

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA



HOSPITAL GENERAL “DR. MIGUEL SILVA”

“EVALUACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER-2/NEU  
DETECTADA POR HIBRIDACIÓN IN SITU POR FLUORESCENCIA (FISH)  
EN CARCINOMA DE MAMA CON RESULTADO 2+ INDETERMINADO HER-  
2/NEU POR INMUNOHISTOQUÍMICA”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:  
ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:  
DR. DIEGO TORRES VÁSQUEZ

ASESORES DE TESIS:  
DR. JESÚS ÁNGEL VILLAGRÁN URIBE  
DRA. JAZMÍN ALEJANDRA RAMÍREZ MUÑOZ  
DRA. CONNE LIZBETH GONZÁLEZ GARCÍA  
DRA. LINDSAY ZARAHÍ PLATA LÓPEZ

MORELIA, MICHOACÁN; A 06 DE JULIO 2020.



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.

AUTORIZACIONES DE TESIS

---

DR. RAÚL LEAL CANTÚ  
DIRECTOR DEL HOSPITAL “DR MIGUEL SILVA”

---

DR. CARLOS ARTURO AREÁN MARTÍNEZ  
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

---

DR. JESÚS ÁNGEL VILLAGRÁN URIBE  
PROFESOR TITULAR DE CURSO DE ESPECIALIDAD  
ASESOR DE TESIS

---

DRA. JAZMÍN ALEJANDRA RAMÍREZ MUÑOZ  
ASESOR DE TESIS

---

DR. CONNE LIZBETH GONZÁLEZ GARCÍA  
ASESOR DE TESIS

---

DRA. LINDSAY ZARAHÍ PLATA GÓMEZ  
ASESOR DE TESIS

---

DR. DIEGO TORRES VÁSQUEZ  
SUSTENTANTE

## AGRADECIMIENTOS

A **María Guadalupe Maciel García**. Por llenar mi vida de alegría, luz y determinación.

A mis Adelas, Magallón González y Torres Vázquez. A Enrique y Maribel Vázquez Magallón. Su incondicionalidad es mi tesoro más preciado.

A mis maestros, Jesús Ángel Villagrán Uribe, Ma. Leilanie Arias González, Jazmín Alejandra Ramírez Muñoz. Lo único más grande que las enseñanzas que me dejaron, es la paciencia que me tuvieron.

A mis amigos, Dorian Godoy Dircio, Alexis Estrada Villalobos y Francisco Lagunas Rangel. Sus vidas son como un faro.

A Job Abraham Aguirre Urbano. La música, el café y el estudio son la mejor combinación en un laboratorio.

A Patricia Rangel González y Mónica Méndez Villa. Por recordarme que la disciplina es una virtud.

## CONTENIDO

1.	RESUMEN .....	5
2.	INTRODUCCIÓN .....	8
3.	MARCO TEÓRICO .....	10
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	31
5.	JUSTIFICACIÓN .....	32
6.	OBJETIVOS .....	35
7.	HIPÓTESIS .....	36
8.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	37
	POBLACIÓN DEL ESTUDIO .....	37
	DISEÑO DEL ESTUDIO .....	37
	CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	38
	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	38
	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	38
	VARIABLES DEL ESTUDIO .....	39
9.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	42
10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	45
11.	RESULTADOS .....	46
12.	DISCUSIÓN .....	57
13.	CONCLUSIONES .....	63
14.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
15.	ANEXOS .....	70

## RESUMEN DEL PROYECTO

Introducción: El cáncer de mama es un problema de salud global. En México constituye la primera causa de morbilidad y mortalidad relacionada con neoplasias malignas en mujeres en edad reproductiva. Uno de los grandes hitos de la medicina de precisión en el cáncer de mama es la identificación de marcadores moleculares que fungen como indicadores pronósticos y terapéuticos. Dentro de estos marcadores moleculares, uno de los más importantes es la proteína HER2/neu. El método más utilizado en los laboratorios de patología para la detección de sobreexpresión de esta proteína es la inmunohistoquímica. En este método, se obtienen cortes histológicos que se someten a una reacción inmunoenzimática con cromógeno. Se evalúa la afinidad tintorial y el porcentaje de células neoplásicas teñidas para categorizar las muestras en 4 grupos: 0(negativo para sobreexpresión de HER2/neu), 1+ (negativo para sobreexpresión de HER2/neu), 2+ (indeterminado para sobreexpresión de HER2/neu) y 3+ (positivo para sobreexpresión de HER2/neu). Esta evaluación es dependiente de observador. Los casos categorizados como 2+ indeterminado por inmunohistoquímica requieren una evaluación subsecuente con la prueba de biología molecular hibridación in situ con fluorescencia, más sensible, específica, costosa y tardada que la primera. Un parámetro de calidad aceptado como control de calidad es la confirmación de sobreexpresión de HER2/neu en 50+-15% por método FISH en casos categorizados como 2+ indeterminado por método de inmunohistoquímica. Objetivo general: Evaluar la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica. Material y Métodos: Se realizó un estudio retrospectivo, descriptivo, observacional y analítico. Se seleccionaron los casos diagnosticados como carcinoma de mama con evaluación 2+

indeterminado para sobreexpresión de la proteína HER2/neu por método de inmunohistoquímica con prueba subsecuente de Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) para detección de sobreexpresión de la proteína HER2/neu del archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”, en un período comprendido del 2017 al 2019. Se obtuvieron los datos pertinentes a estadio TNM clínico según el informe de la solicitud de estudio; Del reporte de patología, se obtuvieron los datos pertinentes a el tamaño del tumor, el tipo histológico, grado histológico de Nottingham, presencia de invasión linfovascular y carcinoma in situ; estado de los receptores de estrógenos y progesterona, y de la proteína Ki-67. Resultados: Se obtuvieron 35 casos, de los cuales se eliminó 1 caso por criterio de eliminación. De los 34 casos seleccionados, 16 (47%) tuvieron sobreexpresión de HER2/neu positiva por método FISH. Los 34 casos (100%) fueron de sexo femenino, con una edad media de  $44.82 \pm 8$  años. Respecto al estadio TNM clínico, 8 (23.5%) casos correspondieron a estadio IA, 19 casos (55.9%) estadio IIA y 7 casos (20.6%) estadio IIB. La media del tamaño de tumor fue  $3 \pm 0.9$  cm. Los 34 casos (100%) correspondieron al tipo histológico carcinoma invasor de tipo no especial. Respecto al grado histológico 13 casos (38.23%) fueron grado 1; 15 casos (44.11%) grado 2 y 6 casos (17.64%) grado 3. En 24 casos (64.7%) se demostró la presencia de carcinoma ductal in situ, y en 12 casos (35.3%) se demostró la presencia de invasión linfovascular. Respecto a la evaluación de sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ, 19 casos (56%) tuvieron una afinidad tintorial débil y 15 casos (44%) una afinidad tintorial moderada; la media de porcentaje de células teñidas fue de  $23 \pm 10$  %, con un rango de 10 a 50%. Respecto a la evaluación de expresión de receptores de estrógenos y progesterona por método de IHQ, 26 casos (76%) fueron positivos para receptores de estrógenos y 21 casos (61%) para receptores de progesterona. En la evaluación de expresión de proteína Ki-67 por método de IHQ, los 34 casos (100%) fueron positivos, con una media porcentaje de células teñidas de  $17.06 \pm 10.08$ % y un rango de entre 5 al 50%. Conclusión:

Existe una sobreexpresión positiva del 47% de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica en los casos analizados en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”, lo que ubica el rendimiento dentro de los estándares de calidad para uso juicioso de recursos de  $50 \pm 15$  %.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es uno de los problemas de salud más trascendentales a nivel global. Las técnicas de biología molecular para identificar proteínas expresadas por las células cancerígenas han marcado un hito en el tratamiento y pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. La proteína más estudiada, objeto de terapia blanco en los esquemas terapéuticos adyuvantes cuando se sobreexpresa, es HER2/neu. Se dispone de una amplia gama de técnicas moleculares para identificar la sobreexpresión de HER2/neu en células cancerígenas. Sin embargo, por su costo y accesibilidad, los consensos de expertos recomiendan la identificación por dos técnicas moleculares escalonadas: Inmunohistoquímica (IHQ) e Hibridación in situ con fluorescencia, respectivamente.

La inmunohistoquímica es el método de biología molecular de evaluación inicial para identificar sobreexpresión de HER2/neu. Se basa en el principio molecular de unión de un anticuerpo específico contra un antígeno específico. El complejo anticuerpo-antígeno activa por medio de una enzima un compuesto cromogénico capaz de visualizarse en microscopía convencional de luz. La interpretación de sobreexpresión de la proteína HER2/neu depende de características cualitativas y cuantitativas en la afinidad tintorial de la reacción, y por tanto, es dependiente del observador. El resultado se reporta en 4 categorías: 0(negativo para sobreexpresión de HER2/neu), 1+ (negativo para sobreexpresión de HER2/neu), 2+ (indeterminado para sobreexpresión de HER2/neu) y 3+ (positivo para sobreexpresión de HER2/neu); en el que las categorías 0 y 1+ no tienen sobreexpresión de proteína HER2/neu, y 3+ tiene sobreexpresión para HER2/neu. Los casos catalogados en método de IHQ como 2+ indeterminado requieren una evaluación subsecuente por el método FISH, considerado el estándar de oro por su alta sensibilidad y especificidad, para descartar o confirmar la sobreexpresión de HER2/neu. El método FISH se basa en el principio molecular de la unión de una sonda de ácidos nucleicos

unidos a un compuesto fluorescente que se une al gen encargado de codificar la proteína en cuestión. Requiere una infraestructura superior, mayor tiempo y capacidad técnica de interpretación. Es por eso que se toma como indicador de calidad una confirmación de sobreexpresión de Her2/neu 50+-15% por método FISH de los casos catalogados como 2+ indeterminado en método de IHQ.

## MARCO TEÓRICO

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad relacionada con neoplasias malignas en mujeres a nivel mundial (1-3). De acuerdo a GLOBOCAN, en el año 2018 en el mundo se reportaron 2,093,876 nuevos casos de cáncer de mama con 1,761,007 defunciones (1). De acuerdo a las estadísticas más actuales en México emitidas por la Secretaría de Salud, ese mismo año se reportaron 13,584 nuevos casos (2), con 6552 defunciones confirmadas en el 2015 (3), lo que posiciona a esta entidad como la principal causa de muerte relacionada a cáncer en mujeres en el país (1-4).

La identificación de la sobreexpresión de la proteína HER2/neu ha tomado crucial importancia como marcador pronóstico independiente y como blanco terapéutico en el cáncer de mama (6-9). Las guías nacionales e internacionales de tratamiento de cáncer de mama recomiendan la detección de la sobreexpresión de HER2/neu con finalidad terapéutica para elección de medicamentos adyuvantes como el trastuzumab y lapatinib (10,11). Dichos fármacos tienen un perfil de bioseguridad estrecho, relacionado con efectos adversos cardiovasculares, lo que vuelve importante ceñir criterios de elegibilidad para su uso (10). En la práctica, la detección de la sobreexpresión de Her-2/neu en cáncer de mama se realiza con métodos de inmunohistoquímica (IHQ) y de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) (10-12).

El método por inmunohistoquímica es el más difundido por su bajo costo, disponibilidad y menor complejidad técnica (10). Se realiza en tejido mamario fijado en formalina y embebido en parafina, en el cual por un proceso inmunológico-enzimático, el patólogo demuestra la amplificación de

HER2/neu (10,11). La sobreexpresión de HER2/neu se evalúa de acuerdo a parámetros morfológicos cualitativos (afinidad tintorial de la membrana) y cuantitativos (cantidad de células con afinidad tintorial de la membrana); y se emite en un resultado de 4 categorías: 0 (negativo para sobreexpresión), 1+ (negativo para sobreexpresión), 2+ (indeterminado para sobreexpresión), 3+ (positivo para sobreexpresión) (10,11). Los resultados 2+ (indeterminado) por IHC, requieren la confirmación de sobreexpresión de Her-2/neu por método de FISH; más sensible y específico (10-14). Sin embargo, la realización de FISH es mucho más costosa, compleja y demorada respecto a la IHC (10). Puesto que la evaluación de amplificación de Her-2/neu por IHC es dependiente del observador, hay una tendencia a sobre categorizar las muestras como 2+ indeterminado, con el consecuente aumento de costo y tiempo inherente a la prueba de FISH confirmatoria (14). Un punto de correlación de 50% +/- 15% entre los resultados 2+ indeterminado por IHC y confirmación de amplificación de Her-2/neu en FISH es aceptado como control de calidad en los centros que realizan dichas pruebas (10,14).

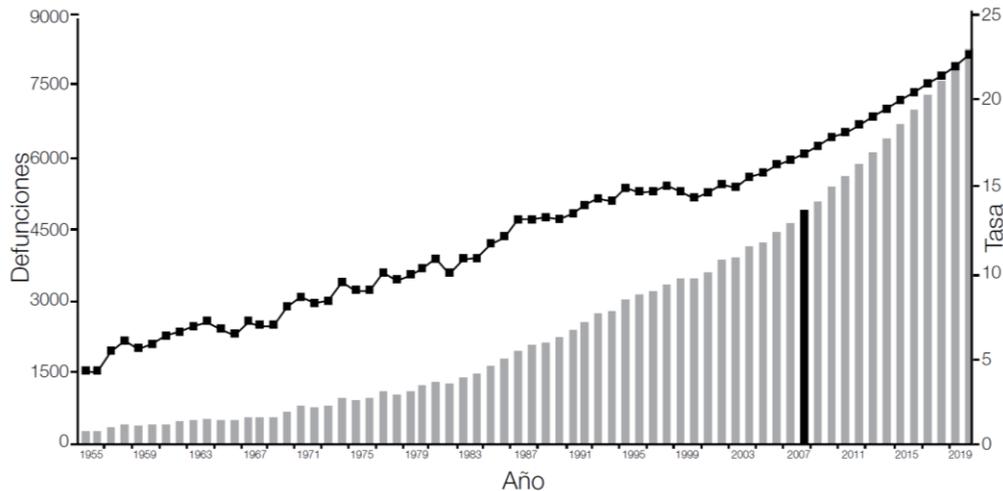
En el departamento de Patología del Hospital General de Morelia no existe estadística de la correlación entre los resultados categorizados como 2+ indeterminado para sobreexpresión de Her-2/neu por método de IHC y la confirmación por FISH. Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cuál es la tasa de sobreexpresión de la proteína HER2/neu detectada por método FISH en casos de cáncer de mama categorizados como 2+ indeterminado de HER2/neu por método de IHQ?

## EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA EN MÉXICO

De acuerdo con Departamento de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México el cáncer de mama ha tenido un incremento constante en incidencia y mortalidad en las últimas tres décadas en nuestro país (2). La incidencia del cáncer de mama en el año 2000 fue de 10.76 casos por cada

100,000 mujeres mayores de 25 años; en 2013 de 26.1 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años y en 2018 32.4 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años (2-4). De acuerdo al INEGI, la tasa de mortalidad en el año 2018 fue de 18 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años, con 6252 defunciones reportadas ese año (3). La edad media de diagnóstico es de 54.9 años, con una incidencia más alta en el grupo de 50 a 59 años con el 45% de todos los casos (2,4). La incidencia y mortalidad en los estados del país tienen importante relación con el índice de marginación en localización geográfica, más predominante en los estados del suroeste respecto a los del centro y norte (4). En 2016 las entidades con mayor mortalidad por cáncer de mama son Sonora, Nuevo León y Chihuahua, con 28.6, 26 y 25.7 defunciones anuales por cada 100,000 habitantes mayores de 25 años, respectivamente (2). Michoacán se encuentra en el lugar 17, con 16 defunciones anuales por cada 100,000 habitantes mayores de 25 años (2). (FIGURA 1)

**Figura 1. Tendencia de la mortalidad y números de casos por cáncer de mama en México, 1955-2007 y proyección 2008-2020.**



\*Tasa cruda por 100,000 mujeres de 25 años y más.

Fuente: Bases de Datos OMS, INEGI, SSA. 1955-2007.

## CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

La clasificación molecular del cáncer de mama es uno de los más grandes avances de las últimas décadas en el entendimiento de la medicina de precisión de dicha patología (5). Históricamente, el cáncer de mama ha sido clasificado en base a características clínico-patológicas, principalmente estadio tumoral y grado histológico (5). Con el transcurso del tiempo, el conocimiento acumulado de la biología del cáncer de mama lo ha posicionado como una enfermedad heterogénea en comportamiento tumoral y respuesta a tratamiento en base a características moleculares subyacentes (5). Los primeros indicadores moleculares identificados de mayor relevancia terapéutica y pronóstica son la expresión de receptores de estrógeno, receptores de progesterona, y el receptor de crecimiento epidérmico 2 HER2/neu (5,6). Recientemente, los datos moleculares obtenidos del perfil de expresión genética, proteómica, alteraciones en el número de copias de DNA y cambios cromosómicos, estado mutacional, metilación y microRNAs han expandido el conocimiento de la biología del cáncer de mama, y clasificaciones pronósticas con nuevos marcadores (5,11). La introducción de la Secuenciación de Siguiete Generación o Secuenciación Masiva Paralela parece abrir nuevas perspectivas para desentrañar la complejidad molecular del cáncer de mama, refinar la clasificación molecular e identificar nuevos agentes terapéuticos (12). Estas técnicas moleculares prometen mejorar el diagnóstico, la predicción del comportamiento clínico y la consecuente selección de terapias individualizadas (7). Sin embargo, su utilidad clínica y disponibilidad está lejos de alcanzar validación universal (10-11). De entre estos marcadores, el HER2/neu fue el primero en ser identificado para ser con un predictor de respuesta a terapia sistémica al anticuerpo monoclonal trastuzumab y actualmente define la taxonomía molecular y pronóstica del cáncer de mama (4-15).

La clasificación molecular del cáncer de mama se basa en la expresión de biomarcadores detectada por una amplia diversidad de técnicas, conceptos y aplicaciones. De acuerdo a la expresión de marcadores individuales, el cáncer de mama puede ser clasificado en Receptores de Estrógenos (RE) positivos, Receptores de estrógenos negativos, y HER2/neu positivos y HER2/neu negativos; adicionalmente se pueden agregar otros marcadores en combinación, como Receptores de progesterona (RP) y proteína KI-67, para proveer información pronóstica (5,10,11). Aunque existen clasificaciones moleculares más complejas, la taxonomía molecular del cáncer de mama propuesta por Perou es la más difundida, reproducible y validada por sus implicaciones clínicas (5). Publicada en el año 2000, dicha clasificación agrupa a los cánceres de mama en RE positivos denominados “luminales” y RE negativos; estos últimos subdivididos en HER2/neu positivos, “basaloides” caracterizados por ER y HER2/neu negativos con expresión de células basales, y “triples negativos” (5) (FIGURA 2).

Subtipo de acuerdo al Consenso de Colima 2015	Aproximación por inmunohistoquímica
<b>Luminal A</b>	RE +, RP > 20%, Ki67 < 20% GH* 1 o 2, y HER-2 -
<b>Luminal B</b>	RE +, RP < 20%, Ki67 > 20% GH* 3 y HER-2 + o -
<b>HER-2</b>	HER-2 +, RE y RP -
<b>Triple negativo</b>	RE -, RP - y HER-2 -

\*GH grado histológico

**FIGURA 2.** SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA Y SU APROXIMACIÓN POR IHQ.

Tomado de . Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. 8va ed.

Colima: Elsevier; 2019

## ASPECTOS MOLECULARES

HER 2/neu es una glicoproteína de 185-kDa codificada en un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17 que se expresa normalmente en el epitelio de varios órganos, tales como el pulmón, la vejiga, el páncreas, la mama y la próstata (15,16). Pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa de ErbB, una subclase de receptores de crecimiento ubicados en la superficie celular con ligandos de receptores de tirosina quinasa. Los receptores de tirosina quinasa tienen un papel crucial en las vías de señalización que gobiernan aspectos claves del metabolismo celular, tales como la proliferación, migración, diferenciación y señalización que regula la comunicación celular durante el desarrollo (17-18). Las mutaciones o alteraciones estructurales de estas proteínas ocasionan la activación anormal de los receptores tirosina quinasa, lo que las convierte en potentes oncoproteínas involucradas en el desarrollo de diversos cánceres y en su resistencia a terapias blanco (19) (FIGURA 3).

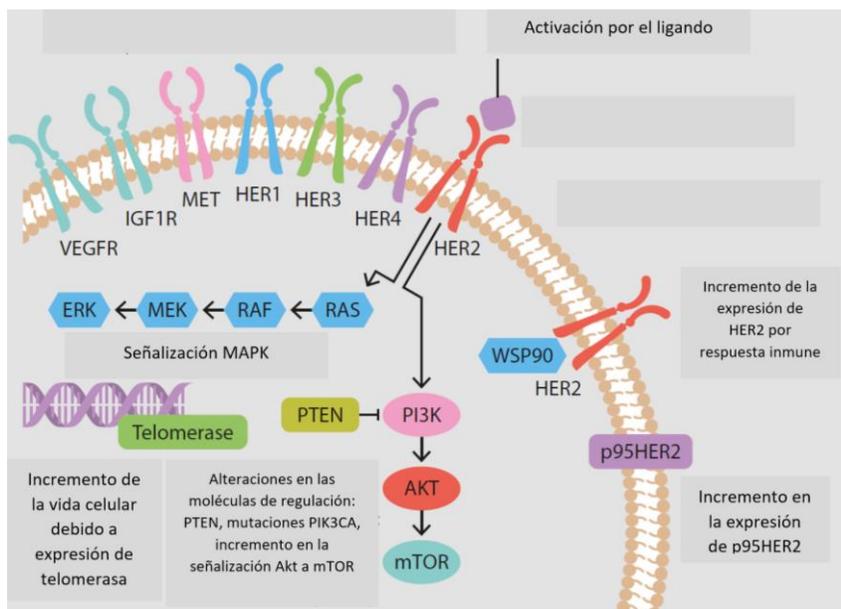


FIGURA 3. MECANISMO PROPUESTO DE ACCIÓN DE HER2/neu. Adaptado de Conformation of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *J Protein Chem.* 1994;13:227 231

Se han identificado por lo menos cuatro miembros de la familia de receptores de crecimiento a la que pertenece esta proteína, los cuales incluyen el EGFR o HER-1, HER-3 (erb-B3) y HER-4 (erb-B4 (17). Estos receptores están caracterizados por tener una estructura molecular similar, compuesta por un dominio extracelular de ligando-ligado, una región transmembrana hidrofóbica y una porción intracelular tirosina quinasa (18). Esta última porción compromete una cola C-terminal que incluye una posición ligadora de trifosfato de adenosina para el receptor de autofosforilación y fosforilación de sus respectivos sustratos (16-18). Los ligandos para HER3 y HER 4 son las neuregulinas NRG1-4, y el factor de crecimiento epidérmico para el ERGE (21). No se conoce ligando específico para HER2/NEU (18). A diferencia de otros miembros de la familia ErbB, HER2/neu está presente y activo de forma constitutiva y puede dimerizarse independientemente de la presencia de ligando (18). Usualmente se encuentra dimerizada junto con otras proteínas ErbB, habitualmente otra proteína HER2/neu. Los heterodímeros de HER2/neu son más potentes como señalizadores de transducción que los homodímeros. En particular, la combinación de HER2/neu-HER3 es muy potente en la activación de vías de proliferación y supervivencia, puesto que la cola citoplasmática de HER contiene sitios de unión de las fosfatidilinositida-3-quinasa PI3K, las cuales activan la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR; mientras que los heterodímeros de HER2/neu activan fuertemente la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos MAPK. La subsecuente disregulación de PI3K y MAPK aumenta fuertemente la proliferación celular y promueve la evasión de la apoptosis (20) FIGURA 4.

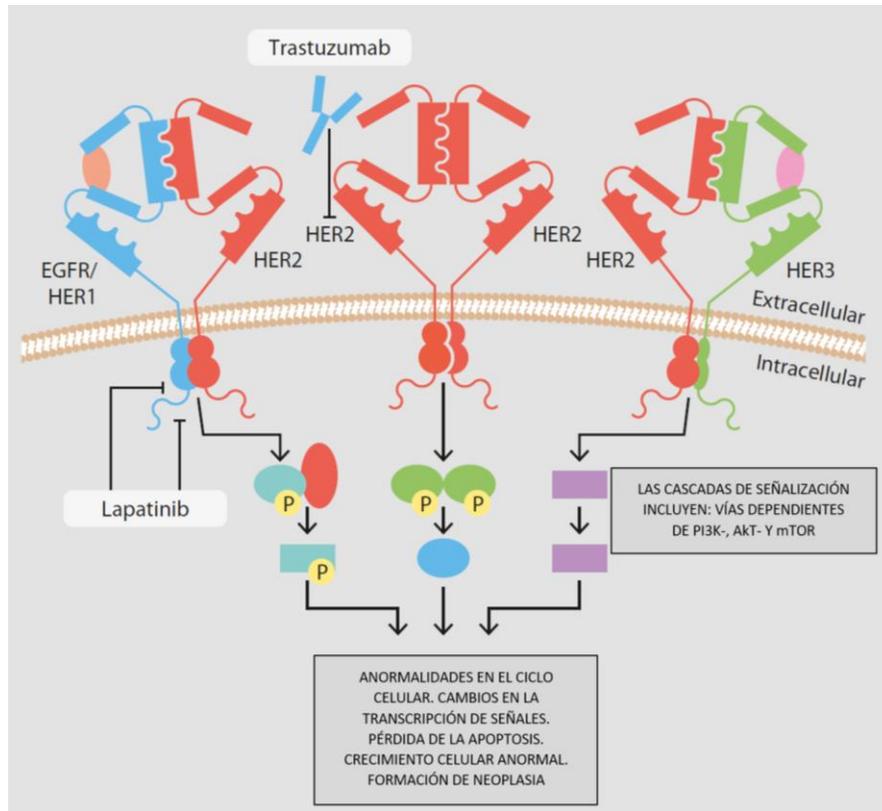


FIGURA 4. SITIOS DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS TRASTUZUMAB Y LAPATINIB E INTERACCIÓN EN LA REGULACIÓN DE SEÑALES DE CRECIMIENTO CELULAR ENTRE LOS DIFERENTE DÍMEROS DE HER1, HER2 Y HER3. Adaptado de HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signalling, tumor biology and cancer therapy.

*Clin Cancer Res.* 2013

De allí que la sobreexpresión de Her-2/neu que ocurre en los cánceres de mama Her-2/neu positivos tienen una dimerización excesiva de las proteínas ErbB, con el consecuente aumento de proliferación celular, el pobre resultado clínico y la resistencia a distintas terapias oncológicas (20).

## DETECCIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HER2/neu EN LOS LABORATORIOS DE PATOLOGÍA

En la práctica de rutina, las guías nacionales e internacionales recomiendan dos métodos de detección de sobreexpresión de la proteína HER2/neu: el método de Inmunohistoquímica (IHQ) y el método por Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (10,11). El primero es el preferido por su simplicidad técnica y bajos costes, en comparación con el método FISH más sensible y específico, pero más complicado técnicamente y con un costo más elevado (10,11 21).

El método por IHQ está basado en una reacción inmunoenzimática con cromógeno, en el que un anticuerpo primario dirigido contra un antígeno tisular específico crea un complejo antígeno anticuerpo al que se une un anticuerpo secundario, que a su vez forma otro complejo antígeno anticuerpo y activa una enzima cromogénica; una vez activada la enzima, el cromógeno ocasiona una respuesta tintorial evaluada susceptible a ser evaluada con microscopía de luz convencional (21,22) FIGURA 5.

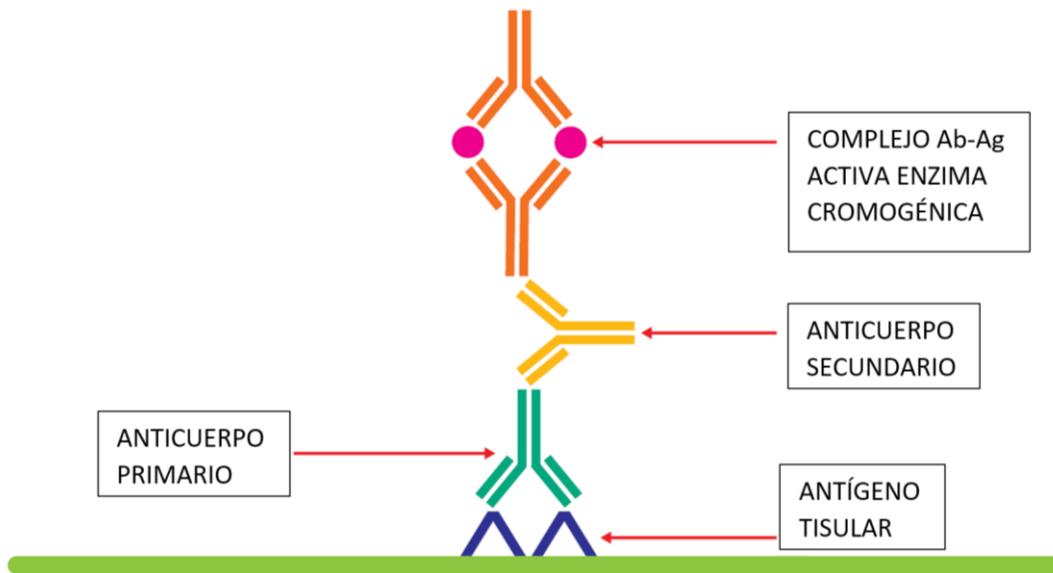


FIGURA 5. ESQUEMA DE ACTIVACIÓN DE ENZIMA CROMOGÉNICA EN EL MÉTODO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

Los requerimientos necesarios para realizar este método son: tejido fijado con formalina neutra y embebido en parafina, un kit comercial de IHQ, y un microscopio de luz convencional, disponibles en la mayoría de los laboratorios de patología quirúrgica (10,22). En el caso de la detección de sobreexpresión HER2/neu por IHQ, el patólogo evalúa la afinidad tintorial de acuerdo a un parámetro cualitativo: tinción de membrana citoplasmática de las células neoplásicas completa o incompleta; y a otro parámetro cuantitativo: porcentaje de células neoplásicas que muestran afinidad tintorial completa (8,11,12). En base a la combinación de los parámetros mencionados, el patólogo categoriza la expresión de la proteína HER2/neu en: Categoría 0 (NEGATIVO a sobreexpresión de HER2/neu) sin tinción ó tinción de membrana incompleta “apenas perceptible” en <10% de las células neoplásicas; Categoría 1+ (NEGATIVO para sobreexpresión de HER2/neu) tinción “apenas perceptible” en > 10 % de las células neoplásicas; Categoría 2+ (INDETERMINADO para sobreexpresión de HER2/neu): tinción completa “débil a moderada” de membrana en > 10 % de las células; y Categoría 3+ (POSITIVO para sobreexpresión de HER2/neu): Tinción “intensa” completa, circunferencial, en > 10 % de las células neoplásicas (10,11) como se ejemplifica en la FIGURA 6.

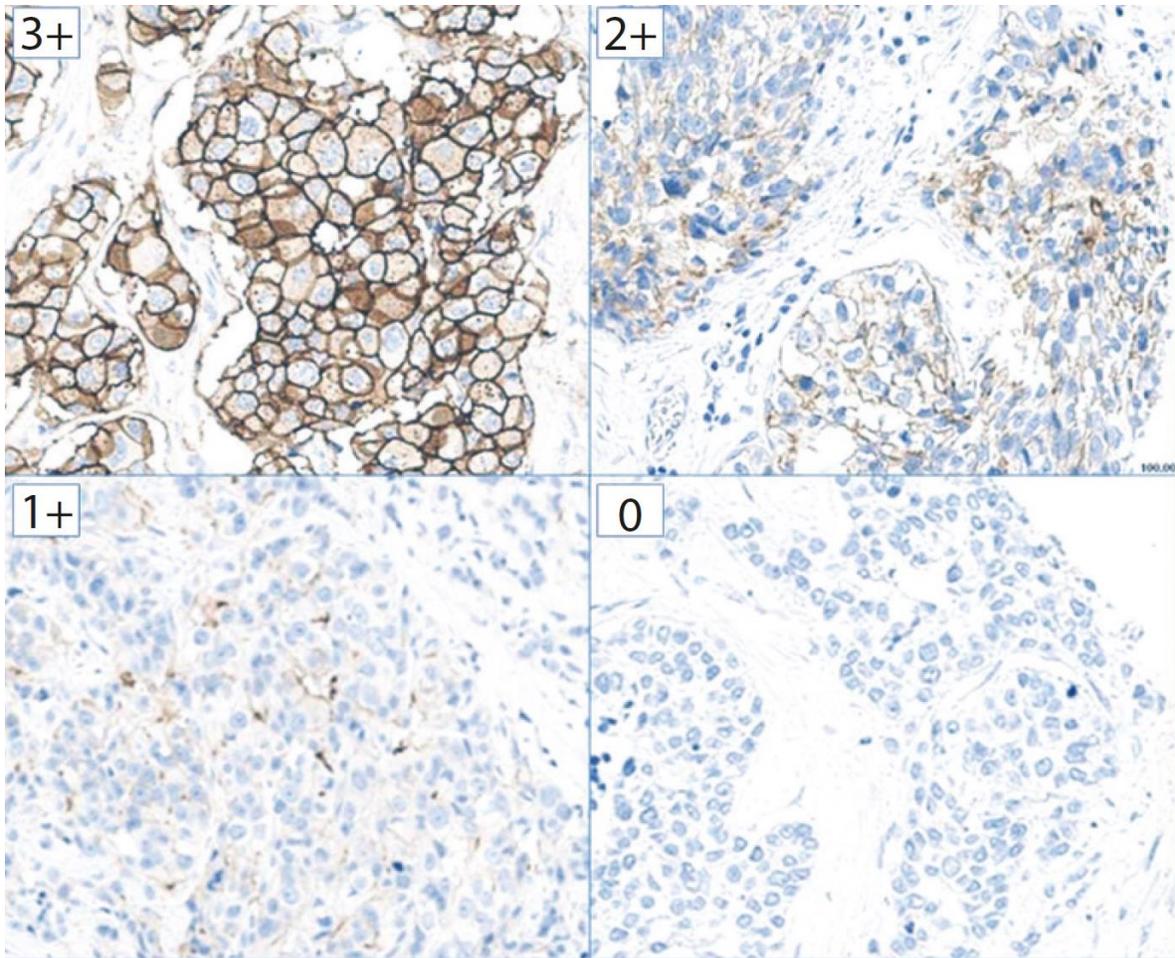


FIGURA 6. EJEMPLO DE LA CATEGORIZACIÓN 3+, 2+, 1+ Y 0 EN LA EVALUACIÓN HER2/neu POR IHQ.

