas con reactivos similares a los usados en inmunohistoquímica. Los resultados de la hibridación pueden visualizarse dentro del contexto de la morfología circundante del tejido al utilizar un microscopio de luz. Por lo tanto, se observa la morfología del tejido y las aberraciones del gen simultáneamente (14).

El presente estudio reporta los diversos patrones de amplificación de Her2 obtenidos a través de la técnica de CISH, en los casos donde la IHQ no fue concluyente.

En nuestra población estudiada como fue de esperarse la mayoría fueron adenocarcinomas ductales de tipo no específico con un 81,4 % (254 de 301 casos). Esto coincide con lo reportado que va de 72 a 80 % en la literatura (19,20,21). El grado histológico (escala de Scarf Bloom Richardson) que predominó fue el grado 2 con un 45.8 % (138 casos). Y el de menor porcentaje 18.9 % (57 casos) fue el grado 3 o poco diferenciado.

La edad promedio de 56.7 años registrada en la población estudiada es consistente con lo encontrado en otros estudios. La paciente más joven encontrada fue de 28 años y la de edad más avanzada fue de 79 años. Tanto para la edad promedio como para el rango etéreo se reportan resultados similares: Shokouh (29) que llevó a cabo estudios con pacientes de 17 a 98 años, cuya edad media fue de 50 años, Crowe (30), quien trabajó con mujeres en edades con rango entre 22 a 75 años, y cuya media fue de 56 años.

En la literatura se reporta que aproximadamente el 7 % de carcinomas de mama de presentan antes de los 40 años (31), en este estudio se encontró un 9 % (27 de 301 casos) de pacientes menores de 40 años.

Los esteroides ováricos son necesarios para el buen desarrollo de la glándula mamaria. El estrógeno es un importante mitogeno que ejerce su actividad mediante la unión a receptores que se encuentran en 50-80% de las mamas con cáncer. La determinación de los RE tiene gran utilidad como marcador tumoral, ya que se ha descrito que los tumores mamarios positivos a este, presentan características de: ser bien diferenciados, con baja proliferación, tiempo prolongado de supervivencia libre de enfermedad y buena respuesta a terapia

dirigida a RE. Mientras que los tumores negativos a este son poco diferenciados, aneuploides, altamente proliferativos y baja respuesta a tratamientos anti-RE (32). El 75.1 % (226 casos) de los carcinomas de mama de nuestra serie mostraron positividad a receptores de estrógeno.

El receptor de progesterona es un marcador indirecto del funcionamiento de los receptores de estrógeno y es valioso para predecir el comportamiento del carcinoma de mama. Comúnmente se reportan a la par los RE y RP, en un resultado de inmunohistoquímica, los cuales tienen valor predictivo en respuesta a la terapia endocrina (32). En nuestra serie el 61.5 % (185 de 301 casos) de los carcinomas de mama mostraron positividad a receptores de progesterona.

En el 2008 Musgrove encontró que el 76.92% de pacientes entre 40-49 años de edad, fueron positivos a RE y RP (33). Fiorio entre los resultados en un estudio realizado también en el 2008, encontró que el 64% de los casos de cáncer de mama presentaron un perfil RE(+)/RP(+), de un total de 59 muestras de biopsias de cáncer de mama (34). Resultados ligeramente similares a los encontrados en el presente estudio.

El HER2/neu también conocido como C-erb2, es un proto-oncogen localizado en el cromosoma 17. Es amplificado y se sobreexpresa como proteína Her2-neu entre 15 a 25 % de los carcinomas invasores de mama y se asocia con mal pronóstico. Nosotros encontramos un 10 % de carcinomas invasivos que presentaron expresión indeterminada de inmunohistoquímica de Her-2, el 65.8 % fueron negativos y 23.9 % fueron positivos. Actualmente el grado histológico y la variante histológica no son suficientes para predecir pronóstico o más a un para dictar tratamiento, por lo que la subclasificación molecular en nuestros días es indispensable (32). Se recurrió a pruebas moleculares citogenéticas como es el CISH para poder clasificar los carcinomas invasivos indeterminados a HER2 por inmunohistoquímica. Los que no mostraron amplificación fueron 22 de 31 casos y 9 de 31 si amplificaron para el gen HER2/neu.

Con base en los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico de RE, RP y HER2, en el presente estudio se observó que el fenotipo predominante fue el luminal A, con el 49.2% (148 casos), el luminal B represento el 29.9% (90 casos), Her-2-neu fue de 11.3 % (34 casos) y los triples negativos con un 9.6 % (29 casos).

Como se ha comentado anteriormente la sobreexpresión de HER2 en las células tumora implica un pobre pronóstico, ocasionando entre otras cosas, por una mayor agresividad biológica de las células neoplásicas. Sin embargo, a diferencia del subtipo triple negativo. HER2 tiene agentes moleculares: el anticuerpo monoclonal

anti-HER2, trastuzumab. La efectividad de este en cáncer de mama metastásico y la marcada reducción en las recaídas en los tumores HER2 positivos al combinarlo con quimioterapia, lo ha llevado a ser considerado una herramienta terapéutica valiosa para tratar a las pacientes con esta clase molecular de cáncer de mama.

Hoy en día, es fundamental una determinación exacta y precisa de la amplificación del oncogén HER2, puesto que las evaluaciones con resultados falsos negativos negaran a las pacientes el acceso a un tratamiento específico que podría prolongar sus vidas, mientras que los resultados falsos positivos se ofrece el tratamiento a una paciente que probablemente no se beneficie de él.

