

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA
ANO LECTIVO 2010/2011

Avaliação da amplificação do gene HER2, determinada por FISH e SISH, em casos com score 0/1+ por imunohistoquímica

Carlos Alberto da Silva Lopes
Professor Catedrático
ICBAS – Universidade do Porto
calopes@icbas.up.pt

João Filipe Cruz Correia Pinto
ICBAS – Universidade do Porto
joao.pinto@live.com.pt

Abstract: HER2 is an important tumor marker in breast cancer management and it is essential that clinical assays have the ability to correctly determine HER2 amplification status. A new method, silver *in situ* hybridization (SISH), combines the accuracy of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the use of light opaque silver, instead of fluorescent spot-like signals, thus allowing the use of ordinary light microscopy, which enables pathologists to evaluate slides within the context of tissue morphology. This study evaluates the frequency of amplification of HER2, with SISH and FISH assays, in 74 cases whose score from immunohistochemistry (IHC) was considered negative (score 0 or 1+). Furthermore, the overall concordance between FISH and SISH was also evaluated. All 74 cases (100%) were reported as non-amplified with SISH using the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) guidelines. The concordance between the two *in situ* hybridization assays was evaluated in 15 cases and the overall agreement was 100%, as the 15 cases were reported as non-amplified with both techniques. In conclusion, IHC has a low rate of false negative cases and should remain as a first-line test for screening of HER2 status in breast cancer. SISH is a novel approach for the determination of HER2 status with an excellent concordance with FISH, suggesting it is equally reliable. Because SISH combines bright field microscopy with molecular analysis and full automation, it appears to be particularly suited for routine application in Pathology.

Palavras-chave: HER2, silver in situ hybridization, SISH, fluorescence in situ hybridization, FISH, breast carcinoma, immunohistochemistry

Introdução

O cancro da mama é a segunda causa oncológica de morte em mulheres na Europa, com aproximadamente 421 000 novos casos desta neoplasia maligna diagnosticados em cada ano e 129 000 mortes anuais causadas por esta doença (Ferlay et al. 2010). Em Portugal, estima-se que sejam diagnosticados 4500 novos casos todos os anos com uma mortalidade anual de 1500 pessoas.

Apenas cerca de metade dos casos são curados por tratamento local segundo observações de McGuire (1987) e, portanto, a existência de indicadores que sugerem um comportamento mais agressivo da neoplasia é de grande importância na abordagem destes doentes. O proto-oncogene ERBB2 (HER2), localizado no CHR17q21, codifica um receptor transmembranar da tirosina cinase, estrutural e funcionalmente semelhante ao receptor do factor de crescimento epidérmico, envolvido na tradução de sinais para o crescimento e desenvolvimento celular

(Schechter et al., 1984; Harari et al., 2000). A amplificação do gene HER2 é encontrada em 15% a 20% dos carcinomas invasivos da mama em mulheres, segundo Slamon et al. (1989), e correlaciona-se clinicamente com um comportamento mais agressivo da neoplasia: metastização precoce (Makar et al., 1990; Tiwari et al. 1992), maior mortalidade (Seshadri et al., 1994), progressão mais rápida e maior risco de recidiva (Descotes et al., 1993; Slamon et al., 1994). Segundo Zeillinger et al. (1989), a amplificação do gene HER2 correlaciona-se ainda com níveis reduzidos de receptores de estrogénio e progesterona e actividade proliferativa significativamente aumentada. Determinar o *status* de HER2 é de grande importância na previsão da resposta à quimioterapia com antraciclinas e ao tratamento com anticorpo monoclonal humanizado, trastuzumab (Herceptin®), uma terapêutica dirigida ao alvo, que inibe a actividade da tirosina cinase (Baselga et al., 1998; Konecny e Slamon, 2002). Além disso, os custos desta terapêutica anti-HER2 estão estimados entre €25000 e

€35000. Portanto, é essencial que métodos precisos, fiáveis e reprodutíveis sejam usados para a determinação do *status* de HER2 em doentes com cancro da mama.

