



REVISIÓN

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

Fernando López-Ríos^{a,*}, Ángel Concha^b, José María Corominas^c, Tomás García-Caballero^d, Elena García-García^a, Mar Iglesias^c, José Antonio López^e, Santiago Ramón y Cajal^f, Federico Rojo^g, José Palacios^h, Francisco Vera-Sempereⁱ, Enrique Aranda^j, Ramón Colomer^k, Pilar García-Alfonso^l, Pilar Garrido^m, Fernando Riveraⁿ y Carlos Gómez-Martín^{o,*}

^a Servicio de Anatomía Patológica y Laboratorio de Dianas Terapéuticas, Hospital Universitario Madrid Sanchinarro, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada, España

^c Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Mar, Barcelona, España

^d Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Santiago. Santiago de Compostela, A Coruña, España

^e Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, España

^f Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^g Programa de Investigación en Cáncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, y Servicio de Anatomía Patológica, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España

^h Servicio de Anatomía Patológica, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, España

ⁱ Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario La Fe, Departamento de Patología, Universidad de Valencia, Valencia, España

^j Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España

^k Servicio de Oncología Médica, Centro Oncológico MD Anderson España, Madrid, España

^l Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^m Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

ⁿ Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria, España

^o Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

Recibido el 31 de enero de 2011; aceptado el 16 de febrero de 2011

PALABRAS CLAVE

Carcinoma gástrico;
HER2;
Inmunohistoquímica;
Hibridación *in situ*;

Resumen La identificación de los carcinomas gástricos avanzados con alteraciones de HER2 es esencial en la práctica clínica diaria, ya que estas neoplasias requieren un tratamiento específico con trastuzumab. Por estos motivos, patólogos y oncólogos expertos en carcinoma gástrico y en la determinación de HER2, en representación de las sociedades respectivas (SEAP y SEOM), han trabajado para debatir y consensuar las recomendaciones nacionales de determinación de

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: flopezrios@hospitaldemadrid.com (F. López-Ríos).

Estandarización;
Control de calidad

HER2 en los carcinomas gástricos. Estas recomendaciones se basan no sólo en la experiencia de los participantes en el consenso, sino también en la experiencia internacional publicada. En este consenso se muestran los requisitos mínimos que un laboratorio de anatomía patológica debe cumplir para garantizar la adecuada determinación de HER2 en la práctica diaria. Los laboratorios que carezcan de los estándares mínimos expuestos en esta guía deberían trabajar en alcanzarlos.

© 2011 SEAP y SEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Gastric carcinoma;
HER2;
Immunohistochemistry;
In situ hybridization;
Standardization;
Quality control

HER2 evaluation in gastric carcinoma: A consensus study by the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM)

Abstract The identification of HER2 alterations in advanced gastric carcinomas is critically important in daily clinical practice as such neoplasms require specific treatment with Trastuzumab. For this reason, expert pathologists and oncologists have agreed on national guidelines for HER2 testing in gastric carcinomas. The guidelines are based on the experience of the participants and pertinent recent international publications. They outline the minimum requirements for the Pathology Laboratory in order to guarantee satisfactory routine HER2 testing. The guidelines recommend that any laboratory not fulfilling such requirements make the adjustments necessary for compliance.

© 2011 SEAP y SEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Necesidad de una Guía de Consenso para la determinación de *HER2* en el carcinoma gástrico

Después de la publicación del ensayo ToGA, 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-HER2¹. 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. Estudios recientes indican que uno de cada cinco tests de HER2 es erróneo². Además, todavía quedan por resolver cuestiones tan importantes como el significado predictivo del nivel de amplificación o de la polisomía del cromosoma 17.

Por estos motivos, patólogos y oncólogos médicos expertos en la determinación de HER2 y en carcinoma gástrico, en representación de las sociedades respectivas (SEAP y SEOM), han trabajado para debatir y consensuar las recomendaciones nacionales de determinación de HER2 en pacientes con carcinoma gástrico. Estas propuestas se basan no sólo en la experiencia de los participantes en el consenso, sino también en la evidencia científica disponible en la literatura. Hay que insistir que esta es, hasta donde sabemos, la primera guía de estas características que se publica. La **figura 1** recoge un cronograma en el que se muestran los principales hitos en el desarrollo de trastuzumab en el carcinoma gástrico³⁻⁸.

El resultado es esta guía, hecha para que sirva de base a patólogos y clínicos de nuestro país para la práctica diaria. El objetivo es bidireccional. Por un lado, proporcionar a los patólogos unas recomendaciones detalladas sobre las diferentes fases de la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico, de manera que la aplicación de esta técnica se realice estandarizadamente en los diferentes centros sanitarios

de nuestro país y se eviten los problemas metodológicos y de interpretación que han sido comunes en el caso de la determinación de HER2 en el carcinoma de mama. Por otro, dar a conocer al clínico las indicaciones y limitaciones actuales de la determinación, de forma que se pueda establecer una comunicación fluida entre patólogos y oncólogos que contribuya a un mejor tratamiento del paciente con un carcinoma gástrico.

¿Qué diferencias hay con el carcinoma de mama?

Al valorar la sobreexpresión/amplificación de HER2 en el carcinoma gástrico debe tenerse en cuenta una serie de hechos diferenciales fundamentales a la experiencia adquirida en la valoración de HER2 en el carcinoma de mama, como son:

1. La prevalencia de distribuciones heterogéneas de la amplificación de HER2 en el carcinoma gástrico es más alta que la detectada en mama^{5,9}.
2. La correlación entre los niveles de expresión de *HER2* detectados por inmunohistoquímica y el estado del gen es inferior a la observada en el carcinoma de mama^{5,10}. Un número significativo de los tumores gástricos con niveles de expresión catalogados como 0/1+ presentan amplificación de *HER2*. En el estudio ToGA, hasta un 18,6% de los carcinomas gástricos 1+ presentaron amplificación de *HER2*¹.
3. La tasa de pruebas rechazadas por causas preanalíticas en muestras de carcinoma gástrico podría ser menor al utilizar con frecuencia biopsias diagnósticas de pequeño tamaño¹⁰.
4. De acuerdo con la aprobación de la EMEA para trastuzumab, la inmunohistoquímica es más predictiva que la hibridación y, por lo tanto, esta debe reservarse para reclasificar los casos 2+^{1,8}.

