

Recomendaciones del grupo de expertos venezolanos para la determinación inmunohistoquímica del HER2 en cáncer gástrico

Autores Simón Peraza¹, Francisco Menolascino², Aldo Reginosa³, Enrique López,⁴ Mirian Naranjo,⁵ Cathy Fernández,⁵ Adriana Morales,⁶ Irida Daboin⁷

Afiliaciones ¹Inmunohistotecnia C.A, San Cristóbal, Estado Táchira y Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal "Dr. Luis Anderson", Táchira, Venezuela.
²Departamento Patología Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Lara.
³Departamento Patología de la Universidad de Carabobo, Carabobo, Venezuela.
⁴Anatomía Patológica Instituto de Clínicas y Urología Tamanaco C.A, Caracas, Venezuela.
⁵Laboratorio de Patología N&GH Caracas, Venezuela.
⁶Servicio de Diagnóstico de Patología Molecular C.A, Maracaibo, Venezuela.
⁷Departamento Patología Universidad de Oriente y Centro Medico CIAT.

Revista GEN (Gastroenterología Nacional) 2013;67(4):208-213. Sociedad Venezolana de Gastroenterología, Caracas, Venezuela. ISSN 0016-3503.

Autor correspondiente: Dr. Simón Peraza. Medico Anatomopatólogo. Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal "Dr. Luis Anderson", Táchira, Venezuela.

Correo-e: sidape@gmail.com

Fecha de recepción: 12 de abril de 2013. Fecha de revisión: 3 mayo de 2013. Fecha de aprobación: 14 de noviembre de 2013.

Resumen

Introducción: La amplificación del oncogen HER2 en adenocarcinoma gástrico fue descrita en 1986, predominantemente en los del tipo intestinal. La identificación de los carcinomas gástricos avanzados con alteraciones de HER 2 es esencial en la práctica clínica diaria, ya que estas neoplasias requieren un tratamiento específico de elección. Después de la publicación del ensayo ToGA sobre la expresión de HER2 en cáncer gástrico avanzado y de la unión gastroesofágica se hace necesario divulgar en nuestro medio la importancia de la determinación confiable de esta alteración. **Material y métodos:** En esta parte establecemos los requerimientos metodológicos que se requieren para que el estudio del HER2 sea confiable y permita establecer el uso de la terapia adecuada. Consta de una fase pre analítica y una fase analítica propiamente dicha, en tal sentido el papel de los gastroenterólogos y cirujanos en la toma de las muestras y el manejo de las piezas quirúrgicas es definitivamente crucial. **Conclusiones:** El objetivo de este consenso es dar conocer a gastroenterólogos, cirujanos, oncólogos médicos y patólogos la importancia del manejo de los especímenes de biopsias endoscópicas y quirúrgicas, de acuerdo a normas estrictas que permitan la realización de estudios confiables. Por otra parte, se plantea instruir sobre la forma adecuada de interpretación de los estudios de inmunohistoquímica, en biopsias endoscópicas, resecciones mucosales endoscópicas (mucosectomías) y especímenes quirúrgicos por parte de los patólogos.

Palabras claves: Cáncer gástrico, inmunohistoquímica HER2.

RECOMMENDATIONS OF THE VENEZUELAN EXPERTS FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL DETERMINATION OF HER2 IN GASTRIC CANCER

Summary

Introduction: HER2 oncogene amplification in gastric adenocarcinoma was described in 1986, predominantly in the intestinal type. The identification of advanced gastric carcinomas with HER2 abnormalities is essential in daily clinical practice, as these neoplasms require specific treatment election. Afterward publication Toga trial on HER2 expression in advanced gastric cancer and the Union gastroesophageal is necessary in our country the determination of this alteration. **Methods:** In this section we establish the methodological requirements for the study of HER2 and permits the use of appropriate therapy. The methods consists of a Pre analytical phase and an analytical phase itself, in this regard the role of gastroenterologists and surgeons in making samples and handling of surgical specimens is definitely crucial. **Conclusions:** The aim of this agreement is to teach gastroenterologists, surgeons, medical oncologists and pathologists the importance of handling specimens and surgical endoscopic biopsies, according to strict standards that allow reliable studies. Moreover, there is instruction on the proper interpretation of immunohistochemical studies on endoscopic biopsy, endoscopic mucosal resection and surgical specimens by pathologists

Key words: Gastric cancer, HER2 immunohistochemistry.