Na prática clínica corrente, são usadas duas metodologias para avaliar o *status* de HER2: imunohistoquímica (IHQ) para detectar sobre-expressão da proteína p185 e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para avaliar a amplificação do gene HER2. A IHQ é fácil de realizar e relativamente pouco dispendiosa; é utilizada como um primeiro teste para detectar casos de *status* de HER2 negativo (Score 0 e 1+) e fortemente positivo (Score 3+ , expressão intensa em mais de 30% das células). A técnica de FISH é actualmente aceite como a referência para a avaliação do *status* de HER2, mas por ser uma técnica laboriosa é utilizada em 2ª linha nos casos em que o resultado por IHQ é *borderline* (Score 2+, moderadamente positivo), por ser uma técnica mais fiável. Por ser uma técnica difícil, dispendiosa e que requer profissionais e equipamento especializados, não está prontamente disponível na grande maioria dos laboratórios.

A técnica de hibridização *in situ* por prata (SISH) é um método disponível recentemente, baseado na metalografia enzimática e deposição de prata, que permite a quantificação dos sinais específicos de HER2 recorrendo a um microscópio convencional de fundo claro, a que todos os histopatologistas estão familiarizados, ao invés de um microscópio de fluorescência como é utilizado com a técnica FISH. Além disso é um método que se pode automatizar, o que garante a consistência de resultados e permite a avaliação da amplificação de HER2 ao fim de 6 horas.

Os objectivos deste trabalho são:

- 1) Avaliar a frequência de amplificação de HER2 em casos classificados por IHQ com *score* 0 e 1+ ;
- 2) Avaliar a concordância entre as técnicas de FISH e SISH na amplificação do gene HER2 no carcinoma invasivo da mama.

Material e Métodos

Setenta e quatro casos de carcinoma invasivo da mama, com *status* de HER2 de *score* 0 e 1+ na IHQ, diagnosticados entre os anos de 2009 e 2010 no Hospital de Santo António foram seleccionados para este estudo. Os blocos de parafina avaliados eram resultantes de produtos de microbiópsia, mastectomia ou tumorectomia. Foi realizada uma revisão das lâminas de hematoxilina e eosina (H&E) por um único patologista. Os diagnósticos e características do tumor estão descritas na Tabela 1.

Todos os intervalos de confiança descritos são Intervalos de Confiança de Wilson a 95% (*2-sided*)

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Santo António.

Tabela I. Características clinicopatológicas da amostra do estudo

| Dados Clinicopatológicos | Numero de doentes |
|--------------------------|-------------------|
| Histologia | |
| CDIS | 5 |
| Ductal invasivo | 57 |
| Lobular invasivo | 7 |
| Tubular | 1 |
| Ductal/Lobular (misto) | 2 |
| Neuroendócrino | 1 |
| Cribriforme | 1 |
| Classificação pT | |
| PTis | 5 |
| pT1 | 32 |
| pT2 | 22 |
| pT3 | 4 |
| pT4 | 8 |
| N/D | 3 |
| Classificação pN | |
| pN0 | 36 |
| pN1 | 20 |
| pN2 | 1 |
| pN3 | 4 |
| N/D | 13 |
| Grau Histológico | |
| G1 | 8 |
| G2 | 44 |
| G3 | 22 |
| Média Idade (DP) | 60,4 (14,1) |
| Tipo de Produto | |
| Microbiópsia | 44 |
| Tumorectomia | 17 |
| Mastectomia | 13 |
| Localização Patologia | |
| Mama direita | 32 |
| Mama esquerda | 42 |

FISH

Para a realização da técnica de FISH, foram realizados cortes de 4 μm dos mesmos blocos de parafina usados em IHQ e SISH. A montagem foi feita em lâminas SuperFrost Plus. Foi usado o sistema automático para hibridização *in situ* Ventana Benchmark® Staining System com sonda INFORM™ HER2. Procedeu-se à digestão com protease 3 durante 40 minutos a 37°C. As sondas foram hibridizadas durante 16 horas a 60-90°C. O contraste nuclear foi realizado com solução de iodeto de propídeo (Vectashield® Mounting Medium).

SISH

A técnica de SISH foi realizada no IPATIMUP, após envio dos blocos de parafina dos casos seleccionados, utilizando o sistema informático BenchMark XT e a sonda INFORM™ HER2 SISH marcada com dinitrofenol, comercializados pela Ventana Medical Systems. A incubação da sonda HER2 foi feita com desnaturação a 95°C durante 12 minutos, seguida de hibridização durante 6 horas a 52°C com posterior lavagem adstringente com 2X SSC a 72°C (três lavagens). As sondas foram depois incubadas com o anticorpo anti-DNP durante 20 minutos a 37°C. A metalografia enzimática é realizada com a subsequente adição de Silver A (acetato de prata), Silver B (hidroquinona) e Silver C (peróxido de hidrogénio). A redução dos iões de prata é realizada pela hidroquinona. A prata precipitada deposita-se no núcleo, visualizando-se assim uma cópia do gene HER2 como um ponto negro (Figura 1)

A detecção do número de cópias do gene HER2/neu é feita pela técnica automatizada de SISH, com controlos positivos (carcinoma da mama com amplificação do gene HER2) e negativos (controlo interno do parênquima normal adjacente e/ou células linfóides perineoplásicas) a atestarem a fidelidade das reacções.

