

# CARCINOMA DA MAMA

## Determinação da Amplificação do HER2 por Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH)

SAUDADE ANDRÉ, ANA RAQUEL TOMÁS, RICARDO FONSECA

Serviço de Anatomia Patológica. Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, S.A. Lisboa.

### RESUMO

O conhecimento do *status* do oncogene *HER2/c-erbB-2* no carcinoma da mama é indispensável quando se considera a elegibilidade dos doentes para a terapêutica com o anticorpo monoclonal anti-HER2/trastuzumab. Das várias técnicas existentes para a determinação do *status* do *HER2*, as mais utilizadas são a imunohistoquímica (IHQ), que avalia a expressão proteica do gene, e a hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) que avalia a sua amplificação. A técnica de FISH deve considerar-se complementar da IHQ nos tumores em que a marcação é equívoca ou não interpretável, assim como naqueles em se verifica marcação completa da membrana citoplasmática, com intensidade ligeira a moderada, em >10% das células neoplásicas (*score* 2+), uma vez que se considera que destes, apenas os casos que evidenciem amplificação (positivos por FISH) respondem à terapêutica. Estudos recentes defendem que a técnica de FISH deve também ser utilizada nos casos com *score* 3+, pelo facto de 10-12% destes não demonstrarem amplificação.

Os custos técnicos (equipamento e consumíveis) do método de FISH aliados à necessidade de dispor de profissionais experientes para a sua execução e leitura de resultados, vêm justificando a existência de Centros de Referência. O nosso objectivo é descrever o desempenho do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa como Centro de Referência na execução da técnica de FISH e dar conhecimento dos resultados obtidos no período desde Maio de 2001 a Agosto de 2004. A técnica de FISH foi efectuada com o *Kit* INFORM® HER2/*neu* Gene Detection System, utilizando o sistema BenckMark™ da Ventana®. Foi avaliada uma série de 4499 carcinomas invasivos primários da mama, que inclui 587 casos do Instituto Português de Oncologia de Lisboa e 3912 de diferentes Hospitais de Lisboa, Cascais, Almada, Barreiro, Santarém, Évora, Faro, Portimão, Guimarães, Funchal e Angra do Heroísmo. Verificou-se que 591 casos (13,5%) tinham amplificação do gene HER2, sendo os respectivos doentes elegíveis para a terapêutica com trastuzumab.

*Palavras chave:* Carcinoma da mama, HER2, hibridação *in situ* de fluorescência (FISH).

## SUMMARY

**DETERMINATION OF HER2 BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH) IN BREAST CANCER. EXPERIENCE OF THE REFERENCE LABORATORY OF LISBON**

The knowledge of *HER2/c-erbB-2* status in breast cancer is essential for the eligibility of the patients for therapy with monoclonal antibody anti-HER-2/trastuzumab. From the various existent techniques for the determination of *HER-2*, the most widely used are: immunohistochemistry (IHC), that estimates the protein expression, and *in situ* hybridization (FISH), that evaluates its amplification. FISH is essential as complementary of IHC in tumors with equivocal or non interpreted staining, and also in those with complete weak to moderate membrane staining in >10 % of neoplastic cells (*score 2+*) because, of these, only cases with gene amplification (FISH positive) respond to therapy. Recent studies also support that FISH should be performed in cases with *score 3+*, because 10-12% of them don't have amplification.

The expensive equipment and reagents for standard FISH method and the need of extensive training and expertise for both the technique and the evaluation, justify a centralized testing in Reference Laboratories.

Our aim was to describe the work of the Department of Pathology of the Portuguese Institute of Oncology of Lisbon as a Reference Laboratory in the execution of FISH technique and to present the results obtained from May 2001 to August 2004. FISH was performed with *Kit INFORM® HER2/neu Gene Detection System*, using the *BenckMark™* system of *Ventana®*. We evaluated a series of 4499 invasive carcinoma primary of the breast, that included 587 cases of the Portuguese Institute of Oncology of Lisboa and 3912 cases from different Hospitals of Lisboa, Cascais, Almada, Barreiro, Santarém, Évora, Faro, Portimão, Guimarães, Funchal and Angra do Heroísmo. We verified that 591 cases (13.5%) had *HER2* gene amplification, being those patients eligible for therapy with trastuzumab.