Introducción

La identificación de los carcinomas gástricos avanzados¹ con alteraciones de HER2 es esencial en la práctica clínica diaria, ya que estas neoplasias requieren un tratamiento específico de elección.

Después de la publicación del ensayo ToGA,² resulta obvio que la determinación fiable del estado de HER2 en pacientes con carcinoma gástrico es un requisito imprescindible para el uso correcto del tratamiento anti-HER2. Sin embargo, como hemos aprendido en el carcinoma de mama, la determinación de HER2 tiene numerosas dificultades en la realidad cotidiana por su complejidad y requiere seguir unos criterios estrictos en su metodología e interpretación.³

El posible valor pronóstico del oncogen HER2 en el carcinoma gástrico es un tema controvertido. Aunque históricamente la sobreexpresión/amplificación de HER2 se ha considerado un rasgo de mal pronóstico al asociarse con un diagnóstico en estadios más avanzados, con afección ganglionar o con menor sobrevida tras la cirugía, los estudios más recientes parecen cuestionar este carácter negativo.⁴

Pese a la existencia de múltiples trabajos en la literatura internacional, sobre la determinación del HER2 en cáncer gástrico, poco es lo que se sabe en Venezuela sobre la determinación de este oncogen como factor pronóstico y predictivo en este tipo de neoplasia. En Venezuela se pudo encontrar un artículo en el cual se realizó un estudio inmunohistoquímico en cáncer gástrico precoz y avanzado para conocer la prevalencia de expresión de p53, ErbB 2, Egfr y PCNA en un total de 65 casos y en relación a la oncoproteína HER2 su expresión se observó en 33 casos, no obstante la evaluación de esos casos para la época no estaba estandarizada de acuerdo a las normas que ahora se establecen;⁵ por este motivo un grupo de expertos fue convocado con el objetivo de producir un consenso que diera a conocer a gastroenterólogos, cirujanos, oncólogos médicos y patólogos la importancia del manejo de los especímenes de biopsias endoscópicas y quirúrgicas, de acuerdo a normas estrictas que permitan la realización de estudios confiables. Por otra parte, se plantea instruir sobre la forma adecuada de interpretación de los estudios de inmunohistoquímica, en biopsias endoscópicas, resecciones mucosales endoscópicas (mucosectomías) y especímenes quirúrgicos por parte de los patólogos (**Figura 1**).

El grupo de expertos consideró conveniente separar las mucosectomías de las biopsias endoscópicas y de los especímenes quirúrgicos, dado el tamaño de las muestras y la importancia que en la actualidad adquiere este procedimiento; sin embargo, a la hora de su evaluación se consideran los mismos parámetros que para los especímenes quirúrgicos. Estos puntos han sido descritos con anterioridad en el Consenso nacional de cáncer gástrico.⁶

La experiencia en cáncer mamario es bien conocida por todos, no obstante debido a las características de heterogeneidad histológica del cáncer gástrico y a su propia citomorfología, la interpretación de la expresión de HER2 es relativamente distinta en relación al cáncer mamario.⁷

Los adenocarcinomas gástricos muestran positividad para HER2 en alrededor del 15-17% de los casos. La positividad es mayor en los adenocarcinomas de tipo intestinal (30%) que en los de tipo difuso (5,5%), mientras que en los mixtos es de aproximadamente un 20%. Es más frecuente la positividad en los adenocarcinomas de la unión gastroesofágica (más del 30%).⁸

Los pacientes con expresión 2+ requieren confirmación mediante una técnica de hibridación in situ de amplificación de HER2.⁹ (**Figura 2**).

Material y métodos para la determinación de HER2 en cáncer gástrico

En esta parte establecemos los requerimientos metodológicos que se requieren para que el estudio del HER2 sea confiable y permita establecer el uso de la terapia adecuada, consta de una fase pre analítica y una fase analítica propiamente dicha, en tal sentido el papel de los gastroenterólogos y cirujanos en la toma de las muestras y el manejo de las piezas quirúrgicas.