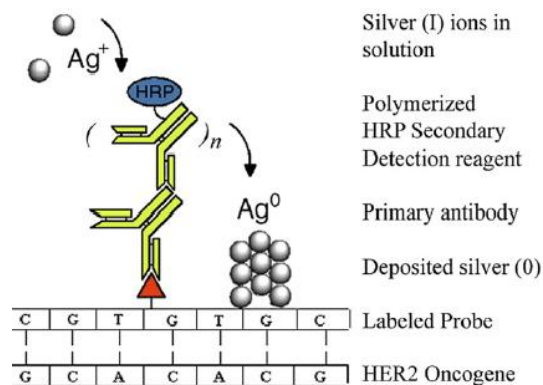


Figura 1. Esquema ilustrativo do princípio básico da hibridização *in situ* por prata. Detecção da sonda com um anticorpo primário anti-hapteno, seguido de um anticorpo secundário marcado com uma peroxidase. A deposição de prata metálica no alvo ocorre por catalização enzimática a partir de uma solução de acetato de prata (Imagem original em trabalho de Powell et al, 2007).

A interpretação dos resultados segue os seguintes critérios (Guidelines ASCO/CAP, 2007) após contagem de no mínimo 40 núcleos de células neoplásicas, em pelo menos 2 áreas distintas da neoplasia invasiva: < 4 cópias do gene HER2 – ausência de amplificação (negativo); 4 a 6 cópias do gene HER2 – borderline; > 6 cópias do gene HER2 – amplificação (positivo). Quando da utilização de dupla marcação com o cromossoma 17, os critérios utilizados são os seguintes: rácio HER2:Cr17 < 1,8 – ausência de amplificação (negativo); rácio HER2:Cr17 entre 1,8 e 2,2 – borderline; rácio HER2:Cr17 > 2,2 – amplificação (positivo).

Resultados

Os doentes da amostra seleccionada têm uma média de idade de 60,4 anos. 44 dos casos seleccionados (59,4%) resultam de produtos de microbiópsia, 17 de tumorectomia (23,0%) e 13 peças de mastectomia (17,6%); destes, 32 provêm de patologia da mama direita (43,2%) e 42 localizam-se na mama esquerda (56,8%) [Tabela 1]. As características clinicopatológicas da amostra estão descritas na Tabela 1.

Dos 74 casos incluídos neste estudo, o resultado da avaliação por IHQ foi: *score* 0 em 43 casos e *score* 1+ em 31. Em todos estes, a aplicação da técnica de SISH demonstrou ausência de amplificação do gene HER2 (100% casos negativos, com Intervalo de Confiança 95,1 - 100 a 95%) [Tabela 2].

Comparação entre HER2 SISH e HER2 FISH

Dos 15 casos que foram submetidos simultaneamente à análise de amplificação por FISH e SISH, todos revelaram ausência de amplificação do gene HER2 (79,6% – 100% com Intervalo de Confiança 95%) [Tabela 2 e 3].

Tabela II. Relação entre imunohistoquímica HER2 (IHQ), hibridização *in situ* por prata (SISH) e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

| IHQ | SISH+ / n° casos | FISH+ / n° casos |
|-------|------------------|------------------|
| 0 | 0 / 43 | 0 / 12 |
| 1+ | 0 / 31 | 0 / 3 |
| Total | 0 / 74 | 0 / 15 |

Tabela III. Resultado da avaliação do *status* HER2, simultaneamente por técnica de FISH e SISH.

| SISH | FISH | |
|------------------|------------------|------------------|
| | Com amplificação | Sem amplificação |
| Com amplificação | 0 | 0 |
| Sem amplificação | 0 | 15 |

Discussão

Um método rápido, preciso e reprodutível, para determinar o *status* de HER2 é essencial na identificação dos doentes com cancro, candidatos a tratamento com anticorpo monoclonal trastuzumab. A

identificação morfológica de biomarcadores em tecidos, para aplicação de terapêuticas dirigidas ao alvo é uma ferramenta importante na medicina, em crescente evolução, que leva a um tratamento cada vez mais personalizado. Este estudo procura determinar a proporção de casos falsos negativos do método usado na rotina diária, bem como comparar a nova metodologia SISH, com o *gold-standard* imperfeito, FISH.