*Key words: Breast cancer, HER2, fluorescence in situ hybridization (FISH).*

## INTRODUÇÃO

O proto-oncogene *c-erbB-2/HER2/neu* está localizado no cromossoma 17 (17q21) e codifica uma glicoproteína transmembranar de 185 kDa com actividade de tirosina cinase que tem funções de receptor de factor de crescimento, estando envolvido na diferenciação, adesão e mobilidade celulares<sup>1</sup>.

A técnica de IHQ avalia a expressão proteica do *HER2* pelo uso de anticorpos que reconhecem o domínio extracelular do receptor do gene, enquanto a pesquisa da amplificação do gene é realizada recorrendo a técnicas de hibridação *in situ*, nomeadamente com fluorescência (FISH). No carcinoma invasivo da mama feminina, a sobre-expressão e/ou amplificação do gene *HER2*, está presente em 15% a 30% dos casos<sup>1</sup>.

O valor predictivo de resposta à terapêutica com antraciclina e drogas anti-estrogénicas, assim com o valor prognóstico em relação à sobrevida global das doentes

da presença de anomalias do *HER2* são controversos<sup>2</sup>. No entanto, como a demonstração da sobre-expressão ou da amplificação é essencial para a terapêutica com o anticorpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab, que tem benefícios clínicos significativos<sup>3</sup>, o *status* de *HER2* deve ser avaliado em todos os carcinomas da mama no momento do diagnóstico ou na recidiva/metastização<sup>4</sup>.

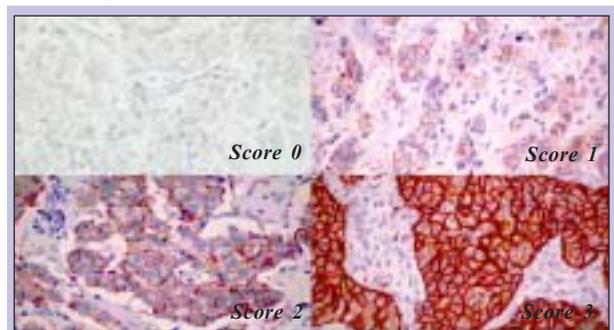
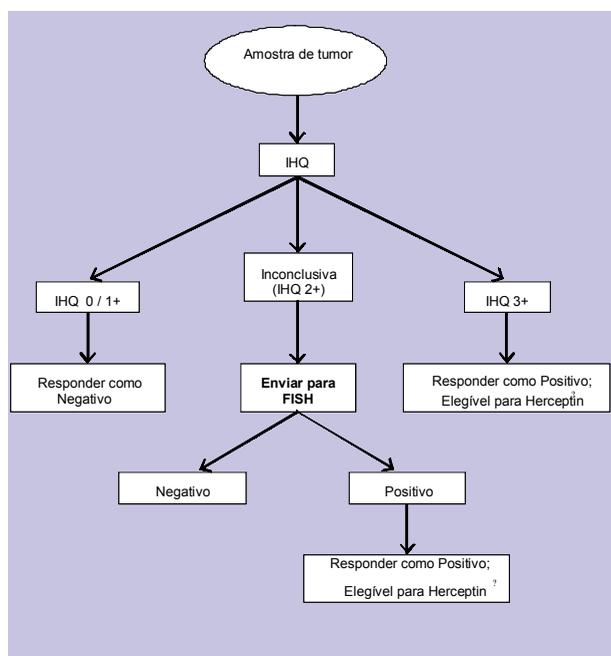


Fig. 1 - Scores de imunohistoquímica

A IHQ é habitualmente a primeira técnica a realizar, sendo possíveis os seguintes resultados (Figura 1): *score* 0 (ausência de marcação da membrana citoplasmática ou marcação <10% das células neoplásicas); *score* 1 (marcação incompleta e de intensidade discreta em >10% das células neoplásicas); *score* 2+ (marcação de intensidade ligeira a moderada, de toda a membrana em > 10% das células neoplásicas); *score* 3+ (marcação intensa de toda a membrana em > 10% das células neoplásicas). Os casos com *score* 0 e 1+ são considerados negativos. Os casos 3+ são positivos, sendo os doentes elegíveis para a terapêutica com trastuzumab. Os casos 2+ necessitam de avaliação subsequente por FISH que determinará se são positivos (com amplificação do gene) ou negativos (sem amplificação do gene), sendo apenas os casos positivos candidatos para a terapêutica com trastuzumab. Este algoritmo, que integra a nossa folha de resposta dos resultados de FISH (Figura 2), é universalmente aceite quando se considera a selecção dos doentes para a terapêutica<sup>4</sup>. O FISH deverá também ser realizado nos casos em que a marcação por IHQ seja equívoca ou não interpretável.