El análisis de los especímenes por parte del patólogo debe también cumplir ciertas pautas que se describen en el texto de este artículo

Conscientes de la gran cantidad de procedimientos y compañías productoras de reactivos para inmunohistoquímica, el grupo de expertos prefirió no discutir en esta publicación la parte concerniente al procedimiento de inmunohistoquímica y a los clones que se utilizan, los cuales están especificados en los manuales que suministran cada una de las casas comerciales y que dependen de ciertas preferencias del patólogo, resaltando que cada laboratorio debe garantizar la correcta formación de los histotecnólogos en dicho procedimiento y seleccionar los reactivos en función de estándares internacionales. Las técnicas de inmunohistoquímica son similares y varían de acuerdo al uso de instrumentos diversos como vaporeras, micro-ondas, ollas de presión etc.

1. Requerimientos de la fase pre-analítica:

- Identificación del paciente.
- Identificación del médico solicitante.
- Fecha de la solicitud.
- Identificación de la muestra (caso y número de bloque).
- Tipo de muestra (biopsia endoscópica, pieza quirúrgica u otras) y procedencia anatómica. En caso de biopsias endoscópicas, especificar el número de fragmentos tomados.
- Tipo de fijador.
- Anticuerpo y método utilizado.
- Método de evaluación (semicuantitativo, análisis de imagen).
- Idoneidad de la muestra (adecuada/inadecuada para diagnóstico).

2. Procesos de la fase pre-analítica:

2.1.- Requisitos de la muestra para la determinación de HER2 en cáncer gástrico:

Aún cuando es el médico tratante quien solicita el estudio, el patólogo debe sugerir su realización cuando evalúa una biopsia con cáncer gástrico. Los protocolos internacionales¹⁰ recomiendan un mínimo de 6 a 8 fragmentos endoscópicos para aumentar la probabilidad de obtener mayor cantidad de tumor, adecuada para diagnóstico histológico e inmunohistoquímico. Sin embargo, es el patólogo quien finalmente determina la idoneidad de la misma. Hasta ahora la determinación del HER2 está recomendada en cáncer gástrico avanzado y de la unión gastroesofágica. Lesiones metastásicas o recidivantes pueden ser utilizadas para la determinación del HER 2.

El grupo de expertos apoyados en consensos mundiales, mostró una clara preferencia por la utilización de tejido para la realiza-

ción de los estudios de inmunohistoquímica, considerando que las muestras citológicas no son el material más idóneo para dichas pruebas, recomendando (específicamente para cáncer gástrico) que estas no sean empleadas.

Las biopsias endoscópicas con frecuencia están mejor fijadas y procesadas que las piezas quirúrgicas, las cuales presentan una mayor probabilidad de falsos negativos (por exceso o defecto de fijación). No obstante, las biopsias endoscópicas pueden presentar artificios de retracción, aplastamiento instrumental o un efecto margen, que pueden inducir resultados falsos positivos.

Cuando la determinación de HER2 en la biopsia endoscópica no es concluyente, debe repetirse el estudio en la pieza quirúrgica.

2.2. Personal:

Tanto histotecnólogos como patólogos deben estar debidamente entrenados en el área de inmunohistoquímica.

2.3. Tipo de Muestras:

- Especímenes quirúrgicos.
- Biopsias endoscópicas.
- Mucosectomías.
- Muestras obtenidas por otros procedimientos (biopsias con aguja gruesa, incisionales, etc.).

2.4. Fijación:

Las muestras de gastrectomías deben ser fijadas inmediatamente de acuerdo a los protocolos de patología quirúrgica. La fijación debe ser por un mínimo de 6 horas y no exceder las 48 horas. Los especímenes deben ser abiertos por la curvatura mayor, a menos que la lesión se encuentre en esa localización. Deben ser colocadas y debidamente extendidas sobre un corcho con alfileres y sumergidas con la mucosa hacia abajo. Este procedimiento es igual para las resecciones mucosales.

La fijación inmediata de la muestra es responsabilidad exclusiva del equipo quirúrgico a cargo, por lo cual debe tomar las previsiones pertinentes del caso.