Actualmente, os métodos mais frequentemente utilizados neste contexto são a IHQ, para detectar sobre-expressão da proteína na membrana celular das células neoplásicas, de FISH, para detectar amplificação do gene HER2. A detecção da proteína HER2 por IHQ pode ser afectada por vários factores, incluindo fenómenos de autólise, variações na fixação, variedade de sensibilidade dos reagentes, que condicionam resultados falso-positivos e falso-negativos e variabilidade inter e intra-observador na interpretação da intensidade da coloração. O ensaio FISH é mais dispendioso (€40 a €50 por cada ensaio, contra os cerca de €7 que são gastos em cada marcação por IHQ), laborioso e requer equipamento e profissionais especializados, tornando o seu uso pouco prático como teste de primeira linha. De facto, este teste é actualmente utilizado quando o resultado por IHQ é duvidoso, sendo então necessário clarificar o *status* a nível genómico. Contudo esta abordagem consome tempo. Apesar dos maiores gastos, as técnicas de hibridização *in situ* são consideradas vantajosas por serem bastante mais fiáveis na determinação do *status* HER2, algo de extrema importância clínica. Por apresentarem melhores resultados, métodos de hibridização *in situ* (ISH) de campo claro foram desenvolvidos, permitindo a detecção de cópias de genes usando um microscópio de fundo claro convencional, permitindo teoricamente que esta avaliação faça parte do trabalho diário do patologista, como sendo mais uma lâmina para observar juntamente com as convencionais em H&E. Estudos anteriores verificaram boa correlação entre técnicas de ISH cromogénico (CISH) e FISH. Um trabalho por Hanna e Kwok (2006), revelou que a concordância entre estas duas

técnicas de ISH era de 97% e 98%, nos grupos com score 0/1+ e 3+, respectivamente. Contudo, a técnica CISH não foi bem aceite para a rotina de trabalho por ser uma técnica demorada e ser necessário o processamento manual.

Neste trabalho, foi adoptada a recente técnica SISH, que ultrapassa muitas das desvantagens já discutidas e é o único método de ISH de campo claro cujo processamento é completamente automático.

O primeiro objectivo era determinar a proporção de falsos negativos da IHQ, por se tratar de uma técnica algo subjectiva. Neste estudo, os 74 casos considerados negativos pela IHQ, revelaram ausência de amplificação pela técnica de SISH. A amostra estudada é pequena, o que poderá ser um viés de amostragem, mas observações de Sauter et al. (2009), 2-8% dos carcinomas da mama que imunohistoquimicamente são classificados como 0/1+ são, na verdade, falsos negativos e respondem a terapêutica com trastuzumab. Se uma proporção de falsos negativos desta ordem for considerada aceitável, então a técnica de IHQ é adequada como um teste primário, numa abordagem inicial, pelo seu baixo custo (cerca de €7, por oposição aos €40 a €60 das diferentes técnicas de ISH), fiabilidade e boa caracterização de grande parte dos casos.

Como segundo objectivo, comparou-se os resultados de FISH e SISH nos mesmos casos de *score* negativo por IHQ. Um dos pré-requisitos para que esta nova técnica seja globalmente aceite, passa por ter uma elevada concordância com o *gold-standard* actual, FISH. Nos 15 casos que foram avaliadas simultaneamente por FISH e SISH, todos foram classificados com ausência de amplificação por ambas as técnicas. Perante uma proporção baixa de falsos negativos de IHQ, como é descrito na literatura, este resultado não surpreende perante uma amostra muito pequena. Contudo, um bom indicador, que revela excelente concordância entre as técnicas tal como havia sido apontado noutros estudos semelhantes: Dietel et al. (2007) relata uma concordância entre FISH e

SISH de 96% nos 99 casos estudados; Papouchado et al. (2010), descreve uma concordância de 95% entre as técnicas, utilizando os mesmos critérios ASCO/CAP usados no presente estudo. Neste trabalho de Papouchado et al., que utilizou uma amostra maior, é também possível verificar que 94,7% (82,7-98,5% com IC 95%) dos casos classificados como amplificados por FISH, são igualmente classificados com a técnica de SISH.