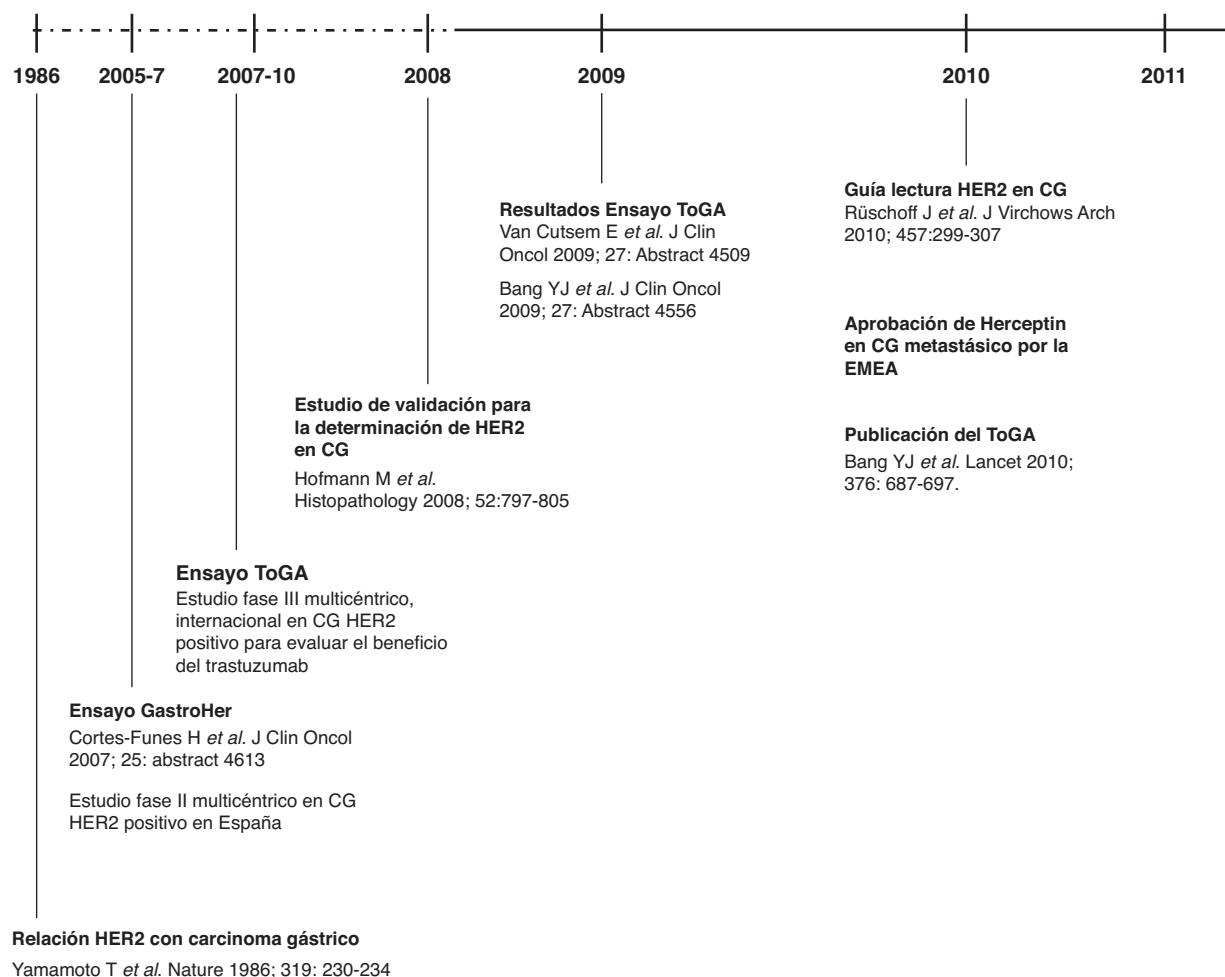


Figura 1 Cronograma de los principales hitos en el desarrollo de trastuzumab en carcinoma gástrico.

Importancia clínica de la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico

El oncogén *HER2/neu* (*c-erb-B2*) está localizado en el cromosoma 17 (17q11.2-q12) y codifica una proteína (HER2) de 185-kDa con tres dominios, uno extracelular rico en residuos de cisteína, uno transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosinasa. HER2 actúa como receptor en la superficie de la célula y pertenece a la familia *erbB*, constituida por cuatro miembros (HER1 o EGFR, el propio HER2, HER3 y HER4). La activación de estos receptores requiere la formación de homodímeros o heterodímeros tras la unión de un ligando a su receptor específico. No se han descrito ligandos específicos de HER2, por lo que la formación de los homodímeros de HER2 se ha descrito causada por mecanismos alternativos como la sobreexpresión del receptor secundaria a la amplificación génica del propio oncogén *HER2*, defectos en la internalización y degradación de HER2 de la membrana o la ausencia o mutación del gen supresor *FOX P3*¹¹. *HER2* puede estar asimismo activado de manera aberrante por mutaciones espontáneas en su secuencia^{12,13}. Independientemente de cuál sea el mecanismo causal, la sobreexpresión de moléculas de HER2 facilita la formación de dímeros de manera espontánea en la superficie de la célula tumoral, desencadenando la activación de distintas

vías de señalización intracelular cuyas consecuencias son un incremento de la proliferación celular, una mayor supervivencia celular por evasión de la apoptosis, una pérdida del control del ciclo celular, mayor desdiferenciación y aumento de la migración celular.

A diferencia del carcinoma de mama, en el que el porcentaje de casos con sobreexpresión o amplificación de HER2 está relativamente bien establecido y su determinación hoy es habitual, la alteración de HER2 en otros tumores epiteliales ha sido descrita con una notable disparidad de resultados^{14,15}. Los primeros trabajos sobre la amplificación del gen *HER2* y su sobreexpresión proteica en carcinomas gástricos fueron publicados en 1986³. Desde entonces, multitud de estudios han confirmado la presencia de amplificación y sobreexpresión de este oncogén y del receptor que codifica en el cáncer gástrico. La gama de resultados en los estudios basados en series analizadas por inmunohistoquímica es muy amplia, desde un 8,25%¹⁶ hasta un 53,4%¹⁷. Asimismo, numerosos trabajos han investigado la amplificación de *HER2* en cáncer gástrico mediante técnicas de hibridación *in situ*, fundamentalmente FISH o CISH. Aunque algo menor que en el caso de la sobreexpresión del receptor, sigue existiendo cierta disparidad en los casos amplificados, con tasas que oscilan entre el 16%¹⁸ y el 27,1%¹⁹. Las tablas 1 y 2 resumen los trabajos publicados

Tabla 1 Estudios de sobreexpresión de HER2 en el carcinoma gástrico

Referencia	n	Procedencia	Sobreexpresión, %	Casos intestinales, %	Anticuerpo
Yonemura Y 1991	260	Japón	11,9	No especificado	Policlonal pAB-1 (Triton Bioscience)
Uchino S 1993	214	Japón	9,8	No especificado	Policlonal (Nichirei)
Lee HR 1996	225	Corea	27,4	No especificado	Monoclonal TAB-250 (Triton Bioscience)
Shun CT 1996	112	Taiwán	30,3	56	Monoclonal 3B5 (Oncogene Science)
Ooi A 1998	396	Japón	10,1	No especificado	Monoclonal CB11 (Novocastra) + Policlonal (Nichirei)
Ishikawa T 1997	375	Japón	10,4	57	Monoclonal CB11 (Novocastra)
Wu MS 1997	163	Taiwán	26,4	54	Monoclonal 3B5 (Oncogene Science)
Allgayer H 2000	189	Alemania	53,4	53	Monoclonal 3B5 (Oncogene Science)
Ougolkov A 2000	116	Japón	16	No especificado	Policlonal (Nichirei)
Sanz-Ortega J 2000	143	España	31	75,5	Monoclonal CB11 (Novocastra)
Wang YL 2002	100	Taiwán	32	85	Policlonal A0485 (Dako)
Ghaderi A 2002	146	Irán	16,4	65	Monoclonal ICR12 (Santa Cruz Biotech)
Takehana T 2002	352	Japón	8,2	No especificado	Policlonal (Nichirei)
Pinto-de-Sousa J 2002	147	Portugal	15,3	51	Policlonal A0485 (Dako)
Lee KE 2003	6.141	Corea	17	38	Monoclonal CB11 (Novocastra)
Yano T 2006	200	Japón	23	100	Herceptest (Dako)
Park DI 2006	182	Corea	15,9	48	Policlonal (Zymed Labs)
Hofmann M 2008	168	China/México/Alemania	10,7	71	Herceptest (Dako), modificado
Barros-Silva JD 2009	463	Portugal	9,3	40	Monoclonal CB11 (Novocastra)
Marx AH 2009	166	Alemania	16,9	63	Heceptest (Dako)
Yu GZ 2009	1.143	China	28	No especificado	Monoclonal SP3 (Lab Vysion)
Bang YJ 2009	3.807	Global	10,97	52	Herceptest (Dako)
Grabsch 2010	924	Alemania/Reino Unido	6-10	62	Monoclonal CB11 (Novocastra)

Tabla 2 Estudios de amplificación del oncogén *HER2* en el carcinoma gástrico

Referencia	n	Procedencia	Amplificación, %	Casos intestinales, %	Técnica de hibridación <i>in situ</i>
Ishikawa T 1997	120	Japón	18,1	No especificado	FISH 17q11.2-12 specific
Tanner M 2005	131	Finlandia	17,3	49	Cosmid probe (Oncor)
Parik D 2006	182	Corea	3	48	CISH SPOT-Light (Zymed)
Yano T 2006	199	Japón	27,1	100	FISH PathVysion (Vysis), CISH SPOT-Light (Zymed)
Hofmann M 2008	168	China/México/Alemania	17,4	71	FISH PathVysion (Vysis)
Marx AH 2009	166	Alemania	16	63	FISH PathVysion (Vysis)
Barros-Silva JD 2009	463	Portugal	8,23	40	HER2 FISH probe (MP Biomedicals)
Bang YJ 2009	3.807	Global	23,05	52	FISH PharmDx (Dako)
García-García E 2010	166	España	17,5 (FISH), 21 (SISH)	52	FISH PathVysion (Vysis) modificado +, SISH INFORM™ (Ventana)

con mayor casuística¹⁰. De manera similar a lo ocurrido inicialmente en los estudios en neoplasias malignas de mama, la concordancia entre la sobreexpresión del receptor *HER2* y la presencia de amplificación de su gen es motivo de cierta controversia. En el momento actual, en el carcinoma de mama se considera que la sobreexpresión proteica se debe principalmente a la amplificación del gen, que conlleva un aumento en su transcripción y, por lo tanto, un incremento en el número de receptores en la membrana celular²⁰. En los adenocarcinomas gástricos, la concordancia entre la expresión proteica y la amplificación de *HER2* ha sido estudiada en varios trabajos, con resultados diversos^{5,10,18,21}. La mayoría de estos estudios parecen indicar que, al igual que ocurre en el cáncer de mama, la amplificación del oncogén *HER2* determina la sobreexpresión proteica del receptor.