Tomado de - Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(11):1364-1382.

Los casos con categorías 0 y 1+ no tienen sobreexpresión de la proteína HER2/neu, mientras que la categoría 3+ tiene sobreexpresión de la proteína HER2/neu (10). Sin embargo, la categoría 2+ indeterminado requiere una evaluación ulterior para confirmar o descartar la sobreexpresión de HER2/neu por método FISH (21-30).

El método de detección de sobreexpresión de HER2/neu por FISH se considera el estándar de oro (11, 30). Se basa en una reacción mediada por una sonda de ácidos nucleicos con la secuencia específica de un gen

determinado unido a una sonda luminiscente que se activa al formar el complejo pareado (30) (FIGURA 7). La prueba se puede realizar en el mismo tejido fijado en formalina embebido en formalina que en el método de IHQ, pero los requerimientos técnicos son más especializados, e incluyen ciclador, sondas de ácidos nucleicos, microscopio de inmunofluorescencia y equipo computacional de interpretación de datos (30). El resultado se interpreta como POSITIVO o NEGATIVO a número de copias aumentado de la proteína HER2/neu.

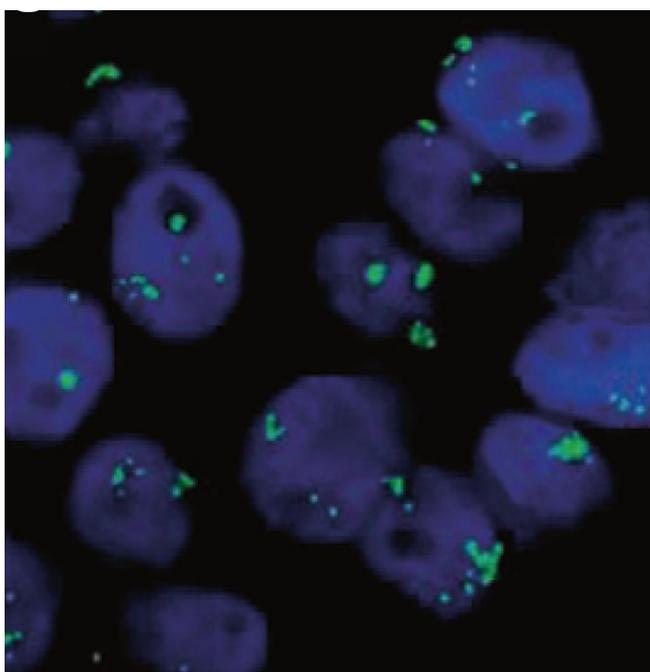


FIGURA 7. FISH POSITIVO A SOBREENPRESIÓN DE HER2/neu. Tomado de Laudadio J, Quigley DI, Tubbs R, Wolff DJ. HER2 testing: a review of detection methodologies and their clinical performance; Expert Rev Mol Diagn. 2007; 7(1):53-64.

La detección de sobreexpresión de HER2/neu en todos los casos de cáncer de mama por método de FISH no proporciona una diferencia significativa respecto al método de IHQ, salvo en aquellos casos categorizados como 2+ indeterminado por método de IHQ (30). Es por ello que, en concordancia con las distintas guías internacionales para la detección de sobreexpresión de HER2/neu, el Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del

Cáncer Mamario recomienda la confirmación de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH en casos categorizados como 2+ indeterminado por método de IHQ (10) (FIGURA 8). . Distintos estudios han planteado un punto de corte de confirmación de sobreexpresión de HER2/neu de 50+15% por método FISH en casos categorizados como 2+ indeterminado por IHQ como control de calidad interno en los laboratorios de patología quirúrgica (10,30).

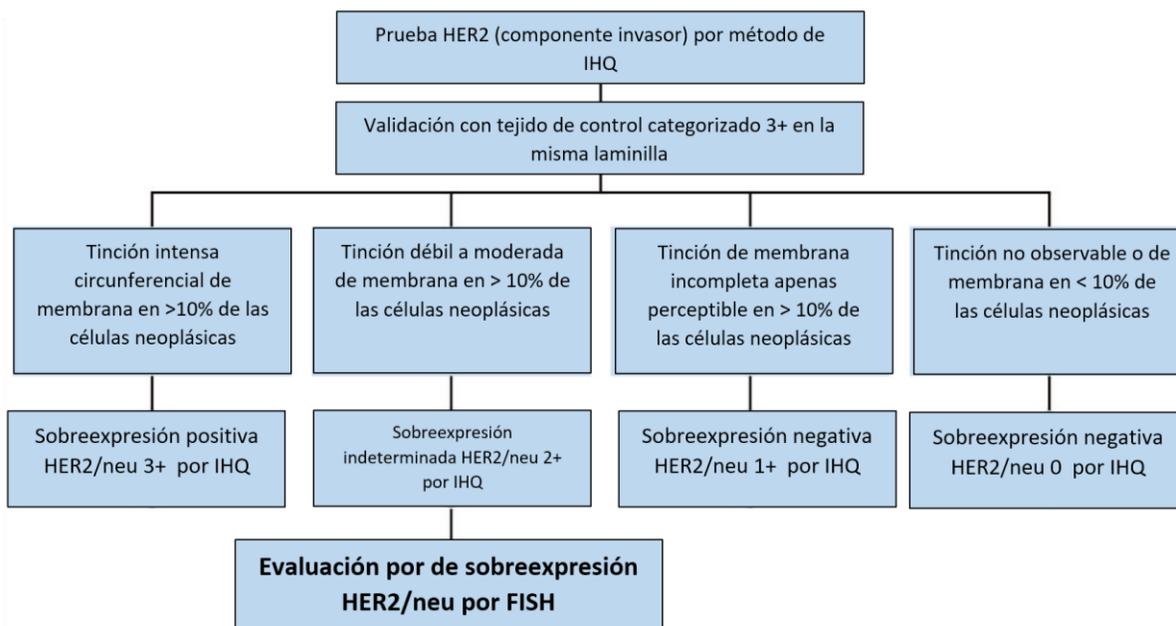


FIGURA 8. ALGORITMO DE EVALUACIÓN DE SOBREEXPRESIÓN HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ.

## IMPACTO DE LA DETECCIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE HER2/NEU

En 1987 se realizó el primer estudio que correlaciona la sobreexpresión de la proteína HER2/neu con un peor pronóstico en las pacientes con carcinoma de mama (31), pero no fue hasta 1999, con la introducción del anticuerpo monoclonal trastuzumab, que se dispuso al HER2/neu como un blanco terapéutico importante (6). En 2011 se desarrolló el segundo agente terapéutico, lapatinib también con blanco en la proteína HER2/neu, con una mejora importante en el perfil de bioseguridad respecto al trastuzumab

(9). A partir de entonces, se han dirigido estudios en pacientes con tumores de mama con sobreexpresión de la proteína HER2/neu que demuestran los diferentes beneficios terapéuticos de estos fármacos (9). En este contexto, el trastuzumab es el fármaco más estudiado y difundido (32-34). En cáncer de mama con sobreexpresión de HER2/neu, la adición de trastuzumab a cualquier régimen terapéutico está asociada a tiempos de vida libres de progresión significativamente más altos (32). En pacientes que reciben quimioterapia más trastuzumab la progresión se ve en una media de 7.4 meses contra los 4.6 meses que se observa en pacientes que sólo reciben quimioterapia (32). Hay otros estudios que demuestran tasas de respuesta patológica completa de hasta un 32% en pacientes que reciben quimioterapia neoadyuvante más trastuzumab, en comparación de las tasas de respuesta patológica completa del 10-15% en los pacientes que sólo reciben quimioterapia neoadyuvante (33). El riesgo relativo de muerte disminuye hasta un 20% en un seguimiento de 30 meses en pacientes que recibieron quimioterapia más trastuzumab respecto al 15% de los que recibieron sólo quimioterapia (32-34.) Basados en estos estudios, El Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario incluye la terapia con trastuzumab en pacientes con confirmación de sobreexpresión de la proteína HER2/ neu; sin embargo, enfatiza la importancia de la confirmación de la sobreexpresión como criterio de elegibilidad por los efectos adversos del medicamento (10). La cardiotoxicidad con insuficiencia cardíaca es el evento adverso más frecuente, con una incidencia de presentación que oscila entre el 4,7% y el 27.5.5% de los pacientes (35). En un estudio, la incidencia de cardiotoxicidad fue de 27% en pacientes que reciben quimioterapia en combinación con trastuzumab en comparación con el 8% de los que sólo recibieron quimioterapia. El segundo evento adverso más frecuente es la infección leve o moderada, con una incidencia de hasta el 47% cuando se asocia trastuzumab con quimioterapia, en comparación con el 27% de cuando se usa sólo quimioterapia (35-36).

## ASPECTOS HISTOLÓGICOS DEL CÁNCER DE MAMA CONSIDERADOS EN ESTE ESTUDIO

En correlación con los aspectos moleculares del cáncer de mama, hay conceptos histológicos como tipo histológico, grado histológico, presencia de carcinoma in situ y presencia de invasión linfovascular que son marcadores pronósticos en conjunto o independientes (37-39). El tipo histológico hace referencia a la diferenciación de la neoplasia en base a consideraciones histogénicas, morfológicas y de perfil molecular en la expresión de algunas proteínas como la E-caderina (37,40-41). Los tipos histológicos del cáncer de mama están descritos en la Clasificación de Tumores de Mama de la Organización Mundial de la Salud (FIGURA 9) (37).

### WHO classification of tumours of the breast

<b>EPITHELIAL TUMOURS</b>				
Microinvasive carcinoma				
<b>Invasive breast carcinoma</b>				
Invasive carcinoma of no special type (NST)	8500/3			
Pleomorphic carcinoma	8022/3			
Carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells	8035/3			
Carcinoma with choriocarcinomatous features				
Carcinoma with melanotic features				
Invasive lobular carcinoma	8520/3			
Classic lobular carcinoma				
Solid lobular carcinoma				
Alveolar lobular carcinoma				
Pleomorphic lobular carcinoma				
Tubulolobular carcinoma				
Mixed lobular carcinoma				
Tubular carcinoma	8211/3			
Cribiform carcinoma	8201/3			
Mucinous carcinoma	8480/3			
Carcinoma with medullary features				
Medullary carcinoma	8510/3			
Atypical medullary carcinoma	8513/3			
Invasive carcinoma NST with medullary features	8500/3			
Carcinoma with apocrine differentiation				
Carcinoma with signet-ring-cell differentiation				
Invasive micropapillary carcinoma	8507/3*			
Metaplastic carcinoma of no special type	8575/3			
Low-grade adenosquamous carcinoma	8570/3			
Fibromatosis-like metaplastic carcinoma	8572/3			
Squamous cell carcinoma	8070/3			
Spindle cell carcinoma	8032/3			
Metaplastic carcinoma with mesenchymal differentiation				
Chondroid differentiation	8571/3			
Ossaceous differentiation	8571/3			
Other types of mesenchymal differentiation	8575/3			
Mixed metaplastic carcinoma	8575/3			
Myoepithelial carcinoma	8962/3			
<b>Rare types</b>				
Carcinoma with neuroendocrine features				
Neuroendocrine tumour, well-differentiated	8246/3			
Neuroendocrine carcinoma, poorly differentiated (small cell carcinoma)	8041/3			
Carcinoma with neuroendocrine differentiation	8574/3			
Secretory carcinoma	8502/3			
Invasive papillary carcinoma	8503/3			
Acinic cell carcinoma	8550/3			
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3			
Polymorphous carcinoma	8525/3			
Oncocytic carcinoma	8290/3			
Lipid-rich carcinoma	8314/3			
Glycogen-rich clear cell carcinoma	8315/3			
Sebaceous carcinoma	8410/3			
Salivary gland/skin adnexal type tumours				
Cylindroma	8200/0			
Clear cell hidradenoma	8402/0*			
<b>Epithelial–myoepithelial tumours</b>				
Pleomorphic adenoma	8940/0			
Adenomyoepithelioma	8963/0			
Adenomyoepithelioma with carcinoma	8963/3*			
Adenoid cystic carcinoma	8200/3			
<b>Precursor lesions</b>				
Ductal carcinoma in situ	8500/2			
Lobular neoplasia				
Lobular carcinoma in situ				
Classic lobular carcinoma in situ	8520/2			
Pleomorphic lobular carcinoma in situ	8519/2*			
Atypical lobular hyperplasia				
<b>Intraductal proliferative lesions</b>				
Usual ductal hyperplasia				
Columnar cell lesions including flat epithelial atypia				
Atypical ductal hyperplasia				
<b>Papillary lesions</b>				
Intraductal papilloma	8503/0			
Intraductal papilloma with atypical hyperplasia	8503/0			
Intraductal papilloma with ductal carcinoma in situ	8503/2*			
Intraductal papilloma with lobular carcinoma in situ	8520/2			
Intraductal papillary carcinoma	8503/2			
Encapsulated papillary carcinoma	8504/2			
Encapsulated papillary carcinoma with invasion	8504/3			
Solid papillary carcinoma				
In situ	8509/2			
Invasive	8509/3			
<b>Benign epithelial proliferations</b>				
Sclerosing adenosis				
Apocrine adenosis				
Microglandular adenosis				
Radial scar/complex sclerosing lesion				
Adenomas				
Tubular adenoma	8211/0			
Lactating adenoma	8204/0			
Apocrine adenoma	8401/0			
Ductal adenoma	8503/0			
<b>MESENCHYMAL TUMOURS</b>				
Nodular fasciitis	8828/0*			
Myofibroblastoma	8825/0			
Desmoid-type fibromatosis	8821/1			
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1			
Benign vascular lesions				
Haemangioma	9120/0			
Angiomatosis				
Atypical vascular lesions				
Pseudoangiomatous stromal hyperplasia				
Granular cell tumour	9580/0			
Benign peripheral nerve-sheath tumours				
Neurofibroma	9540/0			
Schwannoma	9560/0			
Lipoma	8850/0			
Angiolipoma	8861/0			
Liposarcoma	8850/3			
Angiosarcoma	9120/3			
Rhabdomyosarcoma	8900/3			
Osteosarcoma	9180/3			
Leiomyoma	8890/0			
Leiomyosarcoma	8890/3			
<b>FIBROEPITHELIAL TUMOURS</b>				
Fibroadenoma	9010/0			
Phyllodes tumour	9020/1			
Benign	9020/0			
Borderline	9020/1			
Malignant	9020/3			
Periductal stromal tumour, low grade	9020/3			
Hamartoma				
<b>TUMOURS OF THE NIPPLE</b>				
Nipple adenoma	8506/0			
Syringomatous tumour	8407/0			
Paget disease of the nipple	8540/3			
<b>MALIGNANT LYMPHOMA</b>				
Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3			
Burkitt lymphoma	9687/3			
T-cell lymphoma				
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3			
Extranodal marginal-zone B-cell lymphoma of MALT type	9699/3			
Follicular lymphoma	9690/3			
<b>METASTATIC TUMOURS</b>				
<b>TUMOURS OF THE MALE BREAST</b>				
Gynaecomastia				
Invasive carcinoma	8500/3			
In situ carcinoma	8500/2			
<b>CLINICAL PATTERNS</b>				
Inflammatory carcinoma	8530/3			
Bilateral breast carcinoma				

FIGURA 9. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE MAMA DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Reproducido de

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, et al. WHO Classification of tumours of the breast. 3ra ed. IARC/WHO; 2012.