Assim, deve a IHQ continuar a ser usada como teste de primeira linha, relegando as técnicas de ISH para casos com score 2+? Nenhum teste para o status de HER2 é perfeito, pelo que a resposta depende do nível de incerteza que se está disposto a aceitar. Como já discutido, se uma proporção de 2 a 8% de casos falsos negativos for aceitável, as guidelines actuais devem-se manter. Por outro lado, se se pretender diminuir o número de falsos negativos para menos de 1%, isto implica o uso de técnicas de ISH como teste de primeira linha. Um estudo recente de Dendukuri et al. (2007), revela que a estratégia com melhor custo-eficácia é a aplicação de IHQ como *screening*, em casos diagnosticados de carcinoma da mama, com aplicação de técnicas de ISH, quando o *score* é 2+ ou 3+, algo que é também apoiado por Cuadros et al. (2009), devido à discrepância IHQ-ISH nestes casos. Isto permitiria a diminuição de casos falso-positivos, evitando assim toxicidade miocárdica (e outros efeitos laterais) da terapêutica anti-HER2, bem como gastos elevados num tratamento que não seria benéfico. Além disso, dados descritos por Arnould et al. (2007), indicam que o nível de amplificação do gene HER2 poderá estar correlacionado com a taxa de resposta completa à terapêutica com trastuzumab. Com isto, é de equacionar a aplicação da técnica de SISH em casos de *score* 3+, para avaliar a magnitude da amplificação e melhor prever a resposta à referida terapêutica anti-HER2.

Resumindo, este trabalho demonstra que IHQ deverá continuar a ser o teste de primeira linha na avaliação do *status* HER2. Os resultados com técnica SISH são

semelhantes aos do *gold-standard* FISH, com a vantagem de ser apenas necessário um comum microscópio de luz. Este método permite facilitar e acelerar o diagnóstico contribuindo para a evolução deste processo nesta área da Patologia.

Agradecimentos

Ao Prof.Dr. Carlos Lopes, por me ter proposto este desafio, concedendo-me todo o apoio, disponibilidade e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Fernando Schmitt, do IPATIMUP, pela análise de todos os casos submetidos a SISH e por ceder a metodologia aplicada.

Aos técnicos da Patologia Molecular do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santo António, pela constante disponibilidade em esclarecer questões técnicas relativas às metodologias aplicadas.

Referências Bibliográficas

- Arnould L, Arveux P, Couturier J, et al. Pathologic complete response to Trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 6404-6409
- Baselga J, Norton L, Albanell M, et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of Paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 1998;58: 2825-2831.
- Bacus SS, Zelnick CR, Plowman G, Yarden Y. Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior. *Am J Clin Pathol* 1994;102:S13-24
- Cuadros M, Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009 Jan; 17(1):1-7.
- Dendukuri N, Khetani K, McIsaac M, et al. Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *CMAJ*. 2007 May; 176(10):1429-34.
- Descotes F, Pavy JJ, Adessi GL. Human breast cancer: correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. *Anticancer Res* 1993;13:119-24.
- Dietel M, Ellis IO, Hofler H, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch* 2007; 451:19-25
- Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127:2893-2917
- Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol*. 2006; 19:481e7
- Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000;19:6102-6114.
- Konecny G, Slamon DJ. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy. *Oncology (Huntingt)*. 2002;16:1576-1578
- Makar AP, Desmedt EJ, DePotter CR, et al. Neu (c-erbB-2) oncogene in breast cancer and its possible association with the risk of distant metastases. A retrospective study and review of literature. *Acta Oncol*. 1990; 29:931
- McGuire WL. Prognostic factors for recurrence and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1987;10:5-9.
- Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, et al. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jun; 34(6):767-76
- Powell RD, Pettay JD, Powell WC, et al. Metallographic in situ hybridization. *Hum Pathol* 2007. 38:1145e59
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM, et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27:1323-1333
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984;312:513-6.
- Seshadri R, Horsfall DJ, Fergaira F, et al. The relative prognostic significance of total cathepsin D and HER-2/neu oncogene amplification in breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *Int J Cancer* 1994;56:61-5.
- 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. *Science* 1987;235: 177-82
- Slamon D, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-712.
- Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 1992;12:419-25.
- Zeillinger R, Kury F, Czerwenka K, et al. HER-2 amplification, steroid receptors and epidermal growth factor receptor in primary breast cancer. *Oncogene* 1989;4:109-14