No entanto, estudos mais recentes<sup>2,5-7</sup>, consideram a técnica de FISH a mais precisa e fiável para a determinação do *status* do *HER2* e a que demonstra melhor correlação com o prognóstico e resposta à terapêutica, sendo a técnica de eleição para a determinação do *status* do *HER2*, propondo-se a realização também nos casos com *score* 3+.



Para a realização da técnica de FISH existem actualmente dois métodos aprovados pela FDA (*Food and Drugs*

*Administration*): o *Kit* INFORM<sup>®</sup> *HER2/neu* Gene Detection System, que é um método automatizado que determina o número absoluto de sinais do gene e o PathVysion<sup>™</sup>HER2 DNA Probe kit que contém uma mistura de duas sondas de DNA, a LSI *HER2/neu* para o gene e a sonda centromérica para o cromossoma 17-CEP17.

Neste estudo, analisámos a amplificação do gene *HER2* pela técnica de FISH com o *Kit* INFORM<sup>®</sup> *HER2/neu* Gene Detection System, utilizando o sistema BenckMark<sup>™</sup> da Ventana<sup>®</sup>, numa série de 4499 casos de carcinoma ductal invasivo da mama (feminina e masculina), efectuados de Maio de 2001 a final de Agosto de 2004, com o objectivo de estudar a frequência destas alterações em doentes de diferentes hospitais, de modo a referenciar eventuais candidatos à terapêutica com trastuzumab.

## MATERIAL E MÉTODOS

A série inclui 587 casos do Instituto Português de Oncologia e 3912 casos de diferentes Hospitais da região de Lisboa (Hospital Santo António dos Capuchos, Hospital Curry Cabral, Hospital Militar, Hospital Pulido Valente, Hospital de Santa Cruz, Hospital Egas Moniz, Hospital S. Francisco Xavier, Hospital de Santa Marta, Hospital de São José, Hospital do SAMS, Maternidade Alfredo da Costa, Centro de Patologia Humana, Unidade de Diagnóstico Histológico e Citológico), Cascais (Hospital Conde de Castro Guimarães), Almada (Hospital Garcia de Orta), Barreiro (Hospital Nossa Senhora do Rosário), Hospital Distrital de Santarém, Évora (Hospital Espírito Santo), Hospital Distrital de Faro, Portimão (Hospital do Barlavento Algarvio), Guimarães (Hospital Nossa Senhora da Oliveira), Madeira (Centro Hospitalar do Funchal) e Açores (Hospital de Angra do Heroísmo).

Dos blocos recebidos dos diferentes hospitais é sempre efectuado um corte de hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação da morfologia do tecido neoplásico e da eventual existência e percentagem do componente intraductal. O resultado da determinação do *HER2* por IHQ destes tumores é variado (desde casos negativos a casos com *score* 3+), em alguns não foi efectuada IHQ prévia e, na sua quase totalidade, não havia informação sobre o *score* de IHQ obtido nos hospitais de origem.

O FISH é efectuado no sistema BenckMark<sup>™</sup> da Ventana<sup>®</sup>, utilizando o *Kit* INFORM<sup>®</sup> *HER2/neu* Gene Detection System. Esta é uma técnica automatizada que determina o número absoluto de cópias do gene. O sistema BenckMark<sup>™</sup> da Ventana<sup>®</sup> realiza a desparafinação, tratamento enzimático (Protease 2 da Ventana<sup>®</sup> durante quatro minutos), hibridação com sonda (biotinilada), lavagens

de estringência pós-hibridação e detecção da sonda (por um complexo marcado com FITC - fluoresceína isotiocianato) segundo um protocolo específico de acordo com as características do material biológico. As lâminas são montadas em VECTASHIELD® Mounting Medium com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), e os casos são avaliados usando um microscópio de epifluorescência com filtros específicos. A observação é sempre feita por dois observadores (ART/RF ou ART/SA) a uma ampliação de x630 e/ou x1000. A fluorescência mantém-se durante cerca de quatro meses guardando as lâminas protegidas da luz a -20°C. A duração do programa do sistema BenckMark™ da Ventana® é de 16h30m.

Na leitura das lâminas é contado o número de sinais fluorescentes presentes em 60 núcleos não sobrepostos, aleatoriamente escolhidos em pelo menos duas áreas diferentes na mesma secção. A amplificação é registada com um valor absoluto. Casos com número médio de cópias do *HER2*/célula <4 são classificados como não amplificados (negativos) e casos com número médio de cópias do *HER2*/célula >4 são referidos como amplificados (positivos) (Figura 3).