El posible valor pronóstico del oncogén *HER2* en el carcinoma gástrico es un tema controvertido^{1,22-24}. 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 negativo¹⁰. Queda por explicar si la mejor supervivencia obtenida con quimioterapia estándar en pacientes con sobreexpresión/amplificación de *HER2* está relacionada con la propia alteración molecular o el mayor porcentaje de casos de tipo intestinal entre ellos o se debe a factores aún no conocidos.

En cuanto al valor predictivo de *HER2* en la respuesta a los tratamientos biológicos dirigidos al receptor, únicamente el ensayo ToGA ha demostrado una clara asociación entre la alteración y la respuesta.

En el desarrollo de trastuzumab (Herceptin®, Roche, Basilea), primer anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor *HER2* utilizado en humanos, diversos ensayos preclínicos demostraron la actividad antitumoral de este fármaco tanto en monoterapia como en combinación con agentes citotóxicos en líneas celulares de adenocarcinomas gástricos²⁵. Con la excepción de los ensayos clínicos GastroHER y ToGA^{1,4}, la información sobre el empleo de trastuzumab en pacientes con carcinoma gástrico proviene de unos pocos casos individuales publicados^{26,27} y de ensayos clínicos no aleatorizados de fase 2, de los cuales se dispone sólo de información preliminar^{28,29} (tabla 3). El estudio GastroHER, primer estudio de fase 2 completado en carcinoma gástrico *HER2* positivo⁴, fue llevado a cabo en España de manera multicéntrica. En él se determinó el estado del receptor *HER2* por inmunohistoquímica o la posible amplificación del gen por FISH en 228 pacientes con carcinoma gástrico metastásico y sin tratamiento previo para su enfermedad diseminada. De estos, 22 pacientes (10%) mostraron amplificación y/o sobreexpresión moderada o fuerte por inmunohistoquímica y recibieron tratamiento con trastuzumab y cisplatino. Se obtuvo una tasa de respuestas objetivas del 33% y un control de la enfermedad en el 64% de los casos. La mediana del tiempo a la progresión tumoral obtenida fue de 5,1 meses y la supervivencia global, de 12,9 meses, claramente superior a lo obtenido con esquemas de quimioterapia estándar hasta la fecha.

El primer ensayo clínico aleatorizado de fase 3 comparando el tratamiento con un esquema quimioterápico estándar como cisplatino/5-Fu o cisplatino/capecitabina frente a la combinación de quimioterapia y un agente

Tabla 3 Resumen de los ensayos clínicos publicados sobre trastuzumab en carcinoma gástrico

Estudio	Tratamiento	n (cribado)	Tasa de respuesta, %	TCE, %	ILP (meses)	SG med (meses)
Gastroher	C/Herceptin	22 (228)	31	63,6	5,1	12,9
ToGA	CF± Herceptin	584 (3.807)	34,5 CF; 47,3 CF + H	ND	5,5 CF; 6,7 CF + H	11,1 CF; 13,8 CF + H
Nicholas	TC + Herceptin	9 (55)	80	100	ND	ND
Rech	Herceptin 2. ^a línea	3 (33)	33 (1 paciente)	ND	ND	ND

C: cisplatino; F: fluoropirimidina; ILP: intervalo libre de progresión; ND: no determinado; SG: supervivencia global; T: docetaxel; TCE: tasa de control de enfermedad.

anti-HER2 (trastuzumab) en pacientes con carcinoma gástrico metastásico ha sido el denominado ensayo ToGA¹. En este estudio multicéntrico (24 países) se incluyó a pacientes con sobreexpresión 3+ de HER2 medida por inmunohistoquímica o con amplificación de HER2 determinada por FISH. Las determinaciones fueron realizadas de manera centralizada en un laboratorio de referencia y, previamente al desarrollo de este estudio, se estableció un consenso entre los patólogos participantes⁵. Tras realizar el cribado mediante inmunohistoquímica y FISH a 3.803 posibles candidatos, de los que 810 presentaron finalmente sobreexpresión del receptor o amplificación del gen HER2, se incluyó en el estudio a 594 pacientes. Estos fueron aleatorizados a recibir cisplatino y 5-Fu o capecitabina o el mismo esquema quimioterápico más trastuzumab. El objetivo principal del estudio era encontrar una diferencia significativa en la supervivencia global de los pacientes a favor de la rama experimental con trastuzumab y, entre los objetivos secundarios, un aumento en la tasa de respuestas objetivas al tratamiento y en el intervalo libre de progresión tumoral. Tras un seguimiento medio de 17,1 meses para la población total del estudio, los resultados fueron comunicados en el Congreso Americano de Oncología Clínica en junio de 2009^{6,7} y publicados finalmente en agosto de 2010¹.

En este estudio se encontró una asociación estadísticamente significativa de la sobreexpresión/amplificación de HER2 con los adenocarcinomas de tipo intestinal respecto a los difusos (el 32,3 frente al 61% respectivamente) y con los tumores localizados en la unión gastroesofágica frente al resto de localizaciones tumorales (el 33,2 frente al 20,9%). La concordancia entre los resultados del análisis inmunohistoquímico y el análisis por FISH del estado de HER2 fue del 87,3%. Se logró el resultado principal del estudio, y la adición de trastuzumab al tratamiento quimioterápico estándar consiguió un incremento en la supervivencia global de 2,7 meses (13,8 frente a 11,1; *hazard ratio* [HR]=0,74; p=0,0046). Asimismo, el grupo que recibió trastuzumab y quimioterapia logró un mayor tiempo libre de progresión tumoral (6,7 frente a 5,5 meses; HR=0,71; p=0,002) y un incremento en la tasa de respuestas tumorales objetivas (el 47,3 frente al 35,5%; p=0,0017). Un subanálisis de este estudio incluyendo únicamente los casos con resultado inmunohistoquímico 3+, 2+ y amplificación determinada por FISH concluyó que la eficacia del tratamiento podría ser mayor en el subgrupo con expresión del receptor más intensa, al objetivar un incremento en la supervivencia global de 4,2 meses en el grupo que recibió trastuzumab (11,8 meses en el brazo control y 16 meses en el brazo experimental; HR=0,65; intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,51-0,85). La tolerancia al tratamiento combinado con trastuzumab y quimioterapia en el ensayo ToGA fue adecuada, y no se demostraron diferencias

significativas en la toxicidad hematológica ni extrahematológica entre las dos ramas del estudio, a excepción de una mayor incidencia de descensos asintomáticos en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en el grupo que recibió trastuzumab. Un análisis posterior de la calidad de vida de los pacientes incluidos en el ensayo tampoco encontró diferencias entre las dos ramas del estudio³⁰.

Recientemente se han publicado, en modelos celulares de carcinoma gástrico con amplificación del oncogén HER2 tratados de forma combinada con lapatinib (un inhibidor dual de la actividad tirosinasa HER1/HER2) y trastuzumab, resultados sinérgicos, logrando regresiones tumorales en algunos de los xenoinjertos tumorales estudiados³¹.

Dado el aumento en la supervivencia global, supervivencia que supone la administración de trastuzumab en combinación con quimioterapia en pacientes con sobreexpresión o amplificación de HER2, resulta esencial una correcta determinación del estado de este que permita seleccionar con exactitud a los pacientes con mayores posibilidades de respuesta al tratamiento contra esta diana molecular.

La metodología del ensayo ToGA

La optimización de la determinación de HER2 previa al ensayo ToGA

Como criterio de inclusión en el ensayo ToGA, se requería confirmar la sobreexpresión y/o amplificación de HER2 en los pacientes con carcinoma gástrico. Para el estudio de HER2, se adoptaron los criterios establecidos por Hofmann et al en un estudio exploratorio previo en el que se analizaron un total de 178 tumores, resultando 168 muestras valorables para la determinación de HER2⁵. La localización de los tumores analizados fue estómago en 149 casos, unión gastroesofágica en 16, esófago en 3, 2 muestras de recidivas tumorales y 1 metástasis. Los tumores fueron catalogados según la clasificación de Lauren con la siguiente distribución: 120 de tipo intestinal, 39 difusos y 9 mixtos.