El tipo histológico más frecuente de cáncer de mama es el carcinoma invasor de tipo no especial, anteriormente denominado carcinoma ductal (37). De acuerdo a esta clasificación, este tipo histológico se diagnostica por exclusión, ya que no muestra suficientes características morfológicas o moleculares de alguno de los otros tipos histológicos (37). Arquitectalmente, las células neoplásicas pueden disponerse en cordones, agregados o trabéculas. En algunos casos la diferenciación glandular puede ser evidente en formaciones tubulares con un lumen central en los grupos de células neoplásicas. La citomorfología también puede ser heterogénea. El citoplasma puede ser abundante y eosinofílico. Los núcleos pueden ser de regulares y uniformes, a altamente pleomórficos y prominentes, a menudo con múltiples nucléolos. La actividad mitótica puede estar virtualmente ausente o ser prominente (37, 40-41) (FIGURA 10).

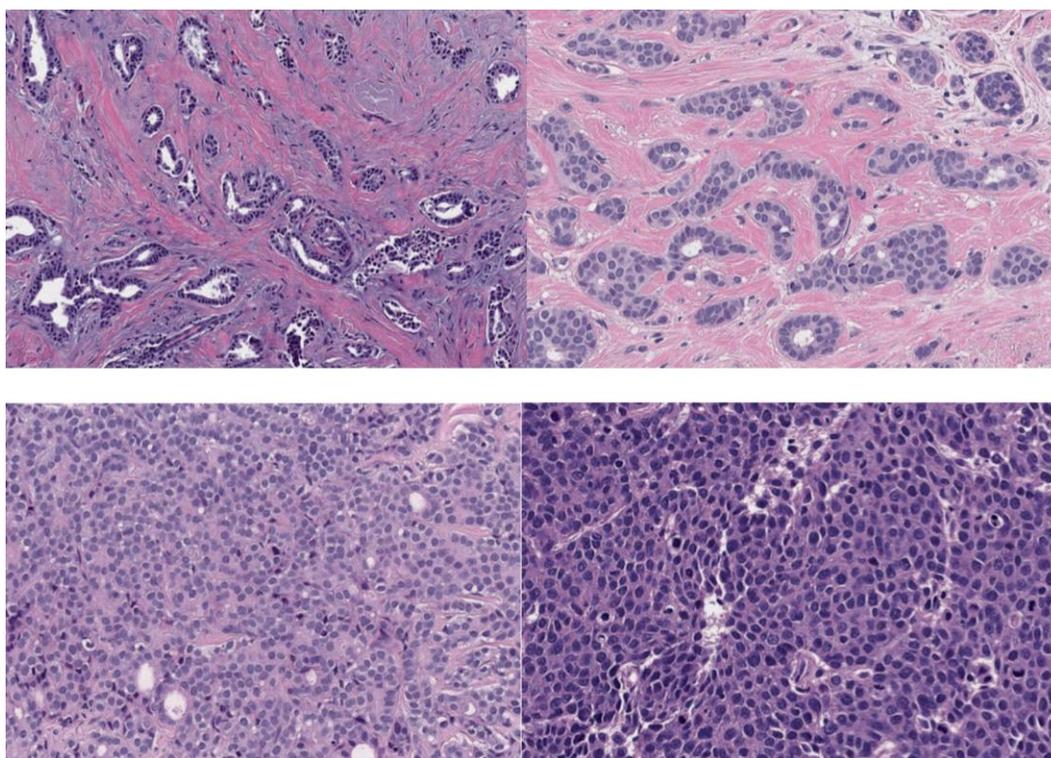


FIGURA 10. CARCINOMA INVASOR DE TIPO NO ESPECIAL DUCTAL. EN LA PARTE SUPERIOR LA NEOPLASIA FORMA TÚBULOS CON LÚMENES. EN LA PARTE INFERIOR SE EJEMPLIFICA UN PATRÓN SÓLIDO Y ARQUITECTURA CELULAR. Tomado de Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, et al. WHO Classification of tumours of the breast. 3ra ed. IARC/WHO; 2012

Es precisamente este conjunto de características de arquitectura, citomorfología y actividad mitótica lo que define el grado histológico (37). Históricamente, el grado histológico es y ha sido un marcador independiente de pronóstico en el cáncer de mama (38-39). La clasificación de grado histológico más ampliamente aceptada, y recomendada por El Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario y por el Colegio de Patólogos Americanos es la propuesta en el estudio de Nottingham (37,42). En esta clasificación, se asigna un valor de 1 a 3 puntos a cada uno de estos 3 rubros: formación glandular/tubular, pleomorfismo nuclear y número de figuras mitóticas. La suma de los puntos agrupa las neoplasias en 3 categorías: Grado 1 de 3 a 5 puntos, Grado 2 de 6 a 7 puntos, y Grado 3 de 8 a 9 puntos (FIGURA 11) (42,43). Además de ser un indicador independiente de pronóstico en el cáncer de mama, algunos estudios correlacionan el grado histológico con el grupo molecular (5,43). Mientras que los grupos luminal A y luminal B tienen a ser grado histológico 1, los grupos HER2 y triple negativo tienen a ser grado histológico 2 y 3 (43).

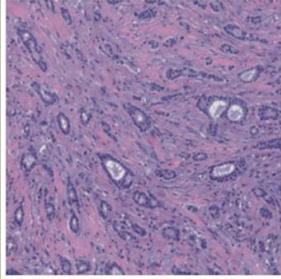
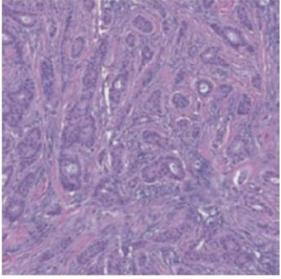
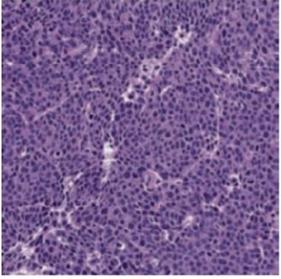
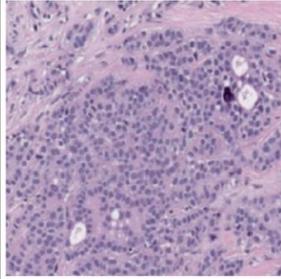
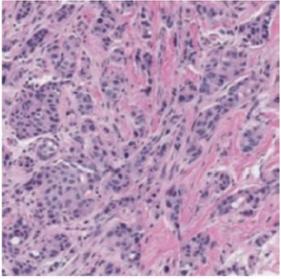
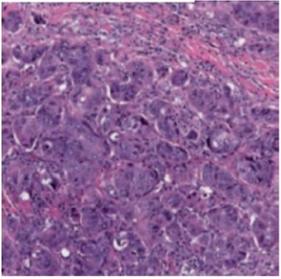
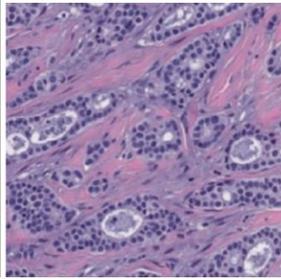
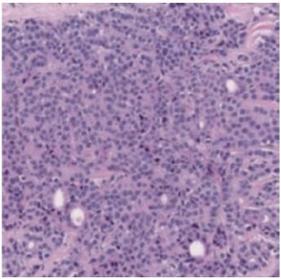
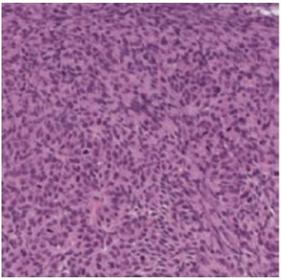
Score	1	2	3
Formación de túbulos	>75 % 	10-75 % 	<10 % 
Pleomorfismo nuclear	Uniforme 	Variación moderada 	Variación marcada 
Conteo de mitosis	Raras 	Ocasionales 	Abundantes 

FIGURA 11. GRADO HISTOLÓGICO. GRADO 1 DE 3-5 PUNTOS. GRADO 2 DE 6-7 PUNTOS. GRADO 3 DE 8-9 PUNTOS. Adaptado de Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, et al. WHO Classification of tumours of the breast. 3ra ed. IARC/WHO; 2012

El carcinoma ductal in situ es una proliferación de células neoplásicas confinadas al sistema mamario ductal-lobular y está caracterizada por atipia nuclear de sutil a marcada, además de una tendencia inherente pero no obligada de progresar a cáncer de mama invasor (37, 44-45) (FIGURA 12). No hay un consenso sobre alguna clasificación del carcinoma in situ con impacto clínico (45). Para fines descriptivos se aceptan los patrones arquitecturales comedo, sólido, cribiforme, micropapilar y papilar; además

de tres grados nucleares, y presencia o ausencia de necrosis (43-45). De estas características, la más prometedora para predecir progresión a carcinoma invasor es el grado nuclear (45). El carcinoma ductal in situ con grado nuclear bajo está compuesto por células pequeñas, células monomórficas que crecen en patrones micropapilar, cribiforme o sólido (37). El patrón sólido puede mostrar microacinos en los que las células están polarizadas alrededor de un lumen muy pequeño en un patrón rosetoide (37). El núcleo es de tamaño uniforme, con cromatina regular y nucléolo inconspicuo; las figuras mitóticas son escasas. Las microcalcificaciones son de tipo psamomatoso. La necrosis es poco común. El carcinoma ductal de grado nuclear intermedio está compuesto por células con variabilidad leve a moderada en el tamaño, forma, disposición, cromatina en grumos, y nucléolo prominente. Las figuras mitóticas pueden estar presentes. Las microcalcificaciones suelen ser laminadas y amorfas. Se puede observar necrosis focal o de tipo comedo. El carcinoma ductal de alto grado nuclear está compuesto por células muy atípicas, generalmente en un patrón sólido, cribiforme o micropapilar. Los núcleos son pleomórficos, pobremente polarizados, con contornos y distribución irregulares, cromatina en grumos y nucléolos prominentes. Las figuras mitóticas son comunes, pero su presencia nos es indispensable para su diagnóstico. La necrosis de tipo comedo, con abundantes debris necróticos en el lumen del ducto, rodeada de proliferación celular sólida, es muy frecuente (37).

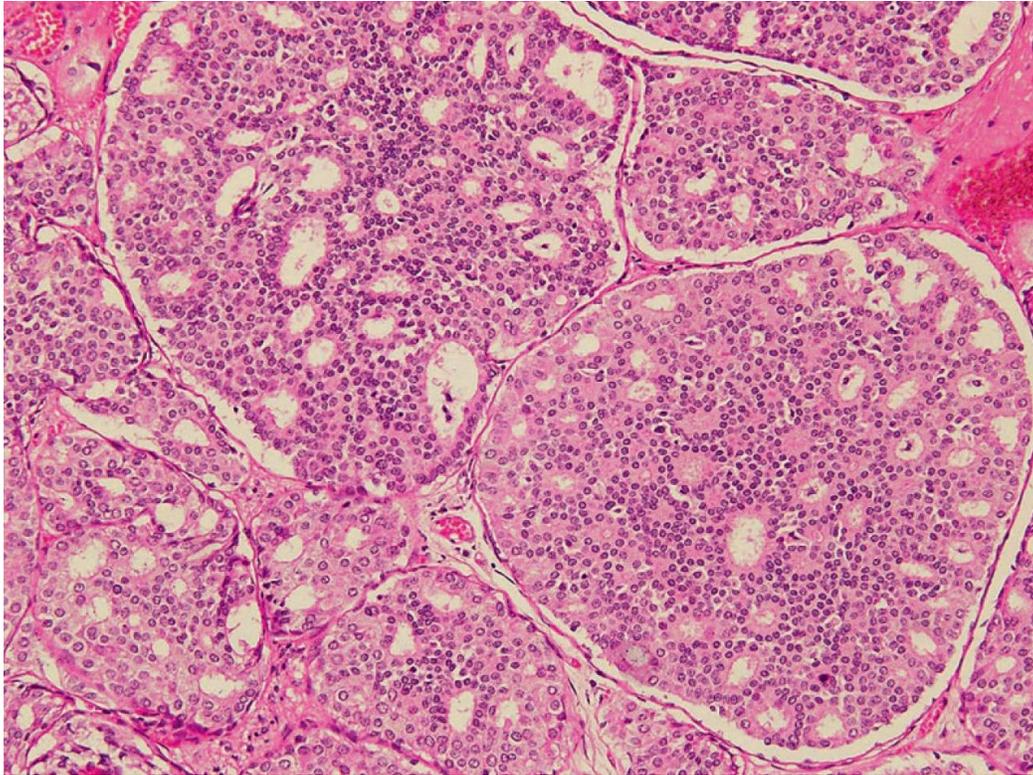


FIGURA 12. CARCINOMA DUCTAL IN SITU. LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS MUESTRAN PLEOMORFISMO, SE DISPONEN EN PATRÓN CRIBIFORMES, PERO SE ENCUENTRAN CONFINADAS POR LA MEMBRANA BASAL DE DUCTO. Tomada de Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, et al. WHO Classification of tumours of the breast. 3ra ed. IARC/WHO; 2012

La invasión linfovascular es el hallazgo de células de carcinoma dentro de los vasos pequeños fuera de la masa neoplásica principal (FIGURA 13) (37,43). La invasión linfovascular está asociada a metástasis en ganglios linfáticos y también es un predictor independiente de recurrencia local o a distancia. La invasión linfovascular está presente en un 15% de pacientes sin presencia de invasión y es el factor predictor de sobrevida más importante en estos pacientes (46). La invasión al espacio vascular puede servir como reservorio de células neoplásicas en la piel o en la pared torácica. Estas no se pueden remover con cirugía convencional. Además, los casos de cáncer de mama invasión linfovascular son menos susceptibles a tratamiento quirúrgico (46). Esto se demuestra con la presencia de cáncer residual sólo en invasión linfovascular después de quimioterapia neoadyuvante en algunos casos. La invasión linfovascular en la dermis es

un factor de muy mal pronóstico, asociada a tasas altas de recurrencia y metástasis distantes (38). Cuando es extensa, la invasión linfovascular en dermis causa los signos clínicos característicos de carcinoma inflamatorio. Hay algunas correlaciones inferenciales en los tipos moleculares de carcinoma de mama. Por ejemplo, los carcinomas tipo triple negativo usualmente no muestran metástasis, pero sí invasión linfovascular y metástasis a distancia (5, 37,43).

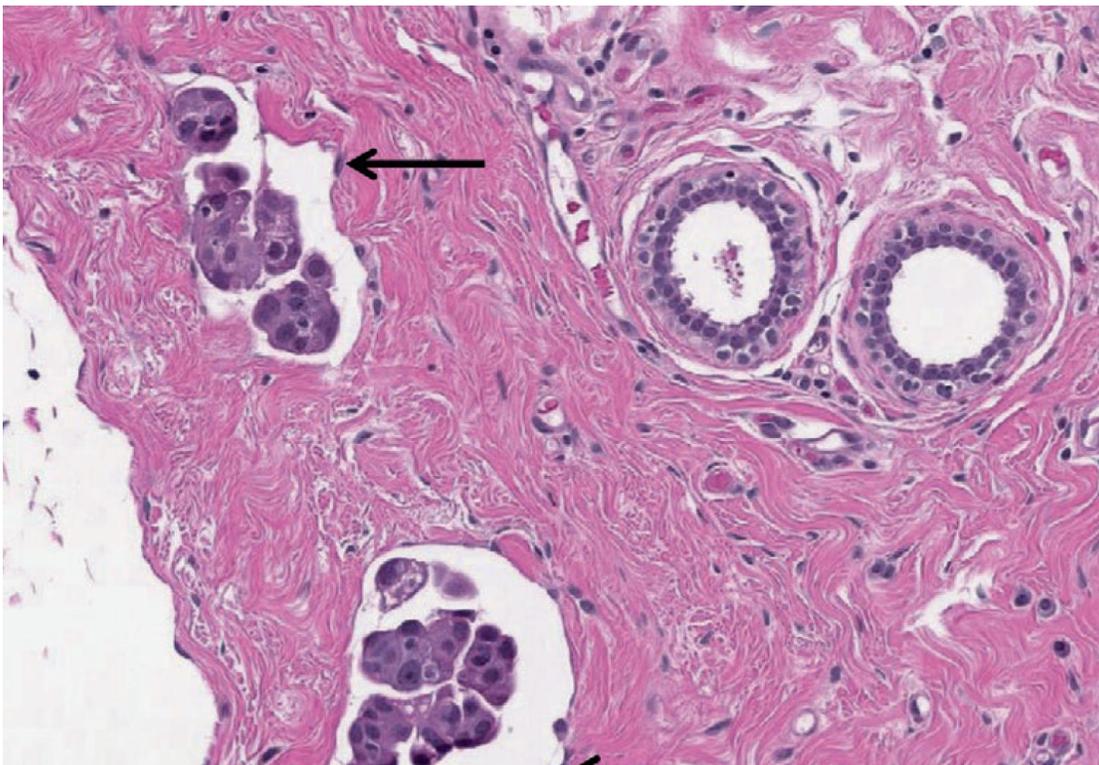


FIGURA 13. INVASIÓN LINFOVASCULAR. SE IDENTIFICAN CÉLULAS NEOPLÁSICAS DENTRO DEL LUMEN VASCULAR CON LA MISMA CONFORMACIÓN DEL VASO. LA FLECHA SEÑALA UNA CÉLULA ENDOTELIAL. Tomado de Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, et al. WHO Classification of tumours of the breast. 3ra ed. IARC/WHO; 2012

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la tasa de sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en los casos diagnosticados con carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica?