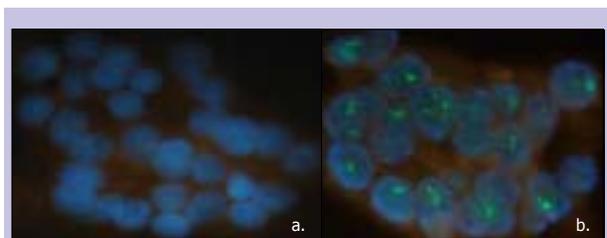


Fig. 3 – Observação da amplificação do gene (FISH)  
A - caso negativo B - caso amplificado

## RESULTADOS

Entre Maio de 2001 e fim de Agosto de 2004, foi avaliada uma série de 4499 casos de carcinoma da mama, que incluem 587 casos do Instituto Português de Oncologia e 3912 casos de diferentes Hospitais de País. Dos casos recebidos de diferentes Hospitais, 126 casos (3,2%) foram excluídos por o bloco de parafina recebido não incluir tecido neoplásico ou não conter quantidade de carcinoma invasivo suficiente para uma avaliação fiável.

Dos 4373 casos em que se avaliou o *status* do *c-erbB-2/HER2* pela técnica de FISH, foi observada amplificação do gene em 591 casos (13,5%), enquanto que 3782 (86,5%) foram considerados negativos (Figura 3), ou seja, a excluir para eventual terapêutica com trastuzumab.

O número de casos/ano e as percentagens de casos amplificados e negativos estão representados nas figuras 4 e 5, respectivamente.

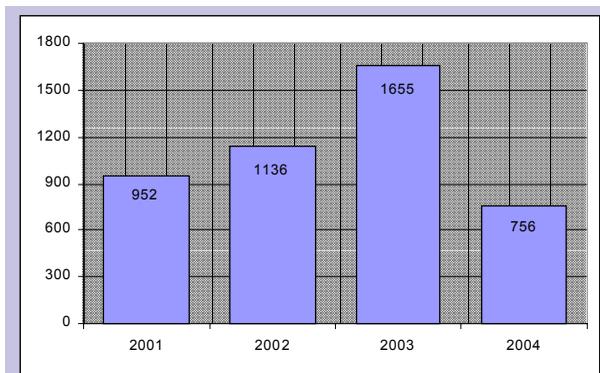


Fig. 4 – Número de casos/ano

No ano de 2004, apenas se considera neste gráfico o número de casos avaliados até ao final do mês de Agosto.

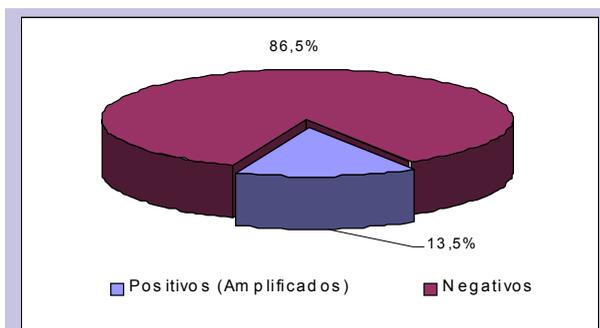


Fig. 5 – Resultados da técnica FISH

## DISCUSSÃO

No carcinoma da mama, o nível de sobre-expressão ou de amplificação de *HER2* correlaciona-se com o benefício clínico da terapêutica com trastuzumab e o conhecimento do *status* deste oncogene é indispensável quando se considera a elegibilidade dos doentes para esta terapêutica.

A técnica mais comum de pesquisa do *status* do *HER2* e a primeira a realizar é a IHQ, que avalia a sobre-expressão proteica do gene, e permite excluir os casos negativos, ou seja, sem anomalias do gene. No entanto, a não uniformização da técnica de IHQ, com a consequente diferença entre a sensibilidade e especificidade dos vários anticorpos utilizados, entre os diversos procedimentos de recuperação antigénica e entre as diluições do anticorpo, associada a alguma subjectividade de leitura dos resultados, acarretam a este método uma variabilidade intra e inter-institucional, responsável por alguma amplitude na percentagem de carcinomas invasivos positivos, refe-

rida na literatura como variando entre 15 a 30%<sup>1,4</sup>.