Las muestras procedían de tumores fijados en formol e incluidos en parafina. El estudio para la determinación de la proteína HER2 mediante inmunohistoquímica se realizó con HercepTest™ mediante un procedimiento manual, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dako, Glostrup, Dinamarca). El análisis del estado del gen HER2 se realizó mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con el HER2 pharmDx™ (Dako), con importantes modificaciones del protocolo en cuanto a: a) las condiciones de pretratamiento proteolítico con pepsina, que se establecieron en 2 min a 37°C, y b) el empleo de un baño termostático de aceite a

107 °C en lugar del baño de agua a 95-98 °C durante 10 min que establece el protocolo para la desnaturalización⁵.

En un primer abordaje, el estudio inmunohistoquímico se valoró siguiendo los criterios de evaluación del HercepTestTM aprobados para carcinoma de mama, manteniendo un punto de corte en un 10% de células tumorales con expresión y sin incorporar las modificaciones establecidas en el consenso ASCO/CAP publicado en el año 2007³². El estudio inmunohistoquímico puso de manifiesto diferencias muy relevantes en los patrones de expresión proteica entre el carcinoma gástrico y el carcinoma de mama. En primer lugar, se podía observar con frecuencia una tinción incompleta (basolateral) que daba como resultado un número elevado de casos clasificados como HER2 negativo, atribuible a las particularidades de las células secretoras gástricas y a la mayor formación de luces glandulares en el carcinoma gástrico que en el de mama. En segundo lugar, se identificó una mayor heterogeneidad en la expresión de HER2 (4,8% de los casos) que la observada en el carcinoma de mama y que suponía clasificar como negativos tumores con expresión intensa pero con un porcentaje de celularidad positiva menor del 10%. Teniendo en cuenta estas dos circunstancias, se clasificaron los casos en esta serie de la siguiente manera: 121 (72%) tumores fueron considerados HER2 negativos; 29 (17,3%) tumores, HER2 dudosos, y 18 (10,7%) tumores, como HER2 positivos.

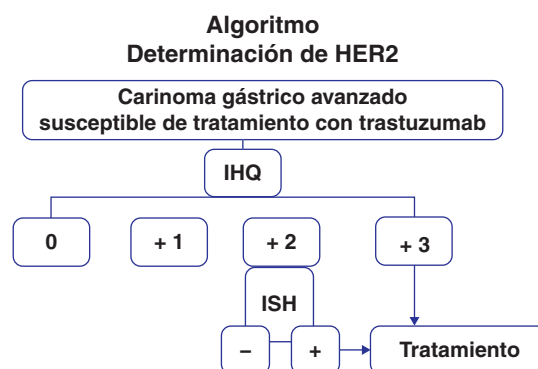
El estudio de FISH dio como resultado un total de 29 casos con amplificación para *HER2*, lo que suponía un 17,26% del total de carcinomas gástricos analizados. Se consideró un carcinoma gástrico con amplificación del gen *HER2* cuando la razón *HER2*/centrómero del cromosoma 17 fue ≥ 2 .

En este estudio preliminar de Hofmann et al, y siguiendo los criterios adaptados al carcinoma gástrico, la concordancia entre las técnicas de inmunohistoquímica y FISH alcanzó un 93,5%, recomendando ambas como técnicas apropiadas para la determinación de HER2 en pacientes con carcinoma gástrico y con objeto de su selección para tratamiento con trastuzumab⁵.

La determinación de HER2 en el ensayo ToGA

En el ensayo ToGA, de un total de 594 pacientes, 584 fueron incluidos en el análisis principal del estudio¹. El estado de HER2 mostró la siguiente distribución: 131 pacientes (22,4%) con FISH amplificado e inmunohistoquímica negativa (0 y 1+), 159 pacientes (27,2%) con FISH amplificado e inmunohistoquímica 2+, 256 pacientes (43,8%) con FISH amplificado e inmunohistoquímica positiva (3+), 15 pacientes (2,7%) con FISH no amplificado e inmunohistoquímica positiva y 23 pacientes (3,9%) mostraron resultados positivos por FISH o inmunohistoquímica. Analizando el tipo de muestra estudiada, se observó que los porcentajes de positividad para HER2 eran mayores en las muestras procedentes de biopsias endoscópicas tanto por inmunohistoquímica (11,26%) como por FISH (24,36%), frente a las muestras procedentes de especímenes quirúrgicos, el 10,39% con inmunohistoquímica y el 20,52% con FISH. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa en el análisis mediante FISH.

El algoritmo diagnóstico propuesto en este estudio para la determinación de HER2 en carcinoma gástrico recomendó la inmunohistoquímica como técnica de primera



IHQ, inmunohistoquímica, HIS, hibridación *in situ*
Fase post-analítica (interpretación) basada en Virchows Arch 2010; 457: 299-307

Figura 2 Algoritmo para la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico.

elección, siendo aptos para el tratamiento con trastuzumab los pacientes con una expresión catalogada como 3+ y los pacientes con expresión 2+ en los que confirmaba una amplificación de *HER2* mediante una técnica de hibridación *in situ* (fig. 2).

La determinación de HER2 después del ensayo ToGA

El objetivo del estudio post-ToGA fue validar el procedimiento del análisis de HER2 en carcinoma gástrico, analizando en primer lugar la reproducibilidad del método inmunohistoquímico empleado por múltiples patólogos en diferentes laboratorios⁸. Para ello se analizó la variabilidad entre laboratorios utilizando una micromatriz de tejidos de 30 muestras de carcinoma gástrico sobre la que se emplearon diferentes métodos inmunohistoquímicos. Con los datos obtenidos, se elaboró una guía consenso sobre la lectura de HER2. En segundo lugar, se analizó la reproducibilidad de los criterios de interpretación entre distintos observadores, analizando una muestra más amplia de casos cuya inmunohistoquímica se había realizado en un mismo laboratorio. Finalmente, para validar la guía de consenso establecida, se analizó otra serie de casos de la práctica diaria de cinco laboratorios.

Para que la lectura de HER2 sea reproducible, el grupo de consenso recomienda considerar como válida la magnificación del microscopio que permite visualizar claramente la tinción lateral o basolateral de membrana (lineal e intercelular): «regla del aumento del microscopio».

Los autores establecen como criterio de positividad la presencia de al menos un 10% de las células tumorales con expresión de HER2 en una pieza de resección. En los casos de biopsias endoscópicas, se establece como válido un mínimo de 5 células con expresión del receptor, ya que con menos de 5 células la concordancia entre observadores fue muy baja.

Se recomendó el uso de pruebas aceptadas por la FDA y/o EMEA en la selección de los pacientes HER2 positivos en carcinoma gástrico. En la comparación entre los diferentes métodos inmunohistoquímicos, el anticuerpo 4B5 (Ventana Medical Systems) mostró al menos la misma sensibilidad que Herceptest (Dako), con una mayor concordancia de

Tabla 4 Determinación de HER2 en el carcinoma gástrico

Indicación	Tipos de muestras
A todo paciente diagnosticado de adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica en estadio avanzado antes de iniciar el tratamiento con trastuzumab	Biopsias o pieza quirúrgica procedente del tumor
	En muestras subóptimas se recomienda el uso de técnicas de hibridación <i>in situ</i>
	Las muestras citológicas sólo se recomiendan para estudios de hibridación <i>in situ</i> y siempre que no exista muestra de tejido alternativa

interpretación de resultados entre laboratorios y una mejor correlación entre los casos con inmunohistoquímica 3+ y *HER2* amplificado⁸.

Además, se recomienda la participación en programas de control de calidad, tanto de inmunohistoquímica como de técnicas de hibridación *in situ*, específicos para carcinoma gástrico, ya que la lectura de *HER2* difiere de la aplicada en carcinoma de mama.

La aplicación de estas normas de interpretación post-ToGA a una serie de 153 tumores de manera paralela al estudio en las mismas de la amplificación de *HER2* por FISH, demostró una concordancia completa en los casos con inmunohistoquímica 3+ e hibridación *in situ* positiva. A pesar de ello, ni el estudio ToGA ni en este trabajo^{1,8} queda claramente establecido si existe una correlación predictiva de respuesta entre el tratamiento con trastuzumab y la razón de amplificación del gen *HER2* en casos de carcinoma gástrico.

Una observación final hace referencia a la alta heterogeneidad de la expresión de *HER2* en carcinoma gástrico, por lo que se recomienda realizar un cribado de toda el área tumoral, especialmente si se utiliza el método de FISH. Los autores señalan que el uso de técnicas de hibridación en campo claro facilitaría la detección de focos de amplificación de *HER2* en casos heterogéneos, dado que se dispone de un mejor control morfológico.