2.5. Tipo y preparación del fijador:

Existen diferentes medios de fijación, el más recomendado es el

formol tamponado al 10%.

- Preparación (1000 ml):
Agua destilada 900 ml.
Formaldeído 37% 100 ml.
Fosfato de sodio monobásico 4 g.
Fosfato de sodio dibásico 6,5 g.

2.6. Procesamiento y secciones histológicas:

En el caso de las piezas quirúrgicas, se recomienda incluir tejidos que no excedan de 2 cm de longitud y 3 mm de grosor, en ocasiones el espesor puede ser mayor.

El bloque para inmunohistoquímica debe ser escogido por el patólogo que realizará el estudio o en su defecto el patólogo que realizó el diagnóstico, tomando en cuenta: viabilidad del tumor, ausencia de necrosis, descartar zonas hipocelulares, áreas inflamatorias, hemorrágicas, focos de metaplasia intestinal y si el tumor es mixto, preferir el componente de tipo intestinal.

Las secciones histológicas no deben ser mayores de 4 micras y no utilizar láminas almacenadas desparafinadas.

2.7. Método inmunohistoquímico:

Debe ser utilizado un método que sea reconocido, validado y estandarizado.

2.8. Control de calidad:

Los kits de reactivos comerciales con que se determinan las pruebas HER2 están estandarizados y proporcionan un número de controles positivos y negativos procedentes de líneas celulares. Como el número de controles es limitado, se recomienda utilizar controles previamente validados, con las condiciones de fijación y procesamiento propias del laboratorio.

Los laboratorios deben implementar un sistema de control de calidad externo.

3. Fase analítica:

3.1.- Interpretación de la determinación inmunohistoquímica de HER2:

Se evaluará exclusivamente el componente infiltrante y la tinción de membrana. Tal como se detalla en los **Cuadros 1 y 2** así como en la **Figura 3 y 4**.

Cuadro 1 Laboratorio clínico de ingreso

PUNTUACIÓN	REACTIVIDAD	PATRÓN DE TINCIÓN
0	NEGATIVA	No reactividad de membrana en las células
1+	NEGATIVA	Reactividad de membrana tenue focal en ≥ 5 células
2+	DUDOSA	Reactividad de membrana débil moderada, completa, lateral ó basolateral ≥ 5 células independiente del número de células
3+	POSITIVA	Reactividad de membrana intensa, lateral o baso-lateral ≥ 5 células independiente del número de células

*En las biopsias endoscópicas se consideran positivos nidos tumorales de al menos cinco células, independientemente del porcentaje.

Cuadro 2 Puntuación HER2 gástrico en espécimen quirúrgico y mucosectomía

PUNTUACIÓN	REACTIVIDAD	PATRÓN DE TINCIÓN
0	NEGATIVA	No reactivo o reacción de membrana ténue- focal <10% de las células.
1+	NEGATIVA	Reacción de membrana parcial tenue en >10% de las células.
2+	DUDOSA	Reacción de membrana débil a moderada, completa, lateral o basolateral en >10% de las células.
3+	POSITIVA	Reacción de membrana intensa, completa lateral basolateral en >10% de las células.