## JUSTIFICACIÓN

Uno de los grandes hitos de la medicina de precisión en el cáncer de mama son los medicamentos que tienen efecto en la proteína HER/2neu con implicaciones directas en la sobrevida de los pacientes. Sin embargo, sólo tuvieron beneficio en los pacientes con tumores en los que se demuestra la sobreexpresión de dicha proteína. En la práctica clínica la detección de sobreexpresión de la proteína HER2/Neu se realizó, en primera instancia, con método de inmunohistoquímica mediante una evaluación semicuantitativa dependiente de observador. En este método se clasificó los casos en 4 categorías: 0 negativo, 1+ negativo, 2+ indeterminado y 3+ positivo. En las categorías 0 negativo y 1+ negativo la sobreexpresión de HER2/neu es negativa; en la categoría 3+ positivo la sobreexpresión de HER2/neu es positiva. En los casos categorizados como 2+ indeterminado se requirió una evaluación subsecuente de sobreexpresión de la proteína HER2/neu por método FISH. El método FISH fue considerado el estándar de oro para detección de sobreexpresión de HER2/neu, sin embargo es un método más costoso que requiere la infraestructura de un laboratorio de referencia. Las guías nacionales internacionales de interpretación de IHQ para sobreexpresión HER2 propusieron un corte de control de 50+-15% de correlación entre categoría 2+ indeterminado con IHQ y sobreexpresión confirmada con FISH. Con el presente estudio se buscó conocer la incidencia sobreexpresión de proteína HER2/neu con el método estándar de oro FISH de los casos categorizados como 2+ indeterminado con método de inmunohistoquímica para conocer el si el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” se encontró en los estándares de calidad adecuados. Adicionalmente, se describió las características de estos casos para abrir nuevas líneas de investigación en la validación de la clasificación de sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ.

**MAGNITUD DEL PROBLEMA:** El cáncer de mama constituye la primera causa de mortalidad en México atribuibles a neoplasias malignas en mujeres. De acuerdo al INEGI, en el año 2018 en México la tasa de mortalidad fue de 18 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años, la tasa de incidencia de 32,4 por cada 100,000 mujeres, con 9,834 casos nuevos. Michoacán ocupa el lugar 17 como entidad federativa con una tasa de mortalidad de 16 por cada 1000,000 mujeres mayores de 25 años. Los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan proteína HER2/neu se benefician de terapias blanco. En el departamento de patología del Hospital General de Morelia se desconoce el porcentaje de correlación entre categoría 2+ indeterminado con IHQ y sobreexpresión confirmada con FISH. Este es un buen indicador de control de calidad para uso racional de los recursos institucionales.

**TRASCENDENCIA:** Si la correlación fue la esperada, este estudio fungirá como indicador de calidad interno en diagnóstico de la categoría 2+ indeterminado para expresión de HER2/neu por método de inmunohistoquímica. De no cumplirse la hipótesis de correlación, se pueden abrir nuevas líneas de investigación de concordancia interobservador del diagnóstico de la categoría 2+ indeterminado para expresión de HER2/neu por método de inmunohistoquímica en el departamento de patología del Hospital General de Morelia, y se instará a cernirse a las recomendaciones de las guías de interpretación.

**VULNERABILIDAD:** El proyecto abre la puerta a nuevas líneas de investigación que incluyen la categorización molecular de los cánceres de mama con sobreexpresión de HER2/neu confirmada con método FISH, así como el seguimiento clínico de los mismos. Estas líneas de investigación quedarán pendientes para estudio ulterior

**CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN A LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA ESTUDIADO:** El problema pudo ser resuelto totalmente con los datos obtenidos

**FACTIBILIDAD:** Se contó con todos los recursos humanos y de infraestructura para realizar el estudio. Así como expedientes, material de patología y resultados por FISH

**RIESGO ÉTICO DEL ESTUDIO:** Mínimo, dado que solo se obtuvo información de archivos de patología.

## OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluar la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica.

Objetivos específicos:

1.- Definir las características histológicas y de estadio TNM clínico de los casos categorizados HER2/neu 2+ indeterminado con confirmación de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH.

2.-Definir las características inmunohistoquímicas de los casos categorizados HER2/neu 2+ indeterminado con confirmación de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH.

3.- Determinar la frecuencia de casos con sobreexpresión de la proteína HER2/neu detectada por método FISH en casos de cáncer de mama categorizados 2+ indeterminado de HER2/neu por método de IHQ.

## HIPÓTESIS

### HIPÓTESIS NULA:

Existe una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica.

### HIPÓTESIS ALTERNA:

No existe una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron estudios anatomopatológicos de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método de IHQ con evaluación subsecuente de sobreexpresión de proteína HER2/neu por método FISH atendidos en el Centro Estatal de Atención Oncológica del Estado de Michoacán en evaluación conjunta con el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” en un período comprendido de 2015 a 2019. Se seleccionaron 35 casos, de los cuales se eliminó 1.

Las variantes correspondientes a edad del paciente, tamaño del tumor, estadio TNM clínico y tipo de biopsia se obtuvieron de la solicitud de estudio anatomopatológico y se corroboraron con el expediente clínico pertinente.

El resultado de categorización de sobreexpresión de proteína HER2/neu por método de IHQ se obtuvo del reporte histopatológico en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” y se corroboró en revisión conjunta del material con un patólogo adscrito a la unidad en concordancia con las recomendaciones del Colegio de Patólogos Americanos para la evaluación de sobreexpresión de proteína HER2/neu por método de IHQ en el que se define:

Caso 2+ indeterminado para sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ: Tinción de membrana de débil a moderada en más del 10% de las células neoplásicas.

Se definió tinción DÉBIL como “apenas perceptible”, y MODERADA mayor afinidad tintorial que débil, pero menor que INTENSA en los casos control 3+.

Para la verificación de una técnica correcta del método de IHQ, se verificó que cada una de las laminillas histológicas evaluada tuviera un corte histológico control categorizado como 3+ positivo para sobreexpresión de HER2/neu definido como:

Caso control 3+ positivo para sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ: Tinción circunferencial completa intensa en más de 10% de las células neoplásicas.

Subsecuentemente se confirmó en el archivo de archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” la existencia del reporte de sobreexpresión de HER2/NEU por método FISH positiva o negativa. Dicha confirmación es un servicio proporcionado gratuitamente por un laboratorio de referencia externo a cargo de la farmacéutica ROCHE.

Las variantes correspondientes a tipo histológico, grado histológico, presencia de carcinoma ductal in situ y presencia de invasión linfovascular se obtuvieron del reporte histopatológico en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” y se corroboró en revisión conjunta del material con un patólogo adscrito a la unidad en concordancia con las recomendaciones de la Clasificación de Tumores de Mama de la Organización Mundial de la Salud 3era edición y del Colegio de Patólogos Americanos, en el que se definen:

Tipo histológico: conjunto de características histopatológicas y moleculares que caracterizan a cada uno de las neoplasias de tejido mamario.

Carcinoma ductal in situ: lesión neoplásica caracterizada por estar confinada al ducto mamario, limitada por una membrana basal del mismo intacta, que muestra características citomorfológicas de mayor atipia que la hiperplasia ductal atípica. Pueden mostrar diferentes patrones arquitecturales, en los que se incluyen sólido, cribiforme, tubular, entre otros. Las figuras mitóticas y la necrosis pueden estar presentes, pero su ausencia no descarta el diagnóstico.

La invasión linfovascular se define como la presencia de un grupo de más de 5 células neoplásicas en la luz vascular. Para evitar la confusión con artefactos de retracción tumoral, tiene que ser visible la célula endotelial del vaso correspondiente, el grupo de células tiene que adoptar la misma forma

que el lumen y el vaso tiene que estar localizado fuera de la masa neoplásica principal.

Las variantes correspondientes a expresión de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y proteína Ki-67 por método de IHQ se obtuvieron del reporte histopatológico en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” y se corroboraron en revisión conjunta del material con un patólogo adscrito a la unidad en concordancia con las recomendaciones de la del Colegio de Patólogos Americanos, en las que se considera positiva si la tinción es exclusivamente nuclear.

## POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron 34 pacientes con estudios anatomopatológicos de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método de IHQ con evaluación subsecuente de sobreexpresión de proteína HER2/neu por método FISH atendidos en el Centro Estatal de Atención Oncológica del Estado de Michoacán en evaluación conjunta con el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” en un período comprendido de 2015 a 2019

## DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo, observacional, analítico y retrospectivo.

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Resultados histopatológicos de pacientes con diagnóstico de carcinoma invasor de mama con determinación de HER2/neu 2+ indeterminado por IHQ COMPLETOS

Material anatomopatológico completo

Reporte completo de HER2/neu por método FISH

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes sin carcinoma invasor de mama

Pacientes con resultado 0,1+ o 3+ en la determinación de HER2/neu por IHQ

Casos con resultado inespecífico en HER2/neu por IHQ

No disponibilidad

### CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

No aplica

## VARIABLES

Objetivo específico	Variable de estudio	Clasificación de variable	Unidades de medida
Definir las características histológicas y clínicas de los casos categorizados HER2/neu 2+ indeterminado con confirmación de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH	Tamaño del tumor	Cuantitativa continua	Centímetros
	Tipo histológico	Cualitativa nominal	De tipo no específico Lobulillar Otros tipos
	Grado histológico	Cualitativa ordinal	Grado 1 Grado 2 Grado 3
	Invasión linfovascular	Cualitativa nominal	Identificada No identificada
	Carcinoma Ductal in situ	Cualitativa nominal	Identificado No identificado
	Estadio clínico TNM	Cualitativa ordinal	Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV
Definir las características inmunohistoquímicas de los casos categorizados HER2/neu 2+ indeterminado con confirmación de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH	Receptores de Estrógenos	Cualitativa nominal	Positivo Negativo
	Receptores de Progesterona	Cualitativa nominal	Positivo Negativo
	Ki-67	Cuantitativa continua	%
Determinar la frecuencia de casos con sobreexpresión de la proteína HER2/neu detectada por método FISH en casos de cáncer de mama categorizados 2+ indeterminado de HER2/neu por método de IHQ	Sobreexpresión de HER2/neu por FISH	Cualitativa nominal	Positivo Negativo

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se ajustó a las normas éticas institucionales y a la Ley General de Salud en materia de experimentación en seres humanos, así como a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre los “Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos”, con modificación en el congreso de Tokio, Japón en 1983. Se ajustó a las normas e instructivos institucionales en materia de investigación científica, por lo tanto, se realizó hasta que fue aprobado por el comité local de investigación. El estudio correspondió a la categoría I de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud en el título segundo, capítulo I, artículo 17. Además de acuerdo con los principios adoptados por la 18<sup>a</sup> Asamblea Médica Mundial de Helsinki, Finlandia en junio de 1964, y enmendadas por la 29<sup>a</sup> Asamblea Médica Mundial en Venecia, Italia, en octubre de 1983, por la 41<sup>a</sup> Asamblea Mundial Hong Kong, en septiembre de 1989, en la 48<sup>a</sup> Asamblea en Sudáfrica en 1996; y en la última 59<sup>a</sup> Asamblea general de la Asociación Médica Mundial en Seúl, en octubre de 2008.

### REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD:

Artículo 13. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio,

Deberá prevalecer, el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.

Artículo 14. La investigación que se realice en seres humanos deberá desarrollarse bajo las siguientes bases:

1. Se ajustará a principios científicos y éticos que la justifiquen.

2. Se fundamentará en la experimentación previa realizada en animales, en laboratorios o en otros hechos científicos.
3. Se deberá realizar solo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo.
4. Deberán prevalecer siempre las probabilidades de los beneficios esperados sobre los riesgos predecibles.
5. Contará con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal, con las excepciones que este reglamento señale.
6. Deberá ser realizada por profesionales de la salud a que se refiere el artículo 114 de este reglamento, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud que actúe bajo la supervisión de las autoridades sanitarias competentes y que cuente con los recursos humanos y materiales necesarios que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.
7. Contará con el dictamen favorable de las comisiones de investigación, ética y de bioseguridad en su caso.
8. Se llevará a cabo cuando se tenga la autorización del titular de la institución de atención a la salud y en su caso, de la secretaría.

#### DECLARACIÓN DE HELSINKI:

El principio básico es el respeto por el individuo, su derecho a la autodeterminación y el derecho a tomar decisiones informadas (consentimiento informado), incluyendo la participación en la investigación, tanto al inicio como durante el curso de la investigación. El deber del investigador es solamente hacia el paciente o el voluntario y mientras exista necesidad de llevar a cabo una investigación, el bienestar del sujeto debe ser siempre precedente sobre los intereses de la ciencia o de la sociedad, y las consideraciones éticas deben venir siempre del análisis precedente de las leyes y regulaciones.

El reconocimiento de la creciente vulnerabilidad de los individuos y los grupos necesita especial vigilancia. Se reconoce que cuando el participante en la investigación es incompetente, física o mentalmente incapaz de consentir, o es un menor entonces el permiso debe darlo un sustituto que vele por el mejor interés del individuo. En este caso su consentimiento es muy importante.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las variables cualitativas se realizó estadística descriptiva con análisis de frecuencia, promedio y media.

En la comparación de las variables cuantitativas y variables cuantitativas se realizó T de Student con un valor significativo de  $p < 0.05$ .

En la comparación de variables nominales cualitativas se realizó Chi cuadrada con un valor significativo de  $p < 0.05$ .

Los datos se analizaron con programa estadístico SPSS ® versión 26 y se presentaron mediante tablas y gráficas.

## RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 35 casos categorizados como 2+ indeterminado para sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ, de los cuales se eliminó 1 caso por no contar con resultado de confirmación de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH.

Los resultados de frecuencia de los 34 casos analizados se presentan en la TABLA 1.

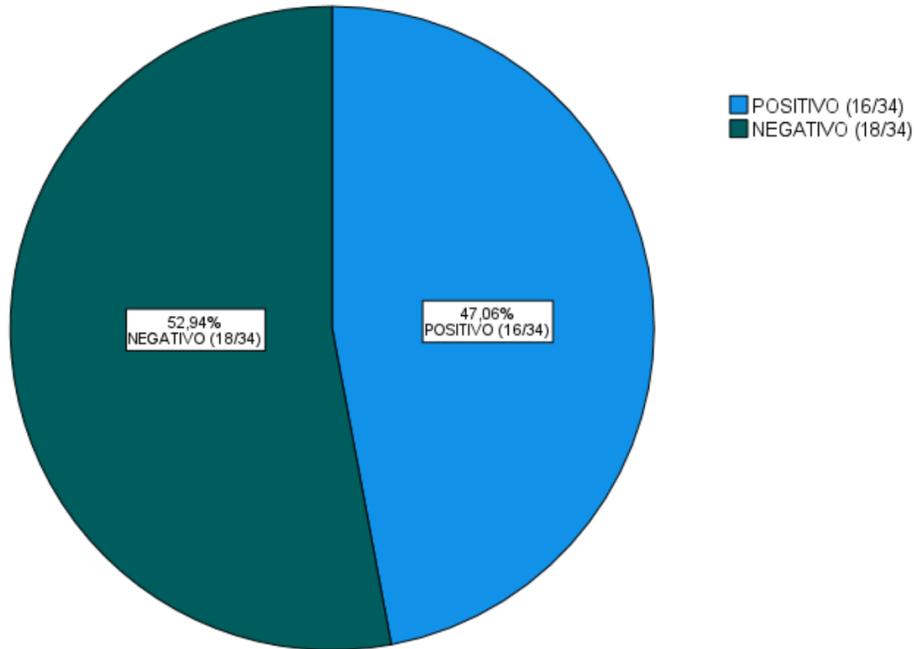
Tabla 1. Características de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por Método de IHQ.