Está descrita como sendo < 25% a percentagem de casos 2+ amplificados por FISH, o que contrasta com uma amplificação > 90% dos casos IHQ 3+<sup>4</sup>. Este facto justifica que nos casos 2+, a selecção de doentes para terapêutica com trastuzumab deva ser obrigatoriamente precedida da verificação da amplificação do gene *HER2* com FISH, assim como nos casos em que a marcação for equívoca ou não interpretável<sup>4</sup>.

A técnica de FISH é considerada a mais rigorosa e segura para a determinação do *status* do *HER2* e a que demonstra melhor correlação com o prognóstico e resposta à terapêutica<sup>2,5-7</sup>. É a técnica menos afectada por factores pré-analíticos, dado o DNA ser mais resistente do que a proteína nos casos fixados. No entanto, uma digestão enzimática insuficiente não permite a penetração da sonda no núcleo e uma digestão enzimática excessiva destrói a integridade nuclear, podendo ambas resultar na ausência de sinal.

Por outro lado, embora a interpretação do FISH seja menos subjectiva que a IHQ e a variação interobservador seja muito menor<sup>8</sup>, existe subjectividade pela heterogeneidade do sinal, identificação problemática de áreas invasivas *versus* componente inductal e de casos *borderline* (*score* 4 - 6 com o método Ventana ou *ratios* de 1.8-2.2 pelo método Pathvysion). Recomenda-se que os casos equívocos ou não interpretáveis sejam reavaliados por IHQ e que o resultado tenha em conta as duas técnicas, assim como as características morfológicas/anátomo-patológicas das neoplasias<sup>4</sup>. É portanto necessário que a leitura seja efectuada por profissionais com bastante treino, que incluam um anátomo-patologista com experiência em patologia mamária<sup>9</sup>.

Alguns casos (10-12%) com sobre-expressão proteica inequívoca do *HER2* em IHQ (3+) não apresentam amplificação do gene por FISH. Este facto determina que alguns autores<sup>5,6</sup> considerem que, também nos casos 3+, o FISH deva ser a técnica de escolha para a determinação do *status real* do *HER2*.

A existência de casos 3+ sem amplificação do gene tem sido atribuída à falsa positividade da técnica de IHQ, à subjectividade da avaliação da intensidade da marcação, ou pode relacionar-se com algum tipo de regulação da transcrição ou pós transcripcional. Lal *et al*<sup>10</sup> sugeriu uma outra explicação para este facto: aneuploidias ou polissomias do cromossoma 17, descritas em percentagem variada no carcinoma da mama. Este autor justifica que um pequeno aumento do número de cópias do *HER2* se possa dever a um aumento do número de cromossomas

17 (polissomia) sem aumento do número (amplificação) de cópias do gene *HER2* por cromossoma. Este aumento do número de cópias do *HER2* resultaria, em alguns casos, num aumento da produção de proteína HER-2 com intensidade ao ponto de ser detectada por IHQ e classificada como 3+. Esta opinião é partilhada por Varshney<sup>11</sup>.

Por esta razão, além do *Kit* INFORM<sup>®</sup> *HER2/neu* Gene Detection System, por nós utilizado por rotina e que determina o número absoluto de sinais do gene, existe outra técnica de FISH, que utiliza o PathVysion<sup>™</sup> *HER2* DNA Probe kit, também aprovado pela FDA, que contém uma sonda de LSI *HER2/neu* para o gene, juntamente com uma sonda centromérica CEP 17. Artigos publicados indicam que os resultados são sobreponíveis com os dois métodos<sup>2</sup>, sendo que o significado da polissomia do cromossoma 17 na resposta à terapêutica não é ainda conhecido.

A percentagem total de 13,5% de casos amplificados obtida no Centro de Referência de Lisboa é difícil de comparar com a de outras séries publicadas, em que as percentagens de positividade referidas agrupam sobre-expressão 3+ e amplificação, ou em que a percentagem de casos amplificados é dada em subgrupos de sobre-expressão<sup>1,4,5,11</sup>. Devido à existência de diversos factores que podem afectar os resultados quer da IHQ, quer do FISH, e dada a importância clínica dos resultados, é necessário existirem regras que uniformizem as técnicas de modo a haver reprodutibilidade e confiança nos resultados. Diferentes países adoptaram normas específicas para as técnicas e leitura de resultados, que variam nos pormenores e no número de recomendações<sup>4,8</sup>.