Fase pre-analítica en la determinación de *HER2* en el carcinoma gástrico

Momento de la determinación

Se realizará la determinación del estado de *HER2* en los adenocarcinomas gástricos y de la unión esofagogastrica en estadio avanzado, pues el uso terapéutico de trastuzumab por el momento está aprobado sólo para este estadio (tabla 4). Es probable que en un futuro próximo, si los ensayos clínicos en marcha así lo determinan, sea necesario

analizar el estado de *HER2* sistemáticamente en todos los casos potencialmente subsidiarios de un tratamiento anti-*HER2*, independientemente del estadio, como ya ocurrió en el carcinoma de mama.

Tipos de muestras

Tanto las muestras obtenidas por biopsia endoscópica como las procedentes de resección quirúrgica son adecuadas para la determinación de *HER2* mediante inmunohistoquímica y, en su caso, hibridación *in situ*. Al tratarse de tumores en estadio avanzado, el material disponible generalmente será una biopsia endoscópica. Aunque inicialmente pudiera considerarse que las secciones procedentes de las piezas quirúrgicas pueden ser más representativas, dada la heterogeneidad de la expresión de *HER2* en los adenocarcinomas gástricos, las biopsias endoscópicas son igualmente útiles para realizar estas determinaciones, siempre y cuando se disponga de un número mínimo de muestras (6-8 fragmentos). De hecho, hay indicios de una mayor sensibilidad de las biopsias endoscópicas a la hora de diagnosticar casos positivos con relación a las piezas quirúrgicas¹⁰. Este hallazgo sorprendente puede justificarse, al menos en parte, por los siguientes motivos:

- Los casos biopsiados mediante endoscopia, sin resección quirúrgica posterior, corresponden en gran medida a tumores avanzados, metastásicos o recidivantes, que podrían presentar activación de *HER2* con mayor frecuencia que los precoces, si es que la activación de *HER2* no es un evento temprano en la carcinogénesis de la mucosa gástrica.
- Los criterios para la valoración de *HER2* en las biopsias endoscópicas son diferentes de los utilizados en las piezas quirúrgicas, y el umbral para considerar un caso positivo es también distinto, siendo más estrictos para las piezas quirúrgicas que para las biopsias endoscópicas⁸.
- Las biopsias endoscópicas con frecuencia están mejor fijadas y procesadas que las piezas quirúrgicas, las cuales presentan una mayor tasa de falsos negativos (por fijación inadecuada). Sin embargo, las biopsias endoscópicas pueden presentar artefactos de retracción, aplastamiento instrumental o «efecto margen», que inducen falsos positivos con mayor frecuencia.

Las muestras citológicas no son recomendables para realizar el estudio de *HER2*, aunque se pueden utilizar extensiones celulares en caso de que no se disponga de otros tipos de muestras más adecuadas. En estos casos se recomienda la realización de técnicas de hibridación *in situ*, ya que estas presentan mejores resultados que las de inmunohistoquímica, pues la integridad de las membranas celulares en las preparaciones citológicas suele estar dañada y la evaluación de la inmunotinción es compleja o imposible.

Si disponemos de muestras de lesiones metastásicas, en caso de que el tumor primario no sea asequible o haya resultado negativo, se recomienda estudiar *HER2* en dichas lesiones.

En caso de que las muestras sean subóptimas desde el punto de vista preanalítico, se recomienda realizar hibridación *in situ* como primera técnica de elección. En nuestra

experiencia no hay menor rentabilidad analítica con la hibridación *in situ* sobre bloques de parafina de varios años de antigüedad, como han señalado algunos autores³³.

Fijación

La fijación se realizará siempre en formol neutro tamponado al 10%, a temperatura ambiente y constante. Una vez obtenida la muestra, la fijación se llevará a cabo lo antes posible y, en caso de piezas quirúrgicas, siempre antes de 30 min tras la extirpación³⁴. Es aconsejable manipular la pieza de gastrectomía (apertura y colocación en un recipiente adecuado) cuando se reciba en el laboratorio para facilitar la fijación. Se recomienda que el volumen del fijador sea como mínimo 4 veces el volumen de la pieza.

Las técnicas de determinación de HER2 mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* están validadas para muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina, por lo que debe evitarse la realización de las mismas en otros tipos de muestras.

En general, para la inmunohistoquímica no se recomienda fijar las muestras menos de 6 h³⁵ ni más de 48 h³⁴. El tiempo óptimo de fijación para las biopsias gástricas es de entre 6 y 24 h. Las piezas quirúrgicas deben fijarse entre 24 y 48 h. Debe tenerse en cuenta que la penetración del formol (1 mm/h) no significa fijación y que la reacción para la formación de los enlaces metilenglicol no es inmediata, sino que se cuantifica en horas³⁶. Se considera que un defecto de fijación es más crítico en inmunohistoquímica que la sobrefijación³⁵. La fijación excesiva suele inducir disminución de la inmunotinción y falsos negativos, en tanto que la fijación insuficiente produce un predominio proporcional de influencia de fijadores alcohólicos y, por lo tanto, una mayor inmunorreactividad y falsos positivos. Se desaconsejan los métodos de fijación rápida mediante microondas, ya que suelen dar como resultado una fijación heterogénea que varía con el tamaño de la muestra y el tipo de tejido³⁵.

Procesamiento y sección

Para un adecuado procesamiento, en el caso de piezas quirúrgicas, se recomienda incluir tejidos que no excedan de 2 cm de longitud y 3 mm de grosor³⁴. Las muestras se procesarán sistemáticamente evitando el empleo de métodos de inclusión rápida basados en el uso del microondas.

Las técnicas de determinación de HER2 se llevarán a cabo en secciones de 4 μm y de alta calidad evitando irregularidades del grosor, ralladuras, burbujas o cualquier otro artefacto que dificulte la realización e interpretación de las técnicas. Se recogerán sobre portaobjetos tratados que impidan su despegamiento durante la realización de las técnicas. El secado de las secciones se realizará a 60 °C durante 1 h o a 45 °C durante toda la noche.

Cualquier incidencia ocurrida durante los procesos de fijación o inclusión en parafina debe documentarse para considerarla a la hora de la valoración, debiéndose reflejar en el informe, si ha sido de la suficiente entidad.

Para la determinación de HER2 se recomienda el empleo de secciones recientes (del día anterior). Nunca se utilizarán secciones almacenadas durante más de 6 semanas si el estudio de la expresión de HER2 se realiza mediante

inmunohistoquímica ni durante más de 6 meses si la determinación se lleva a cabo por medio de hibridación *in situ*, ya que en caso contrario hay mayor probabilidad de falsos negativos. De todos modos, siempre que se prevea una demora en la realización de las técnicas, es conveniente depositar una capa protectora de parafina sobre las secciones³⁷ a fin de prevenir la pérdida de antigenicidad que se produce por fotooxidación y secado de los tejidos³⁸.

El bloque de parafina seleccionado para la realización de las técnicas debe elegirse tras la observación microscópica de todas las preparaciones. Debe ser representativo de la neoplasia, evitando áreas hipocelulares, con necrosis, hemorragia, escasa calidad tisular, autólisis o artefactos. En tumores mixtos se deben seleccionar áreas con histología de tipo intestinal, pues la probabilidad de observar sobreexpresión de HER2 es mucho mayor que en las áreas de tipo difuso.

Para evitar problemas de tinción irregular o fondo en la inmunohistoquímica, es imprescindible desparafinar adecuadamente las muestras. El primer baño de xilol debe desecharse diariamente corriendo toda la batería y poniendo un baño adicional de xilol antes de los alcoholes. Hay que recordar que, cuando se vaya a efectuar la determinación de HER2 sobre secciones protegidas con una capa de parafina, se requiere un desparafinado más riguroso. Se recomienda en este caso duplicar el tiempo de desparafinado o introducir las preparaciones en xilol en una estufa a 60 °C durante 10 min antes de realizar el desparafinado habitual.

Recomendaciones para la determinación inmunohistoquímica de HER2

Método

Para la determinación inmunohistoquímica de HER2 se recomienda el empleo de *kits* diagnósticos certificados por la FDA y/o la EMEA. El uso de *kits* estandarizados requiere seguir estrictamente las instrucciones del fabricante, sin introducir modificación alguna. Aun utilizando estos métodos aprobados es recomendable, al comienzo de su utilización, proceder a la validación de la técnica en cada laboratorio, para lo que se recomienda al menos realizar 25 casos positivos y 25 casos negativos, cotejando los resultados con un centro de referencia y alcanzando una concordancia del 95%.