TABLA 1: CASOS 2+ INDETERMINADO PARA HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ (n=34)	
SEXO	Femenino 100% (34/34)
EDAD	Media 44.82 ± 8 años
TIPO DE BIOPSIA	Biopsia con aguja de corte: 97% (33/34) Biopsia excisional: 3% (1/34)
ESTADIO TNM CLÍNICO	Estadio IA 23.5% (8/34) Estadio IIA 55.9% (19/34) Estadio IIB 20.6% (7/34)
TAMAÑO DEL TUMOR	3 ± 0.9 cm
TIPO HISTOLÓGICO	Carcinoma invasor de tipo no especial 100% (34/34)
GRADO HISTOLÓGICO	Grado 1 38.2% (13/34) Grado 2 44.1% (15/34) Grado 3 17.6% (6/34)
PRESENCIA DE CARCINOMA DUCTAL IN SITU	64.7% (22/34)
PRESENCIA DE INVASIÓN LINFOVASCULAR	35.3% (12/34)
AFINIDAD TINTORIAL EN HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ	DÉBIL 55.9% (19/34) MODERADA 44.1% (15/34)
PORCENTAJE DE CÉLULAS TEÑIDAS EN HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ	Media 23.09 %
PRESENCIA DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS POR MÉTODO DE IHQ	79.4% (27/34)
PRESENCIA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA POR MÉTODO DE IHQ	58.8% (20/34)
EXPRESIÓN DE PROTEÍNA Ki-67 POR MÉTODO DE IHQ	100% (34/34)
PORCENTAJE DE CÉLULAS CON EXPRESIÓN DE PROTEÍNA Ki-67 POR MÉTODO DE IHQ	Media 17.06%
CONFIRMACIÓN DE SOBREEXPRESIÓN POSITIVA DE HER2/neu POR MÉTODO FISH	47.1% (16/34)

Fuente: Base de datos.

De los 34 casos incluidos en el estudio, 16 (47%) fueron positivos a sobreexpresión de HER2/neu por método de FISH, y 18 (53%) fueron negativos a sobreexpresión de HER2/neu por método de FISH, como se muestra en la FIGURA 14.

RESULTADO DE SOBREENPRESIÓN HER2/NEU FISH EN CASOS 2+ INDETERMINADO HER2/neu POR IHQ (n=34)

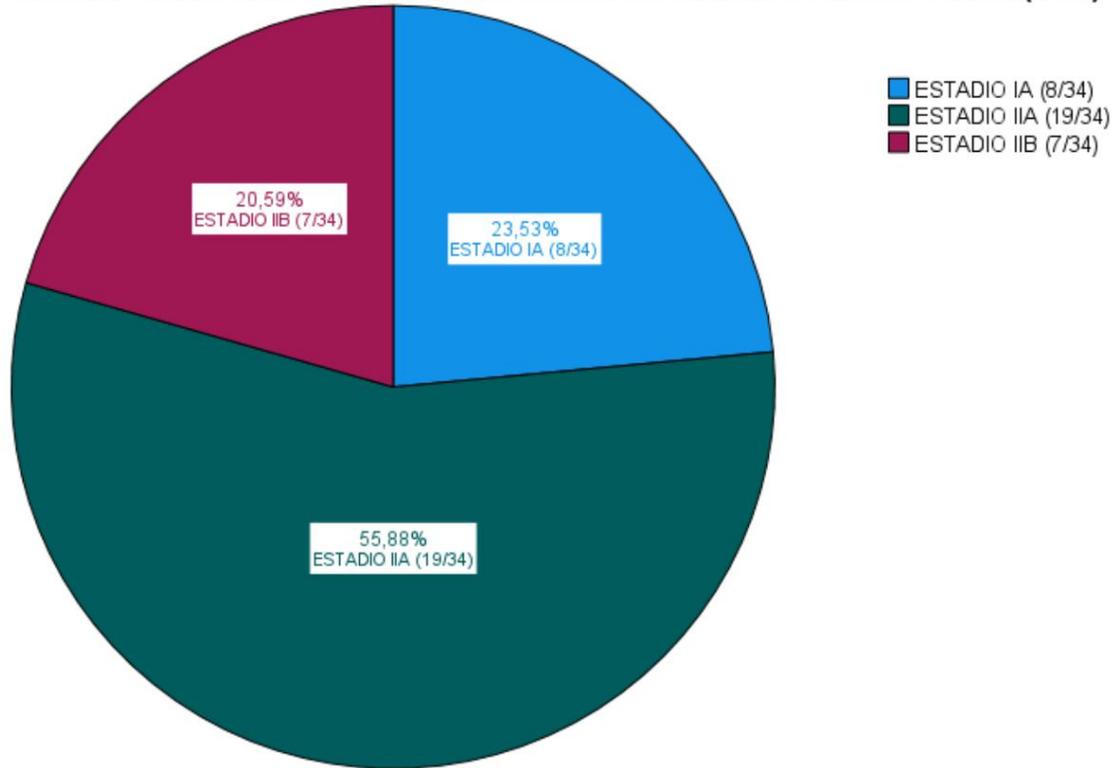


Fuente: Base de datos

FIGURA 14: Clasificación por resultado de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH en porcentaje de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

Los 34 casos analizados correspondieron a pacientes de sexo femenino, con una edad media de 44.82 años, en un rango de los 29 a los 57 años. En 33 (97%) de los casos se realizó biopsia con aguja de corte y en 1 (3%) biopsia excisional. Respecto al estadio TNM clínico, 8 (24%) de los casos fueron estadio TNM clínico IA, 19 (55%) fueron estadio TNM clínico IIA y 7 (21%) fueron estadio TNM clínico IIB, como se muestra en la FIGURA 15.

ESTADIO TNM CLÍNICO CASOS 2+ INDETERMINADO PARA HER2/neu POR IHQ (n=34)

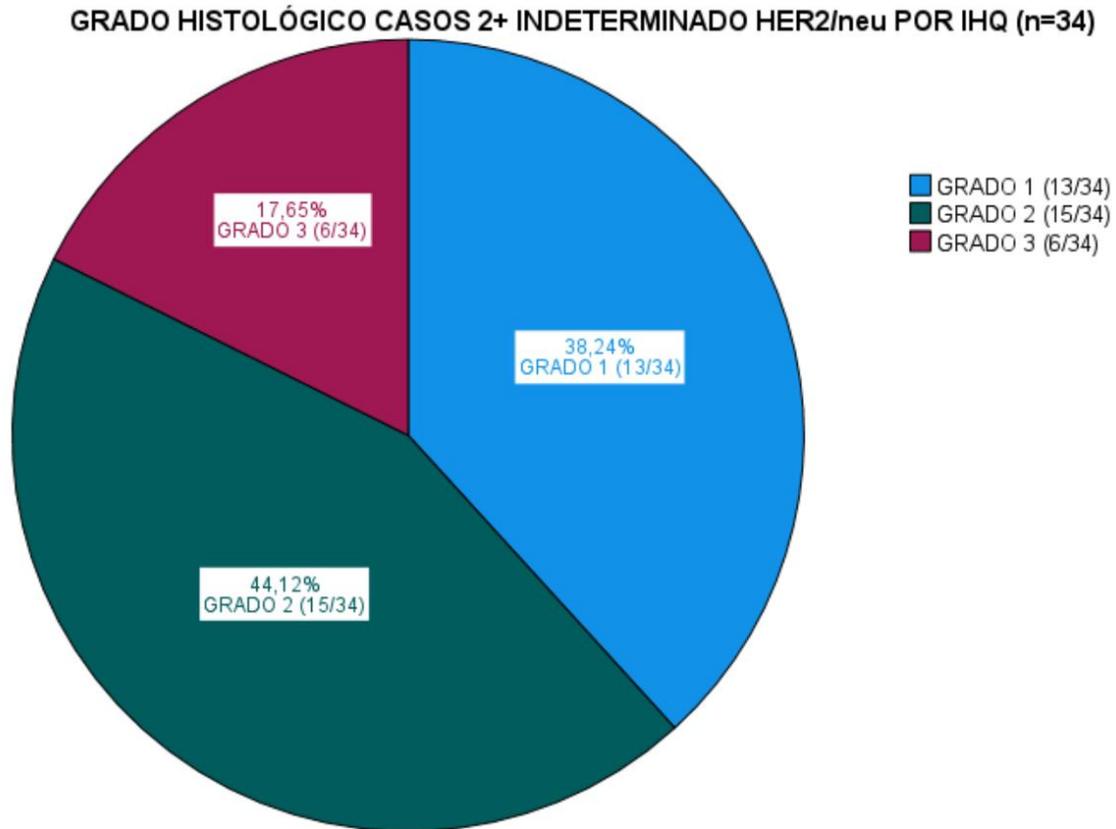


Fuente: Base de datos

FIGURA 15: Clasificación por Estadio TNM clínico en porcentaje de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

Respecto al tamaño del tumor, la media fue de  $3 \pm 0.9$  cm. Cabe recalcar que 8 (23.5%) de los casos midieron menos de 2 cm (categoría T1 en la clasificación TNM), y 26 (76.5%) midieron entre 2 y 5 cm (categoría T2 en la clasificación TNM).

Respecto al tipo histológico, los 34 (100%) casos fueron carcinoma invasor de tipo no especial (ductal). Respecto al grado histológico, 13 (38.23%) de los casos fueron grado 1; 15 (44.11%) grado 2 y 6 grado 3 (17.64%) como se ilustra en la FIGURA 16.

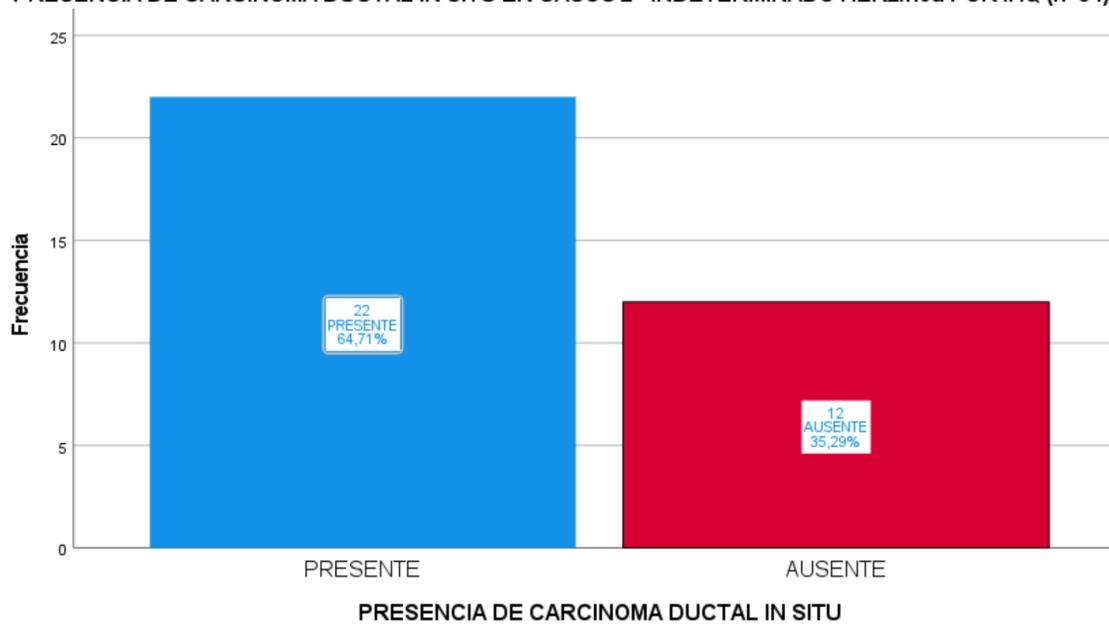


Fuente: Base de datos

FIGURA 16: Clasificación por Grado Histológico en porcentaje de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

En 24 (64.7%) de los casos se demostró la presencia de carcinoma ductal in situ FIGURA 17, mientras que en 12 (35.3%) se demostró la presencia de invasión linfovascular FIGURA 18.

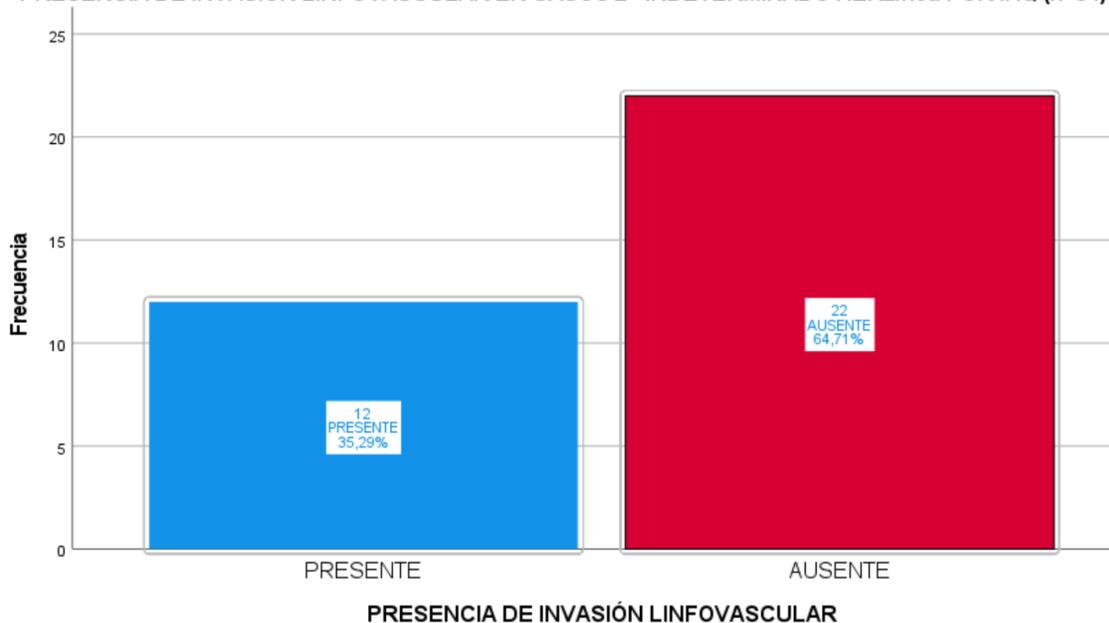
PRESENCIA DE CARCINOMA DUCTAL IN SITU EN CASOS 2+ INDETERMINADO HER2/neu POR IHQ (n=34)



Fuente: Base de datos

FIGURA 17: Número de casos y porcentaje de casos con carcinoma ductal in situ de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

PRESENCIA DE INVASIÓN LINFOVASCULAR EN CASOS 2+ INDETERMINADO HER2/neu POR IHQ (n=34)

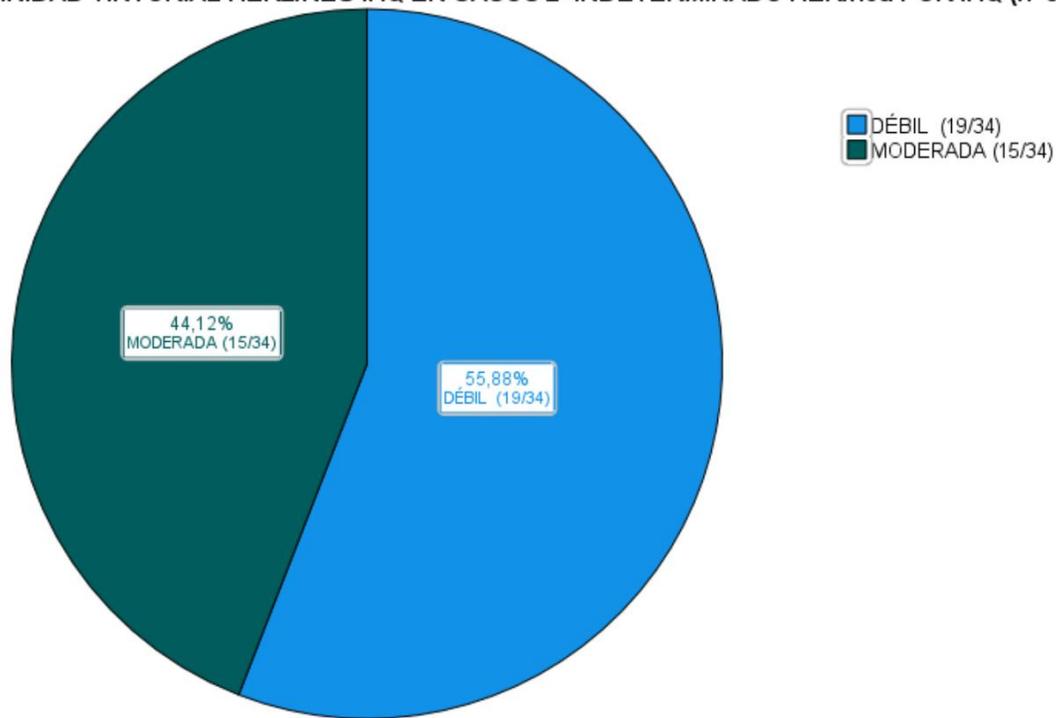


Fuente: Base de datos

FIGURA 18: Número de casos y porcentaje de casos con invasión linfovascular de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

Respecto a la evaluación de sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ, 19 (56%) de los casos tuvieron una afinidad tintorial débil y 15 (44%) una afinidad tintorial moderada como se ilustra en la FIGURA 19. La media de porcentaje de células teñidas fue de 23+-10.5%, con un rango de 10 a 50%.