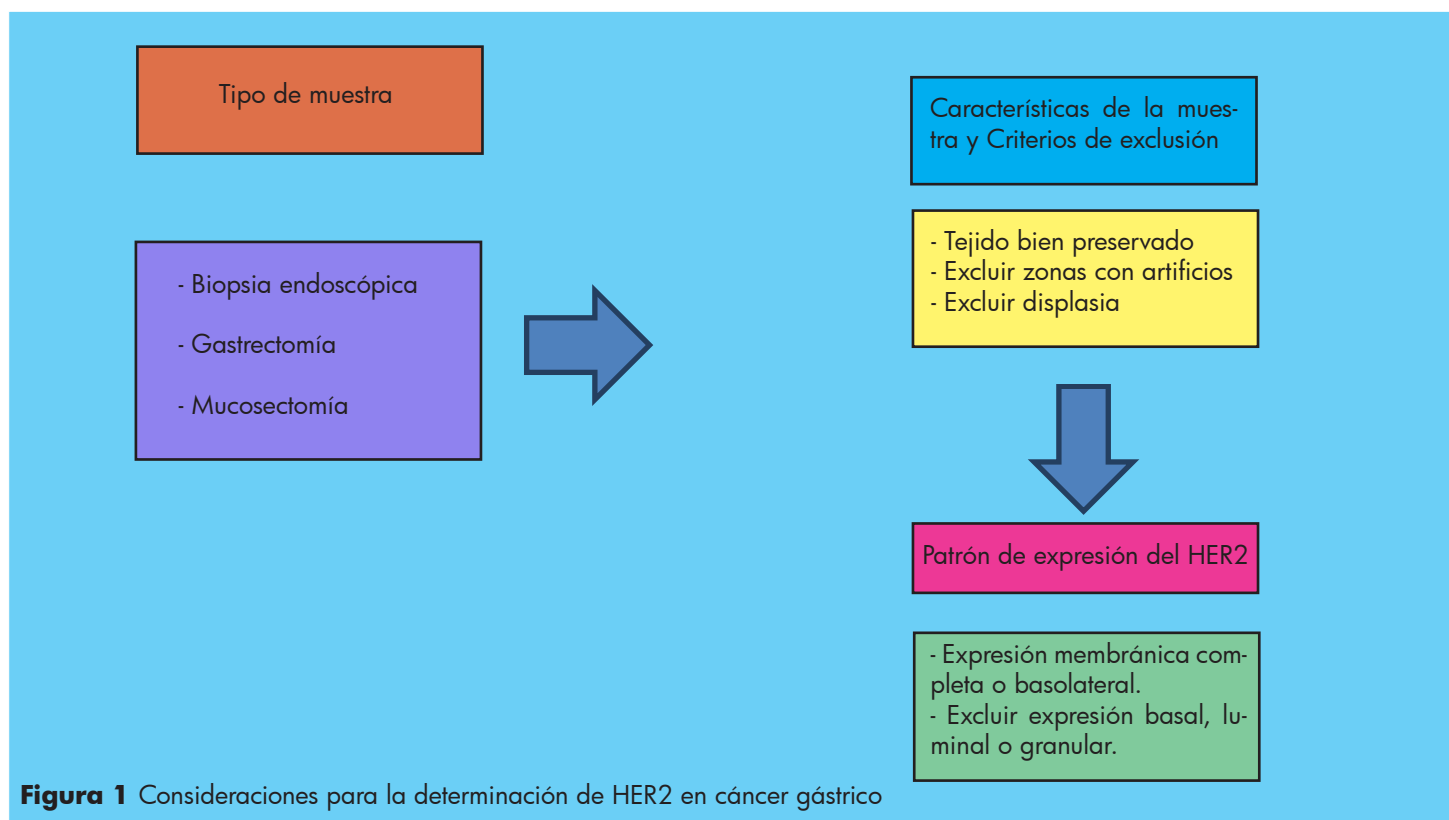


Figura 1 Consideraciones para la determinación de HER2 en cáncer gástrico

	HER2 Puntuación	Intensidad Membránica	Magnificación	
	3+	Fuerte	2.5-5x	
	2+	Débil a Moderada	10x 20 x	
	1+	Casi inapreciable	40x	
	0	Ausencia de tinción	40x	

Figura 2 Regla de la Magnificación



Figura 3 Expresión inmunohistoquímica en la membrana y solo considerada si es completa lateral o basolateral y su interpretación en biopsias endoscópicas y especímenes quirúrgicos