El número de pruebas anuales que se considera óptimo para garantizar la suficiencia técnica del laboratorio es de 250, incluyendo las determinaciones de HER2 para el carcinoma de mama.

Controles

Los *kits* con que se realizan los test estandarizados proporcionan un número de controles positivos y negativos procedentes de líneas celulares. Como el número de controles es limitado, se recomienda agrupar casos de carcinoma de mama y de carcinoma gástrico.

Además de los controles comerciales citados, se recomienda el empleo de controles propios con las condiciones de fijación y procesamiento propias del laboratorio. Debe emplearse un caso con inmunotinción débil-moderada (2+)

Tabla 5 Causas de rechazo de la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico

<p>Cuando no se alcancen los requerimientos preanalíticos (fijación diferente a formaldehído tamponado al 10%) y analíticos recomendados</p> <p>Resultados insatisfactorios en los controles</p> <p>Ausencia de componente tumoral en la sección histológica</p> <p>Presencia de marcado artefacto técnico o de procesamiento</p> <p>Resultados negativos en secciones montadas durante un periodo superior a 4-6 semanas (que no hayan sido parafinadas y/o guardadas a 4°C)</p>

que nos permita detectar fácilmente ligeras pérdidas de sensibilidad.

Causas de rechazo de la prueba

Las causas de rechazo de la prueba se resumen en la [tabla 5](#).

Valoración de los resultados

Como se recomienda en el consenso para la determinación de HER2 en el carcinoma de mama, la valoración de la positividad inmunohistoquímica de HER2 tiene que ser realizada por un patólogo. Se seguirán criterios similares en su interpretación, como su valoración exclusivamente en el componente tumoral y considerar la tinción de membrana en número de células e intensidad.

Sin embargo, hay algunas diferencias con la valoración en el carcinoma de mama, que se resumen a continuación^{5,8}:

- Tinción de la membrana. El patrón de tinción de membrana en el carcinoma de estómago es muy frecuentemente basolateral o lateral sin tinción del polo luminal. A efectos de valoración, se concluyó considerar como positiva la tinción circunferencial o completa de membrana y/o la basolateral, aunque no sea completa. La intensidad de la tinción se considera: negativa, apenas perceptible, moderada e intensa.
- Porcentaje de células positivas. La sobreexpresión de HER2 en el carcinoma gástrico es mucho más heterogénea que en el cáncer de mama. Por lo tanto, los criterios son diferentes según se esté valorando una pieza quirúrgica o una biopsia endoscópica. En la valoración de las muestras endoscópicas, se considerará positivo el test cuando se detecta un grupo de al menos cinco células con tinción de membrana intensa (3+), independientemente del porcentaje que suponga. Cuando el estudio se realiza en piezas de resección quirúrgica, se requiere que la positividad del HER2 sea $\geq 10\%$ del componente tumoral.
- Puntuación. En la [tabla 6](#) se exponen las recomendaciones de calificación.
- Fase postanalítica (interpretación) automatizada. Según algunos autores, el empleo de sistemas automáticos de análisis de imagen minimiza la variabilidad de la interpretación entre observadores y constituye una herramienta precisa y eficaz para la valoración de la inmunotinción de HER2^{39,40}.

Control de calidad

Para el control de calidad de las determinaciones de HER2 en los respectivos laboratorios, es aconsejable tener presente que las biopsias endoscópicas evaluadas tienen que contener un mínimo de 6 fragmentos tumorales.

De forma indirecta, es importante considerar los porcentajes de casos positivos publicados en diversas series y que indican que:

- 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%).

Por lo tanto, es muy aconsejable que cada año los laboratorios calculen el porcentaje de casos correspondientes a cada una de las puntuaciones (0, 1+, 2+ y 3+) para confirmar si sus resultados se ajustan a los obtenidos en las grandes series; dichos porcentajes son importantes a la hora de valorar si la determinación se está realizando adecuadamente.

Asimismo, es muy importante recordar que aproximadamente un 25% de los casos positivos por FISH son negativos (0 o 1+) por los estudios de inmunohistoquímica.

Por último, y como se refleja en el apartado de control de calidad, cada laboratorio tiene que añadir controles internos y participar en evaluaciones externas con otros laboratorios o centros acreditados.

Tabla 6 Interpretación de la determinación inmunohistoquímica de HER2

Se evaluará exclusivamente en el componente infiltrante y la tinción de membrana:	
Negativo (0)	Ausencia de tinción o tinción en menos del 10% de las células (piezas quirúrgicas)*
Negativo (1+)	Tinción de membrana, al menos lateral, casi imperceptible (visible sólo con el objetivo de x40) en al menos el 10% de las células (piezas quirúrgicas)*
Indeterminado (2+)	Tinción de membrana, al menos lateral, moderada (visible con los objetivos de x10-x20) en al menos el 10% de las células (piezas quirúrgicas)*
Positivo (3+)	Tinción de membrana, al menos lateral, intensa (visible con los objetivos de x2,5-x5) en al menos el 10% de las células (piezas quirúrgicas)*

* En las biopsias endoscópicas se consideran positivos nidos tumorales de al menos cinco células, independientemente del porcentaje de tinción (p. ej., menos del 10%).

Tabla 7 Datos requeridos en el informe de la determinación de HER2 mediante inmunohistoquímica

Identificación del paciente
Identificación del médico solicitante
Fecha de la petición y determinación
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 tumorales
Tipo de fijador (obligatorio), tiempo hasta la fijación (recomendable) y tiempo de fijación (recomendable)
Anticuerpo y método utilizado (clon, proveedor, especificar si está aprobado por FDA u otra agencia reguladora)
Método de evaluación (semicuantitativo, análisis de imagen)
Idoneidad de la muestra (adecuada/inadecuada para diagnóstico)
Interpretación de los resultados:
– Porcentaje de células tumorales positivas
– Puntuación: 0, 1+, 2+, 3+ o no interpretable (conforme a la referencia 8)
– Tinción heterogénea frente a homogénea
Especificar si se participa en algún control de calidad externo y su nombre
Nombre de la persona que ejecuta la técnica
Nombre y firma del patólogo responsable del estudio
Incluir una frase que recoja la idea de que el informe está diseñado conforme a las recomendaciones del Consenso Nacional SEAP-SEOM para la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico

Personal

El número de técnicos de laboratorio implicados en la realización de la prueba y el número de patólogos que la interpreten deben ser los menores posible, a fin de asegurar una adecuada experiencia. Tanto técnicos como patólogos deben haber seguido un periodo de formación. Para la validación de la fase postanalítica (interpretación), se recomienda una concordancia con el resultado de referencia de al menos un 95% en 50 casos. Periódicamente se renovará dicha capacitación en sesiones de trabajo dedicadas al efecto.

Informe

Los datos requeridos en el informe se resumen en la [tabla 7](#).

Recomendaciones para la determinación de HER2 mediante hibridación *in situ*

Método

Se recomienda el empleo de *kits* diagnósticos certificados por la FDA y/o la EMEA, con previa validación en el laboratorio al implementar la técnica. Esta validación se podrá realizar con 25 casos positivos y 25 casos negati-

vos, cotejando los resultados con un centro de referencia, y obteniendo una concordancia de al menos el 95%. Cuando un laboratorio validado para la realización de FISH incorpora otra técnica de hibridación *in situ* en campo claro para el diagnóstico, puede proceder a una validación interna en el laboratorio, comparando la nueva técnica frente a FISH con la que se deberá alcanzar también un 95% de concordancia. El uso de *kits* estandarizados requiere seguir estrictamente las instrucciones del fabricante, sin introducir modificación alguna. Se recomienda encarecidamente el uso de *kits* que incluyan una sonda centromérica, con el objetivo de diagnosticar adecuadamente los casos polisómicos.

El número de pruebas anuales considerado óptimo para garantizar la suficiencia técnica del laboratorio es de 100 determinaciones de FISH en cualquier tipo de tumor. Se recomienda utilizar secciones histológicas completas de 4-5 μm de grosor con el fin de minimizar la pérdida de señales en el eje z. En las técnicas de FISH deben de emplearse filtros de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión adecuados a los fluorocromos de las sondas que contiene el *kit*. Para las sondas marcadas en FITC, excitación en 495 nm y emisión en 520 nm; para Texas Red, excitación en 596 nm y emisión en 615 nm; para Rodamina, excitación en 540 nm y emisión en 570 nm.