AFINIDAD TINTORIAL HER2/NEU IHQ EN CASOS 2+INDETERMINADO HER/neu POR IHQ (n=34)

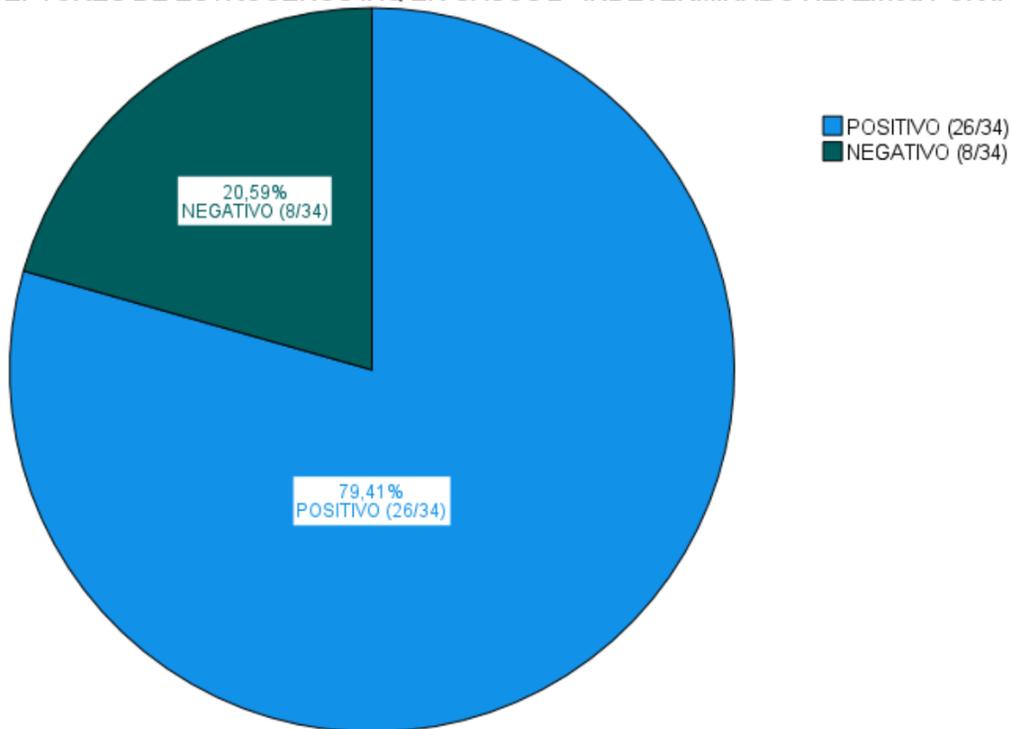


Fuente: Base de datos

FIGURA 19: Clasificación por Afinidad tintorial para HER2/neu por método de IHQ expresado en porcentaje de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

Respecto a la evaluación de expresión de receptores de estrógenos y progesterona por método de IHQ, 26 (76%) de los 34 casos fueron positivos para receptores de estrógenos como se muestra en la FIGURA 20, y 21 casos (61%) para receptores de progesterona como se muestra en la FIGURA 21.

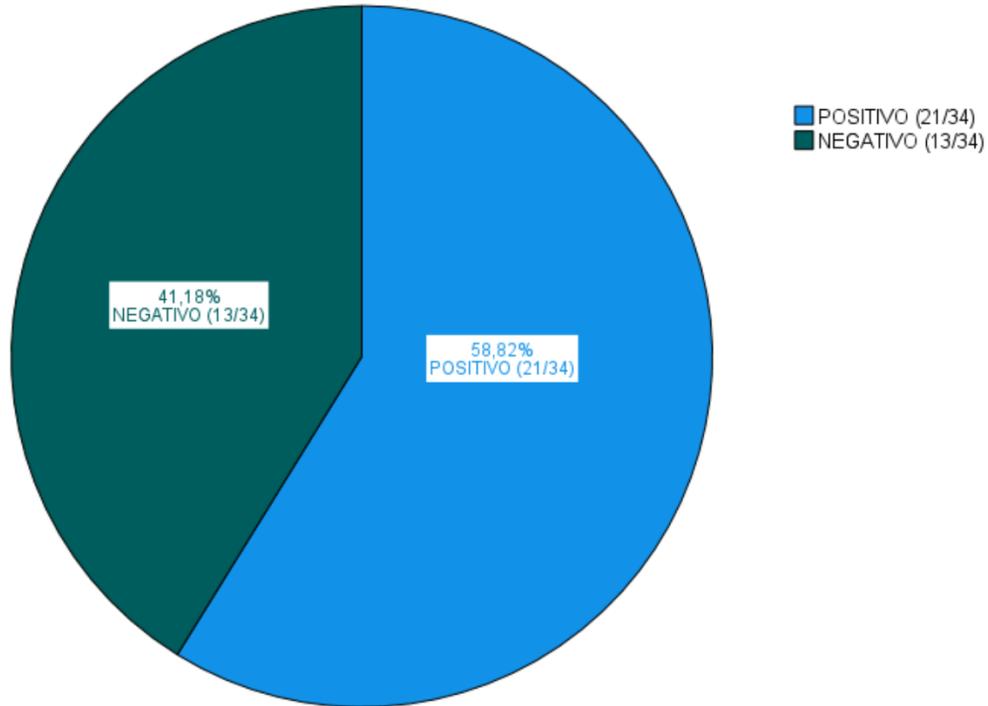
RECEPTORES DE ESTRÓGENOS IHQ EN CASOS 2+ INDETERMINADO HER2/neu POR IHQ (n=34)



Fuente: Base de datos

FIGURA 20: Clasificación por expresión de receptores de estrógenos por método de IHQ expresados en porcentaje de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

RECEPTORES DE PROGESTERONA IHQ EN CASOS 2+ INDETERMINADO HER2/neu POR IHQ (n=34)



Fuente: Base de datos

FIGURA 21: Clasificación por expresión de receptores de progesterona por método de IHQ expresados en porcentaje de los casos categorizados como 2+ indeterminado para HER2/neu por método IHQ.

Respecto a la evaluación de expresión de proteína Ki-67 por método de IHQ, 34 (100%) de los casos fueron positivos, con un porcentaje de células TEÑIDAS media de 17.05+- 10% y un rango de entre 5 al 50%.

En los casos categorizados como 2+ indeterminado para sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ con sobreexpresión de HER2/neu positiva por método FISH la edad promedio de las pacientes fue de 43.8 años, con un rango de 33 a 57 años. El tamaño promedio del tumor fue de 3 cm, con un rango de 1.5 cm a 4.7 cm. 5 (31.25%) de los 16 casos fueron estadio TNM

IA, 9 (56.25%) estadio TNM IIA y 2 (12.5%) estadio TNM IIB. 16 (100%) de los 16 casos fueron de tipo histológico carcinoma invasor de tipo no especial (ductal). Respecto al grado histológico, 4 (25%) de los 16 casos fueron grado 1, 12 (75%) fueron grado 2. 11 (68.75%) de los 16 casos tuvieron carcinoma ductal in situ, y 4 (25%) tuvieron presencia de invasión linfovascular. En la evaluación de sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ, 1 (6.25%) de los 16 casos mostró afinidad tintorial débil, y 15 (93.75%) afinidad tintorial moderada. El promedio de porcentaje de células con reactividad tintorial fue de 26.88 %. Respecto a la evaluación de expresión de receptores de estrógenos y progesterona por método de IHQ, 14 (87.5%) de los 16 casos fueron positivos a receptores de estrógenos, y 10 (62.5%) de los 16 casos fueron positivos a receptores de progesterona. En la evaluación de expresión de proteína Ki-67 por método de IHQ, 16 (100%) de los 16 casos fueron positivos, con un promedio de porcentaje de células del 14%.

En los casos categorizados como 2+ indeterminado para sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ con sobreexpresión de HER2/neu negativa por método FISH la edad promedio de las pacientes fue de 45.7 años, con un rango de 29 a 57 años. El tamaño promedio del tumor fue de 2.9 cm, con un rango de 1.4 cm a 4.5 cm. 3 (16.66%) de los 18 casos fueron estadio TNM IA, 10 (55.55%) estadio TNM IIA y 5 (27.77%) estadio TNM IIB. 18 (100%) de los 18 casos fueron de tipo histológico carcinoma invasor de tipo no especial (ductal). Respecto al grado histológico, 9 (50%) de los 18 casos fueron grado 1, 3 (17%) fueron grado 2 y 6 fueron grado 3 (33%). 11 (61.11%) de los 18 casos tuvieron presencia de carcinoma ductal in situ, y 8 (44.44%) tuvieron presencia de invasión linfovascular. En la evaluación de sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ, 18 (100%) de los 18 casos mostró afinidad tintorial moderada. El promedio de porcentaje de células con reactividad tintorial fue de 21.1 %. Respecto a la evaluación de expresión de receptores de estrógenos y progesterona por método de IHQ, 12 (66.66%) de los 18 casos fueron positivos a receptores de estrógenos, y 11 (61.11%) de los 18 casos fueron positivos a receptores de progesterona. En la evaluación de

expresión de proteína Ki-67 por método de IHQ, 18 (100%) de los 18 casos fueron positivos, con un promedio de porcentaje de células del 19%.

La TABLA 2 muestra la comparación pareada de variables para resultado POSITIVO o NEGATIVO en sobreexpresión de HER2/neu por método FISH.

**TABLA 2: CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS 2+ INDETERMINADO PARA HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ POR SOBREENPRESIÓN DE HER2/neu POR MÉTODO FISH**

CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS 2+ INDETERMINADO PARA HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ POR SOBREENPRESIÓN DE HER2/neu POR MÉTODO FISH (N=34)			
	<b>SOBREENPRESIÓN DE HER2/neu POSITIVA por FISH (n=16)</b>	<b>SOBREENPRESIÓN DE HER2/neu NEGATIVA por FISH (n=18)</b>	Valor p
<b>SEXO +</b>	Femenino 100% (16/16)	Femenino 100% (18/18)	0.188
<b>EDAD *</b>	Media 43.81 ± 7 años	Media 45.72 ± 9 años	0.5
<b>TIPO DE BIOPSIA +</b>	Biopsia con aguja de corte: 100% (16/16)	Biopsia con aguja de corte: 94% (15/16) Biopsia excisional: 6% (1/16)	
<b>ESTADIO TNM CLÍNICO +</b>	Estadio IA 31.25% (5/16) Estadio IIA 56.25% (9/16) Estadio IIB 12.5% (2/16)	Estadio IA 16.66% (3/18) Estadio IIA 55.55% (10/18) Estadio IIB 27.77% (5/18)	0.422
<b>TAMAÑO DEL TUMOR*</b>	2.78 ± 1 cm	3.17 ± 0.9 cm	0.272
<b>TIPO HISTOLÓGICO+</b>	Carcinoma invasor de tipo no especial 100% (16/16)	Carcinoma invasor de tipo no especial 100% (18/18)	0.188
<b>GRADO HISTOLÓGICO+</b>	Grado 1 25% (4/16) Grado 2 75% (12/16) Grado 3 0% (0/16)	Grado 1 50% (9/18) Grado 2 16.66% (3/18) Grado 3 33.33% (6/18)	0.259
<b>PRESENCIA DE CARCINOMA DUCTAL IN SITU +</b>	68.75% (11/16)	61.11% (11/18)	0.642
<b>PRESENCIA DE INVASIÓN LINFOVASCULAR+</b>	25% (4/16)	44.44% (8/18)	0.236
<b>AFINIDAD TINTORIAL EN HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ +</b>	DÉBIL 6.25% (1/16) MODERADA 93.75% (15/16)	DÉBIL 100% (18/18) MODERADA 0% (0/18)	< 0.001
<b>PORCENTAJE DE CÉLULAS TEÑIDAS EN HER2/neu POR MÉTODO DE IHQ *</b>	Media 26.56 ± 8.89 %	Media 20 ± 11.24 %	0.071
<b>PRESENCIA DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS POR MÉTODO DE IHQ +</b>	87.5% (14/16)	66.66% (12/18)	0.271
<b>PRESENCIA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA POR MÉTODO DE IHQ +</b>	62.5% (10/16)	61.11 (11/18)	0.774
<b>EXPRESIÓN DE PROTEÍNA KI-67 POR MÉTODO DE IHQ +</b>	100% (16/16)	100% (18/18)	0.188
<b>PORCENTAJE DE CÉLULAS CON EXPRESIÓN DE PROTEÍNA KI-67 POR MÉTODO DE IHQ *</b>	Media 14.69 ± 6.45 %	Media 19.17 ± 12.227 %	0.201

Fuente: Base de datos.

\*Datos expresados en media y desviación estándar. Prueba T de Student.

+Datos expresados en porcentaje. Prueba Chi cuadrada.

La AFINIDAD TINTORIAL de HER2/neu por IHQ fue la única variable con diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.001$ ). No hubo diferencia significativa las variables de edad ( $p 0.5$ ), en el tamaño del tumor ( $p 0.272$ ), en el estadio TNM clínico ( $p 0.422$ ), grado histológico ( $p 0.259$ ), presencia de carcinoma ductal in situ ( $p 0.216$ ), presencia de invasión linfovascular ( $p 0.236$ ), porcentaje de células teñidas HER2/neu por IHQ ( $p 0.71$ ), presencia de receptores de estrógenos ( $p 0.271$ ) y progesterona ( $p 0.083$ ) por IHQ, ni en porcentaje de células con expresión de Ki-67 por IHQ ( $p 0.201$ ).

## DISCUSIÓN

Se realizó estudio retrospectivo, observacional, descriptivo y analítico en casos de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama con evaluación HER2/neu categorizados 2+ indeterminado por método de IHQ en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” con el objetivo de conocer la incidencia de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH.

Se incluyeron 35 casos en un período de Enero 2015 a Enero 2019, de los cuales se eliminó 1 caso por no contar con resultado de sobreexpresión de HER2/neu por método FISH.

Respecto al objetivo general del estudio, se encontró que en 16 (47%) de los 34 casos se confirmó sobreexpresión de HER2/neu positiva y en 18 (53%) negativa por método FISH; lo que ubica el rendimiento de la evaluación de los casos categorizados como 2+ indeterminado por método de IHQ en el departamento de Anatomía Patológica de Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” dentro de los estándares internacionales de tasa de confirmación de sobreexpresión de HER2/neu en  $50\pm 15\%$  de los casos por método FISH según lo propuesto por Wolff AC et al. en las guías del Colegio de Patólogos Americanos.