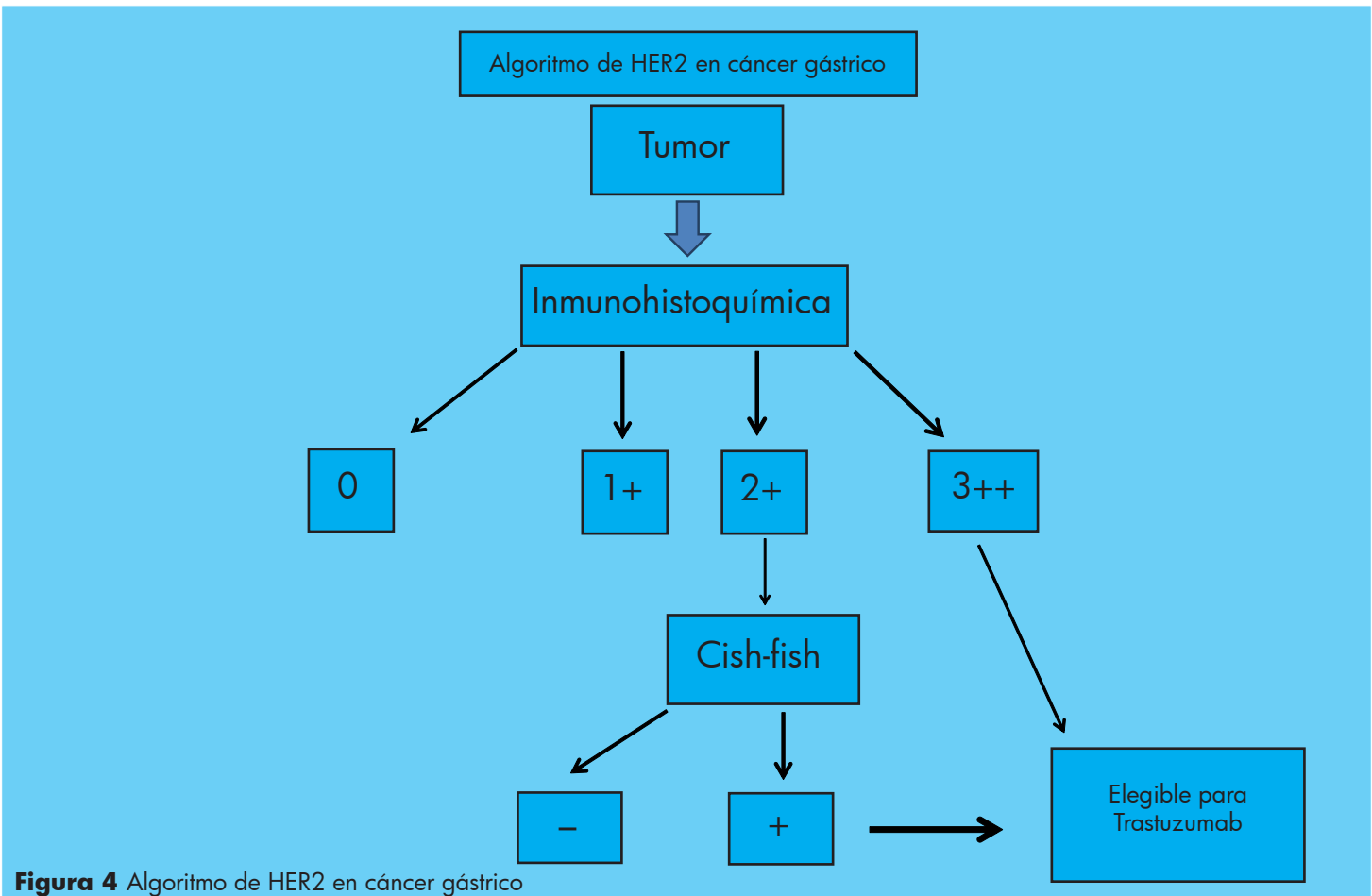


Figura 4 Algoritmo de HER2 en cáncer gástrico

Conclusiones

La amplificación del oncogen HER2 en adenocarcinoma gástrico fue descrita en 1986, predominantemente en los del tipo intestinal. La importancia del HER2 dentro de la biología del adenocarcinoma gástrico fue mostrada por estudios *in vitro*, en los cuales se encontró que su bloqueo producía supresión de la proliferación celular en una línea portadora de amplificación del gen y regresión tumoral *in vivo*, en un modelo animal.¹¹ Yonemura y colaboradores, demostraron una correlación negativa entre la sobreexpresión de HER2 y el pronóstico de recurrencia y sobrevida en cáncer gástrico.¹² El análisis de 42 publicaciones con un total de 12.749 pacientes, establece que la expresión de HER2 tanto por inmunohistoquímica o por FISH son métodos ya comprobados. Los estudios en fase III (ToGA) demuestran que el tratamiento con quimioterapia y Trastuzumab en pacientes HER2 positivos debe ser considerado como una alternativa terapéutica en cáncer gástrico avanzado y de la unión gastro-esofágica.¹²