O controlo de qualidade necessário passa pela uniformização e aplicação rigorosa dos protocolos quer de IHQ quer de FISH, assim como pelo controlo de factores pré-analíticos (fixação dos tecidos em formol a 10% durante 6 a 12 h e selecção de um bloco de tecido bem fixado que inclua tumor e tecido mamário normal)<sup>9</sup>. O uso de lâminas de controlo (linhas celulares ou amostras de tecido) é obrigatório. Em FISH devem avaliar-se pelo menos 60 células, estimar apenas o componente invasivo e, quando houver heterogeneidade tumoral, considerar o *score* máximo. O cuidado em avaliar apenas as células neoplásicas do componente invasivo é fundamental, dado que a sobre-expressão/amplificação do *HER2* é muito mais frequente no carcinoma *in situ* (50-80%) do que no carcinoma invasivo<sup>1,2,12</sup> e, mais uma vez se reforça, deve ser da responsabilidade de um médico anátomo-patologista. Dado que a experiência é fundamental, é recomendação no Reino Unido que um laboratório deva avaliar um número mínimo de casos/ano (>250) que permita a prática necessária para se conseguir a optimização dos resultados<sup>4</sup>.

## CONCLUSÃO

Como conclusão, é nosso objectivo transmitir que o FISH, como método de determinação da amplificação do *HER2* no carcinoma da mama, é uma técnica rigorosa e fiável, que segundo vários estudos<sup>1,5,7,9</sup> permite distinguir com segurança os casos em relação aos quais a terapêutica com trastuzumab é potencialmente eficaz.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Roche Farmacêutica Química, Lda. a escolha do grupo do Instituto Português de Oncologia para Centro de Referência e o financiamento do trabalho efectuado.

Agradecemos a todos os Colegas que colaboraram neste estudo: Agostinho Sanches (H. N. Sra. Oliveira), Amélia Lino (H. D. Faro), Ana Isabel Belo (Mat. Alfredo da Costa), Ana Paula Horta (H. Militar), Ana Paula Martins (H. S. Cruz), António Andrade (H. Egas Moniz), Celeste Dias (H. Curry Cabral), Fernanda Cabrita (H. S. José), Fernanda Tavares (Centro de Performance Humana), Filomena Medeiros (H. Pulido Valente), Helena Oliveira (H. C. Castro de Guimarães), Helena Taveira (H. SAMS), José Camacho (C. H. Funchal), Luís Gonçalves (H. Espírito Santo), Manuela Ribeiro (H. Angra do Heroísmo), Margarida Barreto (H. D. Santarém), Maria Luísa Carneiro de Moura (H. S. Francisco Xavier), Maria José Brito (H. Garcia de Orta), Maria Manuel Costa (H. S. A. Capuchos), Patrick Agostini (H. do Barlavento Algarvio), Rosa Madureira (H. N. Sra. Rosário) e Teresa Franca (H. S. Marta) a confiança depositada no nosso grupo de trabalho para a avaliação do HER-2/c-erbB-2 por FISH.

## BIBLIOGRAFIA

1. DOWSETT M, BARTLETT J, ELLIS O et al: Correlation between immunohistochemistry (Hercep Test) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418-23
2. ROSS J, FLETCHER J, LINETTE G et al: The HER2/neu Gene and protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and target of Therapy. *The Oncologist* 2003;4:307-25
3. De LAURENTIIS M, CANCELLO G, ZINNO L et al: Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology. *Ann Oncol* 2005;16:7-13
4. BILOUS M, ADES C, ARMES J et al: Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER 2000 International Study. *Breast* 2003;12:92-8
5. HAMMOCK L, LEWIS M, PHILIPS C, COHEN CS: HER – 2/ neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 2003;34:1043-7
6. BOFIN AM, YTTERHUS B, MARTIN C, O'LEARY JJ, HAGMAR BM: Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2004;122:110-9
7. WINSTON JA, RAMANARYANAN J, LEVINE E: HER-2/neu evaluation in breast cancer are we there yet? *Am J Clin Pathol* 2004;121:33-49
8. ELLIS IO, BARTLETT J, DOWSETT et al: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2004;57:233-7
9. ZARBO RJ, HAMMOND E: Conference summary, Strategic Science Symposium – Her-2/ neu testing of breast Cancer Patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:549-53
10. LAL P, SALAZAR PA, LADANYI M, CHEN B: Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn* 2003;5:155-9
11. VARSHNEY D, ZHOU GELLER, ALSABEH R: Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing Hercep test and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol* 2004;121:70-7
12. LATTA EK, TJAN S, PARKES RK, O'MALLEY FP: The role of Her2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2002; 15: 1318-25