Respecto a los objetivos específicos, los 34 casos analizados fueron de sexo femenino. La edad promedio fue de 44 años, con una media de  $44.82 \pm 8$  años. El grupo etario más prevalente fue de 40 a 44 años. La edad media en el grupo de pacientes de este estudio es 10 años menor que el reportado por el Departamento de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México en 2018. El estadio TNM clínico más prevalente fue el IIA con 19 (55%) de los 34 casos, seguido del estadio IA con 7(21%) casos y por último el estadio IIB con 8 (24%) casos. Respecto al tamaño del tumor, el promedio fue de 3 cm con un rango que oscila entre 1.4cm y 4.7 cm. En 26 (76%) de los 34

casos el tamaño del tumor igual o menor a 2 cm (T1 en la clasificación TNM) mientras que 8 (24%) casos tuvieron una medida de entre 2.1 y 5 cm (T2 en la clasificación TNM). Dichos resultados concuerdan con la epidemiología de la encuesta GLOBOCAN del estadio TNM clínico al momento del diagnóstico de los pacientes con cáncer de mama reportados por Bray et al. En 33 (97%) de los 34 casos analizados se le practicó biopsia con aguja de corte, y sólo en 1 (3%) se practicó biopsia excisional, en concordancia con las guías de abordaje diagnóstico propuestas por Cárdenas Sánchez et al en el Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. 34 (100%) de los casos analizados fueron de tipo histológico carcinoma invasor de tipo no especial (ductal) en concordancia con el tipo histológico más frecuente reportado por Gómez-Dantes et al. En consideración a este hallazgo, Wolff et al en las Guías de Práctica Clínica del Colegio de Patólogos Americanos sostiene que no hay un consenso respecto a la necesidad de evaluar la sobreexpresión de proteína HER2/neu en otros tipo histológicos de cáncer de mama. El grado histológico más prevalente fue el grado histológico 2, con 15 (44%) de los 34 casos, seguido del grado 1 con 13 (38%) casos, y por último el grado 3 con sólo 6 (18%) casos. Hay concordancia en la mayor prevalencia del grado histológico 2 del grupo estudiado respecto a la prevalencia general de los carcinomas invasores de tipo no especial, acorde con lo reportado por Lakhani et al en la Clasificación de Tumores de Mama de la Organización Mundial de la Salud y por un estudio de significado pronóstico del grado histológico dirigido por Rakha et al. La presencia de carcinoma ductal in situ se demostró en 22 (65%) de los 34 casos analizados en este estudio. El mayor porcentaje de asociación entre carcinoma invasor de tipo no especial (ductal) y carcinoma ductal in situ es de hasta el 80% según Parikh, sin embargo no representa un factor de impacto demostrado en la sobrevida de los pacientes en un análisis de casos dirigido por Groen et al. El carcinoma ductal in situ toma relevancia en consideración un margen quirúrgico recomendado más amplio en los pacientes que son sometidos a tratamiento quirúrgico en tumorectomías,

cuadrantectomías o mastectomías, según las recomendaciones hechas Cárdenas Sánchez et al en el Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. La presencia de invasión linfovascular se demostró en 12 (35%) de los 34 casos, similar al 30% reportado por Hasebe et al en una serie de 1044 casos. Aunque la invasión linfovascular se ha asociado hasta en un 50% con metástasis a ganglios linfáticos, por si sola constituye un factor pronóstico independiente de recurrencia local y a distancia en pacientes con cáncer de mama Lakhani et al en la Clasificación de Tumores de Mama de la Organización Mundial de la Salud. En un 15% de los casos sin metástasis ganglionar se identifica invasión linfovascular, según la serie de casos comentada por Hasebe et al. Las guías americanas de decisión clínica de la NCCN consideran esquemas de quimioterapia más prolongados en presencia de invasión linfovascular, independientemente del estado ganglionar.

Respecto a la evaluación de sobreexpresión de HER2/neu por IHQ, 19 (55%) de los 34 casos analizados presentaron afinidad de tinción DÉBIL mientras que 15 (35%) casos presentaron afinidad de tinción MODERADA; el promedio de porcentaje de células neoplásicas con tinción fue de 26.5 %, con un rango entre los 10% y 50%. Dichos parámetros no se encuentran desglosados en ninguno de los estudios revisados. La clasificación actual propuesta por Wolff et al en las Guías de Práctica Clínica del Colegio de Patólogos Americanos adoptada por Cárdenas Sánchez et al en el Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario no define de manera precisa los conceptos de afinidad tintorial DÉBIL y MODERADA, y es susceptible a estudios de análisis de concordancia interobservador según lo reportado en un estudio por Castera Redal et al. Sin embargo, en este mismo estudio, dicha clasificación muestra un rendimiento adecuado al incluir una definición concisa en la categoría 3+: Más del 10% de las células neoplásicas con tinción de membrana completa. En la evaluación de la presencia de receptores de estrógenos y progesterona por IHQ, 26 (76.5%) de los 34 casos analizados en este estudio fueron positivos a receptores de

estrógenos, y 21 (62%) de los 34 casos fueron positivos a receptores de progesterona, resultados similares a los observados en la revisión de Rakha EA et al. Como dicta la biología molecular de dichos receptores en la misma revisión de Rakha EA et al, no hubo ningún caso en el que se expresara receptor de progesterona sin receptor de estrógenos. Respecto a la evaluación de la expresión de proteína Ki-67 por método de IHQ, el total de los 34 casos fueron positivos, con una tasa promedio de 17%, lo que ubica al grupo de estudio en una tasa de proliferación baja de acuerdo al punto de corte de 20% considerado en el Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario.

En el análisis pareado de los grupos con sobreexpresión de HER2/neu positiva o negativa por método FISH, se encontraron diferencias significativas en el estadio TNM IA y IIB. 5 (31%) de los 16 casos con sobreexpresión HER2/neu positiva por método FISH fueron estadio IA, en comparación con 3 (17%) de los 18 casos con sobreexpresión HER2/neu negativa por método FISH. En 2 (12.5%) de los 16 casos sobreexpresión HER2/neu positiva por método FISH el estadio TNM fue IIB, en comparación con los 5 (28%) de los 18 casos con sobreexpresión HER2/neu negativa por método FISH. También se encontraron diferencias en el grado histológico. De los 16 casos con sobreexpresión HER2/neu positiva por método FISH, el grado histológico más prevalente fue el grado 2 con 12 (75%) casos, seguido por el grado 1 con 4 (25%). No se identificó ningún grado 3. De los 18 casos con sobreexpresión HER2/neu negativa por método FISH, el grado histológico más prevalente fue el grado 1 con 9 (50%) casos, seguido por el grado 3 con (34%) y por último el grado 2, con sólo 3 (16%) casos. Respecto a la presencia de invasión linfovascular, fue más prevalente en el grupo con sobreexpresión HER2/neu negativa por método FISH, con 8 (44%) de los 18 casos; en comparación con los 4 (25%) de los 16 casos con sobreexpresión HER2/neu positiva por método FISH. En la evaluación de HER2/neu por método de IHQ, la afinidad tintorial DÉBIL se identificó en sólo 1 (6%) de los 16 casos con sobreexpresión HER2/neu positiva por método FISH en

comparación con los 18(100%) casos con sobreexpresión HER2/neu negativa por método FISH. La afinidad tintorial MODERADA se identificó en 15 (94%) de los 16 casos con sobreexpresión HER2/neu positiva por método FISH, mientras que no se identificó en los casos con sobreexpresión HER2/neu negativa por método FISH.

No hubo diferencia significativa entre los grupos con sobreexpresión HER2/neu positiva y negativa por método FISH en la edad, el tamaño del tumor, la presencia de carcinoma ductal in situ, porcentaje de células en IHQ para HER2/neu, expresión de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y de proteína Ki-67.

Como se comentó en el inicio de la discusión, la diferencia no significativa en una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica coloca al departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” dentro de los estándares nacionales e internacionales de calidad para el uso juicioso de los recursos en la detección de sobreexpresión de proteína HER2/neu.

Los resultados en el análisis pareado de grupos con sobreexpresión HER2/neu positiva y negativa por método FISH abren nuevas líneas de investigación para complementar la clasificación en la detección de sobreexpresión de HER2/neu por método de IHQ en las que se incluyan parámetros como estadio TNM clínico y grado histológico; y redefinir la necesidad de excluir un punto de corte en el porcentaje de células teñidas.

En base a estos resultados, se confirma la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, puesto que existe una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en

carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica

## CONCLUSIONES

Existe una sobreexpresión positiva del 47% de la proteína HER-2/neu detectada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en carcinoma de mama con resultado 2+ indeterminado HER-2/neu por inmunohistoquímica en los casos analizados en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”, lo que ubica el rendimiento dentro de los estándares de calidad para uso juicioso de recursos.

El total de casos analizados correspondieron a sexo femenino. La edad promedio fue de  $44.82 \pm 8$  años. Los grados de la clasificación TNM se distribuyeron de la siguiente manera: IA: 23.5%, IIA: 55.9%, IIB: 20.6%. La media del tamaño de los tumores fue de  $3 \pm 0.9$  cm. El 100% de los casos correspondieron a tipo histológico carcinoma invasor de tipo no especial (ductal). Los grados histológicos se distribuyeron de la siguiente manera: Grado 1 38.2%, Grado 2: 44.1% y Grado 3: 17.6%. La frecuencia de carcinoma ductal in situ fue de 64.7%. La frecuencia de invasión linfovascular fue de 35.3%. En este grupo de estudio, no hay diferencia en la incidencia de estas características respecto a las reportadas en los casos generales de cáncer de mama.

En la evaluación de las características inmunohistoquímicas de HER2/neu, La afinidad tintorial por inmunohistoquímica HER2 fue débil en 55.9% y moderada en 44.1%, con un porcentaje promedio de células teñidas de 26.5%. La presencia de receptores de estrógenos fue positiva en 79.4% y de progesterona en 58.8%. El 100% de los casos expresaron proteína Ki-67, con una porcentaje promedio de células reactivas del 17%. Tampoco hay diferencia en la incidencia de estas características inmunohistoquímicas respecto a las reportadas en los casos generales de cáncer de mama.

## REFERENCIAS

- 1.- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin* 2018; 68 (1): 394-424.
- 2.- Secretaría de Salud Epidemiología. Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación Estados Unidos Mexicanos 2018 Población General(internet). (Consultado 1 Enero 2020). Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2018/morbilidad/nacional/distribucion\\_casos\\_nuevos\\_enfermedad\\_fuente\\_notificacion.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2018/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_fuente_notificacion.pdf)
- 3.- Secretaría de Salud Programa Cáncer de la Mujer. Defunciones de mujeres de 25 años y más por tumor maligno de mama, 2000-2015 (internet). (Consultado 1 Enero 2020). Disponible en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269549/MortalidadCaMa2000a2015.pdf>
- 4.- Gomez-Dantes H, Lamadrid-Figueroa H, Cahuana- Hurtado L, et al. The Burden of Cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Pub Mex.* 2016;58 (5):118-131.
- 5.- Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathol.* 2017; 49 (2): 111-119.
- 6.- Ross JS , Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9(2):125-38.
- 7.- Oto D, Brandes AA, Cucchi MC, Foschini MP. Prognostic impact of HER-2 Subclonal Amplification in breast cancer. *Virchow Archiv.* 2017; 47 (3): 313-319-
- 8.- Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 1999;112(1 Suppl 1):53-67.

- 9.- de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, Holmes E, Di Cosimo S, Swaby RF, Untch M et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO). *Lancet Oncol.* 2014; 15(10):1137-46.
- 10.- Cárdenas Sánchez J, Lluch Hernández A, Erazo Valle-Solis AA, Maffuz Aziz A, Arce Salinas C, Pérez Sánchez VM, et al. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. 8va ed. Colima: Elsevier; 2019.
- 11.- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(11):1364-1382.
- 12.- Laudadio J, Quigley DI, Tubbs R, Wolff DJ. HER2 testing: a review of detection methodologies and their clinical performance; *Expert Rev Mol Diagn.* 2007; 7(1):53-64.
- 13.- Zhang H, Ren G, Wang X. Her-2 gene amplification by FISH compared with IHC in breast cancer: a study of 528 equivocal cases. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(2):743-749.
- 14.- Casterá C, Bernet L. HER2 immunohistochemistry inter-observer reproducibility in 205 cases of invasive breast carcinoma additionally tested by ISH. *Ann Diagn Pathol.* 2019; 17;45:151451.
- 15.- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature.* 1986;319:226-230.
- 16.- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230:1132-1139.
- 17.- Brandt-Rauf PW, Monaco R, Pincus MR. Conformation of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *J Protein Chem.* 1994;13:227-231.

- 18.- Gullick WJ, Bottomley AC, Lofts FJ. Three dimensional structure of the transmembrane región of the proto-oncogenic and oncogenic forms of the neu protein. *EMBO J.* 1992;11:43-48.
- 19.- Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Canc.* 2012;12:553-563.
- 20.- Campbell MR, Amin D, Moasser MM. HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signalling, tumor biology and cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013;73:6024-6035.
- 21.- A Comparison of IHC and FISH Cytogenetic Methods in the Evaluation of HER2 Status in Breast Cancer. *Adv Clin Exp Med.* 2015; 24(5):899-903.
- 22.- Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft’s Theory and practice of histological techniques. 8th ed. Sheffield: Elsevier; 2019.
- 23.- Rüschoff J, Lebeau A, Kreipe H, Sinn P, Gerharz CD, Koch W, et al. Assessing HER2 testing quality in breast cancer: variables that influence HER2 positivity rate from a large, multicenter, observational study in Germany . *Mod Pathol.* 2017; 30(2):217-226.
- 24.-Kuo SJ, Wang BB, Chang CS, Chen TH, Yeh KT, Lee DJ, Yin PL, Chen M. Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment for HER-2/neu status in Taiwanese breast cancer patients. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007; 46(2):146-51.
- 25.- Mostafa NA, Eissa SS, Belal DM, Shoman SH. Assessment of Her-2neu gene amplification status in breast carcinoma with equivocal 2+ Her-2neu immunostaining; *J Egypt Natl Canc Inst.* 2011;23(1):41-46.
- 26.-Varga Z, Noske A, Ramach C, Padberg B, Moch H. Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. *BMC Cancer.* 2013; 13: 615-630.
- 27.- Goud KI, Dayakar S, Vijayalaxmi K, Babu SJ, Reddy PV. Evaluation of HER-2/neu status in breast cancer specimens using

immunohistochemistry (IHC) & fluorescence in-situ hybridization (FISH) assay. Indian J Med Res. 2012; 135: 312-317.

28.- Eswarachary V,<sup>1</sup> Mohammed IG,<sup>2</sup> Jayanna PK. HER2neu Testing In 432 Consecutive Breast Cancer Cases using FISH and IHC - A Comparative Study . J Clin Diagn Res. 2017; 11(4): 1-5.

29.- Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2neu testing in breast carcinoma a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. Mod Pathol. 2000;13(8): 866-873.

30.- Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. 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(5): 374-381.

31.- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2 neu oncogene. Scienc. 1987; 235 (1): 177-182.

32.- Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab vs. neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. Lancet. 2010; 375: 377-384.

33.- Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. J Clin Oncol. 2011;29:3351-3357.

34.- Untch M, Rezai M, Loibl S, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2 positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. J Clin Oncol. 2010;28:2024-2031.

35.- McKeag, K, Perry CM Trastuzumab. Drugs. 2002; 62:209-243.

- 36.- Brian Leyland-Jones. Trastuzumab: hopes and realities. *The Lancet Oncology*.2002; 137-144.
- 37.- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, et al. WHO Classification of tumours of the breast. 3ra ed. IARC/WHO; 2012.
- 38.- Hasebe T, Imoto S, Yokose T, Ishii G, Iwasaki M, Wada N. Histopathologic factors significantly associated with initial organ-specific metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective study. *Hum Pathol*. 2008 May;39(5):681-93.
- 39.- Pastorello RG, Laws A, Grossmith S, King C, McGrath M, Mittendorf EA, King TA, Schnitt SJ. Clinico-pathologic predictors of patterns of residual disease following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mod Pathol*. 2020 Nov 20.
- 40.- Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015 Dec 21;8:23-31.
- 41.- Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208.
- 42.-Rakha EA, El-Sayed ME, Elston CW. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol* 26:3153-3158.
- 43.- Protocol for the Examination of Biopsy Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. College of American Pathologist. (internet) (consultado el de Enero del 2020) Disponible en:  
<https://documents.cap.org/protocols/cp-breast-invasive-biopsy-20-1100.pdf>
- 44.- Groen EJ, Elshof LE, Visser LL, Rutgers EJT, Winter-Warnars HAO, Lips EH, Wesseling J. Finding the balance between over- and under-treatment of ductal carcinoma in situ (DCIS). *Breast*. 2017 Feb;31:274-283.
- 45.- Parikh U, Chhor CM, Mercado CL. Ductal Carcinoma In Situ: The Whole Truth. *AJR Am J Roentgenol*. 2018 Feb;210(2):246-255.
- 46.- Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Raica M. Invasive ductal carcinoma of no special type and its corresponding lymph

node metastasis: do they have the same immunophenotypic profile? Pol J Pathol. 2015 Mar; 66(1):30-7.

## ANEXOS

Formulario de llenado de datos.

<b>EDAD:</b>		<b>SEXO:</b>	
<b>NO. EXPEDIENTE:</b>			
<b>FECHA DE INTERPRETACIÓN H&amp;E:</b>			
ESTADIO TNM CLÍNICO:			
TAMAÑO DEL TUMOR:			
TIPO DE ESPECÍMEN:	INCISIONAL		
	EXCISIONAL		
	MASTECTOMÍA		
TIPO HISTOLÓGICO			
GRADO HISTOLÓGICO	GRADO 1		
	GRADO 2		
	GRADO 3		
CARCINOMA DUCTAL IN SITU	PRESENTE		
	AUSENTE		
INVASIÓN LINFOVASCULAR	PRESENTE		
	AUSENTE		
<b>FECHA INTERPRETACIÓN IHQ:</b>			
IHQ HER2/NEU:	AFINIDAD TINTORIAL		
	PORCENTAJE DE CÉLULAS		
EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO	POSITIVO		
	NEGATIVO		
EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA	POSITIVO		
	NEGATIVO		
Ki-67	POSITIVO (%)		
	NEGATIVO		
<b>FECHA INTERPRETACIÓN FISH:</b>			
RESULTADO FISH DE SOBREENPRESIÓN HER2/NEU	POSITIVO		
	NEGATIVO		
<b>COMENTARIOS:</b>			