Conociendo la magnitud del problema del cáncer gástrico en Venezuela¹³ es importante conocer el manejo pre-analítico y analítico de este estudio, el cual contribuye de manera importante en el tratamiento y sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico. Los gastroenterólogos que enfrentan estos pacientes una primera instancia, deben conocer el alcance de este método y contribuir efectivamente en la toma de las biopsias de acuerdo a los protocolos antes mencionados, los cirujanos deben por su parte orientar en el manejo de la pieza quirúrgica al personal a su cargo para evitar el daño irreversible por fijación inadecuada de los especímenes. Los patólogos por su parte tiene que valorar minuciosamente las muestras de biopsias endoscópicas, mucossectomías y piezas de gastrectomía con mayor énfasis en estas últimas para escoger las áreas sin necrosis y con mayor cantidad de tejido neoplásico y considerar el patrón intestinal como de mayor posibilidad para la expresión del marcador en aquellos tumores de tipo mixto. Por último el paciente se verá beneficiado cuando el oncólogo clínico cuente con el mayor número de elementos que le permitan implementar una terapéutica adecuada así como establecer el pronóstico de dichos pacientes.

Clasificación

Área: anatomía patológica.

Tipo: inmunohistoquímica

Tema: cáncer gástrico

Patrocinio: este trabajo no ha sido patrocinado por ningún ente gubernamental o comercial.

Referencias Bibliográficas

1. Mitsuru Sasako, Manami Inoue, Jaw-Town Lin, Christopher Khor, Han-Kwang Yang et al. Gastric Cancer Working Group Report. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40(Supplement 1):i28-i37.
2. Sawaki A, Ohashi Y, Omuro Y, Satoh T, Hamamoto Y, Boku N, et al Efficacy of trastuzumab in Japanese patients with HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: a subgroup analysis of the Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) study. *Gastric Cancer* 2012 Jul;15(3):313-22.
3. Wedad Hanna, Harriette J Kahn, Margaret Pienkowska, John Blondal, Arun Seth, PhD, Alexander Marks. Defining a Test for HER-2/neu Evaluation in Breast Cancer in the Diagnostic Setting.

Mod Pathol 2001;14(7):677-685.

4. Jaclyn F. Hechtman, Alexandros D. Polydorides, HER2/neu Gene Amplification and Protein Overexpression in Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma A Review of Histopathology, Diagnostic Testing, And Clinical Implications. (*Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:691-697.

5. Gutiérrez Yraima, Márquez Rita, Peraza Simón, Becker Juan, Romero Sandra, Calderón Mariali. Análisis Inmunohistoquímico de p53, Cerb -B2 y PCNA en Cáncer Gástrico.

6. Parra Jesús, Henández Ruben D. , Gil A Armando, Uzcátegu Nery i, Honorato Augusta, Barrios Rafael et al Cáncer Gástrico, Primera Reunión De Consenso Agosto 2006. *Rev. Venez. Oncol.* V.19 N.2 2007.

7. Manfred Josef, Rüschoff Dietel, Baretton Gustavo, Arbogast Susanne, Walch Axel, Monges Geneviève et al. HER2 diagnostics in gastric cancer guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* (2010) 457:299-307.

8. C Gravalos A. Jimeno HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target *Annals of Oncology* 2008;19:1523-1529.

9. Kim Ma, Jung Ej, Lee Hs, Lee He, Jeon Yk, Yang Hk, et al. Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Pathol.* 2007 Sep;38(9):1386-93.

10. López-Riosa Fernando, Conchab Ángel, Corominas José María, García-Caballerod, García-García, Tomás Elena, Consenso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) sobre la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico. *Rev Esp Patol.* 2011;44(1):32-48.

11. Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. HER2 testing in Gastric Cancer. *Adv Anat Pathol* 2011;18:53-59.

12. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, et al. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 proteins as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res.* 1991;51:1034-1038.

13. Capote Negrin, Luis G. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. venez. oncol.* [online]. 2006, vol.18, n.4.