Controles

Con técnicas de hibridación *in situ*, el caso de estudio sirve de control al presentar siempre señales tanto en las células tumorales como en las normales acompañantes (linfocitos, fibroblastos, epitelio gástrico no tumoral, etc.). No obstante, el empleo de un control propio con las condiciones de fijación y procesamiento del laboratorio nos ayudará a interpretar si los casos con ausencia de hibridación se deben a problemas de la técnica o de la propia muestra en estudio.

Causas de rechazo de la prueba

No se considerará adecuada para la evaluación del número de copias del gen *HER2* cuando una prueba en la que no se alcancen los requerimientos preanalíticos (fijación) y analíticos (microtomía, intensidad de las señales de hibridación, presencia de ambas señales en los test de doble sonda) reseñados y los casos sin representación de células correspondientes a un carcinoma gástrico en número suficiente para su evaluación.

Valoración de los resultados

La interpretación de los resultados debe realizarla un patólogo. Si la lectura la realiza otra persona, es imprescindible la coordinación, validación y firma de la interpretación por un patólogo.

En el carcinoma gástrico, las señales de *HER2* en las técnicas de hibridación *in situ* pueden presentar diversos patrones de distribución, por lo que es importante realizar, si es posible, una evaluación de toda la sección histológica y una adecuada selección de los campos para la cuantificación de las señales. En un aumento intermedio (x200), se recomienda recorrer la superficie del tumor y valorar la

distribución de señales. La distribución de señales de HER2, por lo general, es homogénea dentro de toda la superficie del tumor, aunque puede detectarse una distribución heterogénea. En esta segunda situación, las células que muestran amplificación pueden agruparse, hablando de amplificación focal, o pueden entremezclarse con células tumorales no amplificadas, definiéndose como amplificación en mosaico.

En cualquiera de ambas situaciones hay que cuantificar al menos 20 células consecutivas en la zona de mayor amplificación (esto es, intensidad de señal). En biopsias endoscópicas, se requiere un mínimo de 5 células valorables. Para seleccionar las áreas puede ser muy útil observar previamente el patrón de tinción inmunohistoquímico. Se debe evaluar exclusivamente núcleos con calidad de hibridación adecuada de forma consecutiva y ajustar el enfoque micro a cada núcleo para identificar correctamente todas las señales presentes en el núcleo de las células.

Cuando se realice FISH como técnica de hibridación *in situ*, debido a la dificultad de evaluación en campo oscuro, se recomienda:

- Antes de realizar la técnica, un patólogo evaluará una sección consecutiva a la empleada para la técnica de hibridación y teñida con H-E con el fin de evitar áreas de inflamación intensa, necrosis, deficiente fijación o artefactadas. Podrá seleccionarse un área tumoral de 1 cm² para la hibridación, marcándola con un lápiz de diamante o rotulador indeleble en el reverso del corte de hibridación. Para seleccionar las áreas, puede ser muy útil observar previamente el patrón de tinción inmunohistoquímico.
- Se recomienda antes y durante la visualización de la técnica verificar la zona representativa del tumor sobre la sección de H-E y/o inmunohistoquímica. En casos con metaplasia enteroide, se debe tener especial precaución en la correcta identificación del componente tumoral.

La evaluación de la técnica de hibridación *in situ*, cuando se utilice doble sonda, se realizará según los siguientes criterios (tabla 8) sobre el cómputo global de las células valoradas:

- Se considerará un resultado no amplificado cuando la razón de señales del gen *HER2* frente a señales del cromosoma 17 sea < 2.
- Se considerará un resultado amplificado cuando la razón de señales del gen *HER2* frente a señales del cromosoma 17 sea ≥ 2 .
- Se considerará un resultado como polisomía cuando el número de señales del centrómero 17 por núcleo sea ≥ 3 y como monosomía cuando sea < 1,5. La monosomía 17 puede originar falsos positivos en la interpretación cuando se emplea doble sonda. Así, en algunos casos con monosomía 17 es evidente que la relación *HER2*/CEN17 ≥ 2 está causada por la existencia de una única copia del centrómero 17 y dos copias del gen *HER2*, por lo que estos casos no deberían interpretarse como amplificados⁴¹.
- Dos señales del mismo tamaño, separadas por una distancia menor o igual al tamaño de la señal, deben de ser consideradas como una única señal.

Tabla 8 Interpretación de la determinación de HER2 mediante hibridación *in situ*

Se evaluará sólo el componente tumoral
Se evaluarán al menos 20 células (pieza quirúrgica)
Interpretación (técnicas de doble sonda):
– No amplificado: razón de señales del gen <i>HER2</i> /señales del cromosoma 17 < 2
– Amplificado: razón de señales del gen <i>HER2</i> /señales del cromosoma 17 ≥ 2
– Polisomía: número de señales del centrómero 17 por núcleo ≥ 3
– Monosomía: número de señales del centrómero 17 por núcleo < 1,5*
– No interpretable: si ocurre al menos una de las siguientes circunstancias: no hay presencia de señales de una u otra sonda en al menos 20 células; si estas señales son débiles o inexistentes en más del 25% de las células; los controles no muestran el resultado esperado

* En algunos casos con monosomía 17, la relación *HER2*/CEN17 ≥ 2 es causada por la existencia de una única copia del centrómero 17 y dos copias del gen *HER2*, por lo que estos casos no deberían interpretarse como amplificados.

- Se recomienda descartar la evaluación de: a) núcleos con señal poco intensa; b) áreas con intenso *background*; c) núcleos con signos de sobredigestión, y d) zonas con señal intensa en el ADN bacteriano en macrófagos y mastocitos.
- Se considerará un resultado como no interpretable si ocurre al menos una de las siguientes circunstancias: a) no hay presencia de señales de CEP17 o de *HER2* en al menos 20 células; b) si estas señales son débiles o inexistentes en más del 25% de las células, y c) los controles no muestran el resultado esperado.
- Debe recordarse que los núcleos tumorales que presentan una amplificación de *HER2* muy elevada pueden presentar agrupaciones de señales del gen.

Personal

El número de técnicos de laboratorio que realicen la prueba y el número de patólogos que la interpreten debe ser el mínimo posible, a fin de asegurar una adecuada experiencia. Tanto técnicos como patólogos deben haber seguido un periodo de entrenamiento. Para la validación de la fase postanalítica (interpretación), se recomienda una concordancia con el resultado de referencia de al menos un 95% en 50 casos. Periódicamente se renovará dicha capacitación en sesiones de trabajo dedicadas al efecto.

Informe

Aunque el informe se adaptará a los distintos sistemas de información utilizados en los distintos hospitales, debe incluir, como mínimo, los datos que se presentan en la tabla 9. El tiempo recomendado de respuesta es ≤ 7 días.

Tabla 9 Datos requeridos en el informe de la determinación de HER2 mediante hibridación *in situ*

Identificación del paciente
Identificación del médico solicitante
Fecha de la petición y determinación
Identificación de la muestra (caso y número de bloque)
Tipo de muestra (biopsia endoscópica, pieza quirúrgica u otras) y procedencia anatómica. En el caso de biopsias endoscópicas, especificar el número de fragmentos
Tipo de fijador (obligatorio), tiempo hasta la fijación (recomendable) y tiempo de fijación (recomendable)
Sonda utilizada (proveedor, especificando si está aprobado por la FDA u otra agencia reguladora)
Método de evaluación (semicuantitativo, análisis de imagen)
Número de núcleos evaluados
Idoneidad de la muestra (adecuada/inadecuada para diagnóstico)
Resultados:
– Razón (con dos decimales, sin redondeo): señales del gen <i>HER2</i> /señales del cromosoma 17
– Puntuación: no amplificado, amplificado o no interpretable (conforme a las referencias 5 y 8)
– Presencia o ausencia de polisomía o monosomía
– Presencia o ausencia de heterogeneidad
Especificar si se participa en algún control de calidad externo y su nombre
Nombre de la persona que ejecuta la técnica
Nombre y firma del patólogo responsable del estudio
Incluir una frase que recoja la idea de que el informe está diseñado conforme a las recomendaciones del Consenso Nacional SEAP-SEOM para la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico

Algoritmo para la determinación de HER2

El algoritmo representado en la [figura 2](#) es el propuesto tras la publicación del ensayo ToGA.