Por su parte, el triple negativo es un subtipo de mal pronóstico, pero que se asocia a una alta tasa de respuesta a la quimioterapia en la etapa inicial del tratamiento, debido a que tienen un alto porcentaje de células en mitosis, que explican su buena respuesta inicial, sin embargo, recidivan y producen metástasis rápidamente, llevando a un pronóstico muy sombrío.

Finalmente, en este estudio se pudo implementar la técnica de la CISH para la clasificación molecular de muestras histológicas de pacientes con cáncer de mama.

## **CONCLUSIÓN.**

En nuestro estudio de 301 casos de carcinomas de mama se clasificaron en los cuatro grupos moleculares de la siguiente forma: Luminal A 49.2% (148 de 301 casos), Luminal B 29.9 % (90 de 301 casos), HER2/neu 11.3 % (34 de 301 casos) y triple negativo 9.6 % (29 de 301 casos).

El 10 % (31 casos) de los carcinomas tuvieron tinción de inmunohistoquímica indeterminada para HER2. Un 65.8 % (198 casos) fueron negativos y 23.9 % fueron positivos.

En la aplicación de la técnica de CISH se pudo agrupar a los 31 tumores que inicialmente no fueron clasificados por que tenían un resultado indeterminado por inmunohistoquímica para la expresión de HER2. Los casos que no tuvieron HER2 amplificado fueron 22 y los que amplificaron para HER2 fueron 9.

En el análisis bivariado se encontró significancia estadística entre el grupo molecular de cáncer de mama con grado histológico, variante histológica, expresión de HER2 y resultados de CISH.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- 1.- Hanna W, Gelmon K. Correlation of HER2 over expression with clinico pathological parameters in Tunisian breast Carcinoma. *Current Oncology* 2002; 9(Suppl.1): S2-S17  
Ross JS, et al. *Oncologist* 2003; 54: 307-25.
- 2.- Di Leo A, Dowsett M, Horten B, et al. Current status of HER2 testing. *Oncol* 2002;63(suppl.1):33–39.
- 3.- Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-1717.
- 4.- Chang HR. Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer* 2010; 116:2856-2867.
- 5.- Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:55-62
- 6.- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8(4):307-25.
- 7.- Yeh IT. Measuring HER-2 in breast cancer: IHC, FISH, or ELISA? *Am J Clin Pathol* 2002 Jun;117 Suppl 1: S26-S35.
- 8.- Wolff AC, Hammond ME. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31:3997-4013
- 9.- Wolff AC, Hammond ME. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(1):118-145.
- 10.- Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005; 36: 250-61.
- 11.- Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, Ramos L, Peng HJ, Seshadri R, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2 alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000; 18:3651-64.
- 12.- Press MF, Bernstein L, Thomas PA. Her-2/neu gene amplification characterized by florescence in situ hybridization.Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997 Aug;15(8):2894-904.

- 13.- Sińczak-Kuta A, Tomaszewska R, Rudnicka-Sosin L, et al. Evaluation of HER2/neu gene amplification in patients with invasive breast carcinoma. Comparison of in situ hybridization methods. *Pol J Pathol* 2007;58(1):41-50.
- 14.- Elbauomy Elsheikh S, Green AR, Lambros MB, et al. FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R23.
- 15.- Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic 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; 157:1467-72.
- 16.- Rueschoff J. HER2 status assessment by chromogenic in situ hybridization (CISH) demonstrates high sensitivity for predicting response to Herceptin. 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2004.
- 17.- Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2 gene amplification in breast cancer with emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization? *Am J Clin Pathol* 2005 Feb;123(2):237-43.
- 18.- Carey LA, Dess EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2329-2334.
- 19.- Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans W. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11: 868-877.
- 20.- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000: 406:747-752.
- 21.- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
- 22.- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8418-8423.
- 23.- Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2011; 16: 61-70.
- 24.- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-5374.

- 25.- Livasy C, Karaca G, Nanda R, Tretiakova M, Olopade O, Moore D, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 264-271.
- 26.- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtype, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295: 2492-2502.
- 27.- Uribe j, Hernández C, Menolascino F, Rodríguez J, Istúriz L, Marquez M. Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Rev Venez Oncol* 2010; 22: 109-116.
- 28.- Wright SE. Immunotherapy of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 479-490.
- 29.- Shokouh TZ , Ezatollah A , Barand P. Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes : Retrospective Observational Analytical Study. *Medicine*. 2015.
- 30.- Crowe JP, Gordon NH, Shenk RR, Zollinger RM, Brumberg DJ, Shuck JM. Age Does Not Predict Breast Cancer Outcome. *Arch Surg*. 1994; 129: p. 483-488. Disponible en <http://archsurg.jamanetwork.com>.
- 31.- Carey K, Anders, Rebeca Johnson, Jennifer Litton, Marianne Phillips, Achie Bleyer. Breast Cancer Before Age 40 Years. *Semin Oncol*. 2009 Jun; 36(3): 237–249.
- 32.- J. G. Santillán-Benítez<sup>a,b</sup>, Á. Quiroz-Ordóñez<sup>b</sup>, H. Mendieta-Zerón<sup>a</sup>, L. M. GómezOliván<sup>b</sup>. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas. *revista de Medicina e investigación* 2013;1(1):17-24
33. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *nature reviews Cancer* 2008;9(9):631-643.
34. Fiorio e, Mercanti A, Terrasi M, et al. Leptin/Her2 crosstalk in breast cancer: in vitro study and preliminary in vivo analysis. *BMC Cancer*. 2008;8:305.