Estado actual de la determinación de HER2 en España

La experiencia del Programa de Garantía de Calidad de la SEAP y perspectivas futuras para el carcinoma gástrico

La Asociación para la Garantía de Calidad en Patología de la SEAP se constituyó el mes de enero de 2004 con la finalidad de fomentar y promover el control de calidad asistencial e investigadora en los laboratorios de anatomía patológica. Los laboratorios participantes reciben preparaciones en blanco del Programa para realizar la técnica solicitada, devolviendo dichas preparaciones junto con preparaciones control. Todas ellas son evaluadas por un comité constituido por varios evaluadores. El Programa garantiza la participación anónima y la emisión confidencial de los resultados.

El análisis de los datos obtenidos a partir del módulo de HER2 en mama del Programa de Garantía de Calidad de la SEAP, iniciado en octubre del año 2004 y hasta el mes

de octubre de 2009, con un total de 11 rondas, muestra una participación de 136 centros, aunque tan sólo 4 centros han participado en todas las rondas (2,9%). De los datos de participación, 67 centros (49,3%) lo han hecho entre 5 y 10 rondas y 65 centros (47,8%), entre 1 y 4 rondas. Las distintas rondas de evaluación se han efectuado sobre muestras de tejido con distintos niveles de expresión de la proteína HER2, fijados durante 24 h en formol al 10% tamponado a pH 7 e incluidos posteriormente en parafina. Los criterios de evaluación en todas las rondas han sido los mismos: los resultados óptimos se asignaron a los casos en que todas las muestras del estudio presentaban unos resultados correctos y sin artefactos en el tejido, lo que permitía una interpretación adecuada. Los resultados aceptables eran los que permitían la interpretación pero que en algunas secciones la intensidad se hallaba disminuida o aumentada, y/o artefactos de la técnica, lo que en ciertos casos podrían llevar a una interpretación deficiente. Los casos con resultados inadecuados eran aquellos en que globalmente los resultados obtenidos eran incorrectos, por negatividad de la expresión en los casos 3+ y 2+, posiblemente por causa de una recuperación antigénica insuficiente o por una técnica poco sensible, o por una marcada sobreexpresión de los casos negativos (0 y 1+), asociados frecuentemente a expresión intensa y extensa de los ductos normales y en ocasiones a tinción inespecífica de las células de la estroma, lo que conducía a interpretaciones incorrectas.

El análisis de los resultados de los 4 centros que han participado en las 11 rondas, muestra que 2 de ellos (50%) obtuvieron resultados óptimos y aceptables sin resultados inadecuados, aunque tan sólo uno de ellos obtuvo un resultado óptimo en todas las rondas. De los centros que participaron entre 5 y 10 rondas (67 centros), ninguno de ellos obtuvo un resultado óptimo en todas las rondas en las que participaron y 16 centros (23,9%) presentaron resultados óptimos y aceptables sin resultados inadecuados. De los participantes entre 1 y 4 rondas (65 centros), 4 de ellos (6,2%) obtuvieron resultados óptimos en todas las rondas en que participaron y 30 (46,1%) obtuvieron resultados óptimos y aceptables sin resultados inadecuados. Como resumen, según las rondas, el número de hospitales con puntuación óptima varió entre el 25,8 y el 69,8%; los resultados aceptables, entre el 13,7 y el 56,7% y los inadecuados, entre el 11,1 y el 31,1% ([fig. 3](#)). La utilización de *kits* comerciales aprobados por la FDA y/o EMEA (HercepTest y Pathway) se ha ido incrementando a lo largo de las distintas rondas, y el porcentaje de su utilización fue del 67,4% en la undécima ronda.

En el módulo de FISH/CISH/SISH, el número total de centros que han participado es de 60, aunque sólo uno de ellos ha participado en las 11 rondas (1,6%); entre 5 y 10 rondas han participado 18 centros (30%) y 41 centros entre 1 y 4 rondas (68,4%). La evaluación se ha efectuado sobre una preparación problema que contenía varias secciones de tejido con distintos niveles de amplificación de HER2. Los tejidos habían estado fijados durante 24 h en formol al 10% tamponado a pH 7 e incluidos posteriormente en parafina. Los criterios de evaluación en todas las rondas han sido constantes. Los resultados óptimos fueron aquellos en que todas las muestras del estudio presentaban unos resultados correctos y sin artefactos en el tejido, lo que permitía una interpretación adecuada. Los considerados como aceptables

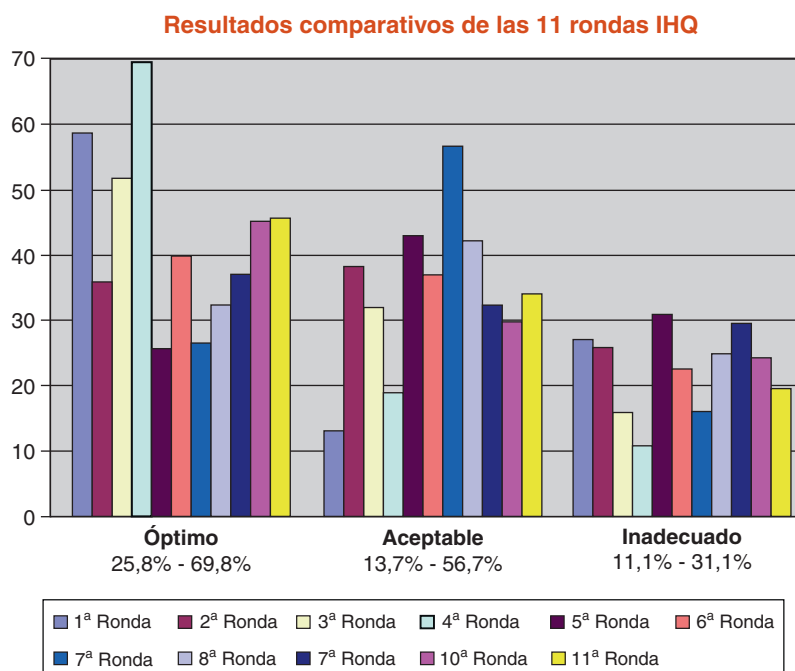


Figura 3 Resultados comparativos de las 11 rondas del módulo HER2 de inmunohistoquímica del Programa de Garantía de Calidad de la SEAP.

fueron los que permitían la interpretación pero que en algunas secciones la intensidad de las sondas estaba disminuida, lo que en ciertos casos podía llevar a una interpretación deficiente. Los casos considerados como inadecuados eran aquellos en los que globalmente los resultados obtenidos eran incorrectos, principalmente por digestión excesiva, por marcada hibridación inespecífica de fondo, lo que condicionaba interpretaciones incorrectas, y material inadecuado para la lectura.

El centro que ha participado en las 11 rondas obtuvo resultados óptimos y aceptables en todas ellas. De los 18 centros que participaron entre 5 y 10 rondas, 10 obtuvieron resultados óptimos o aceptables sin evaluaciones inadecuadas (55,5%). Entre 1 y 4 rondas participaron 41 centros y 30 obtuvieron evaluaciones óptimas y aceptables sin resultados inadecuados (73,1%). Del total de 60 centros, 8 (13,3%) han obtenido el resultado óptimo en todas las rondas en que han participado (2-11). En resumen, según las rondas, los resultados con puntuación óptima variaron entre el 16,7 y el 85,7%; los resultados aceptables, entre el 14,3 y el 70,6% y los inadecuados, entre 0 y el 21% (fig. 4).

Con relación a la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico, al igual que en el carcinoma de mama, se recomienda la participación de programas de garantía de calidad externos de HER2, por lo que las agencias de calidad deberán ofertar la valoración de HER2 en el carcinoma gástrico. En todas las publicaciones de consenso sobre la determinación de HER2 en mama, se hace notoria la necesidad y en algunos casos la obligación (Reino Unido y Canadá) de participar en programas externos de garantía de calidad para mantener la acreditación de los laboratorios para realizar dichas técnicas. Desde esta guía de consenso de cáncer gástrico se aconseja la participación en programas de garantía de calidad con una periodicidad bianual y considerar como resultados satisfactorios de buen funcionamiento

de la técnica cuando el 90% de los resultados sean óptimos. Los Programas de Garantía de Calidad internacionales más conocidos son el UK NEQAS (www.ukneqas.org.uk) y NordiQC (www.nordqc.org), y en nuestro país, el Programa de Garantía de Calidad de la SEAP (www.seap.es). Los criterios de calidad para la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico se resumen en la [tabla 10](#).

Comentarios finales

La rapidez con que se ha organizado y publicado esta guía de consenso SEAP-SEOM (tan sólo unos meses después de la publicación del ToGA y de manera simultánea con la aprobación definitiva en España de la indicación de trastuzumab para el tratamiento de los pacientes con carcinoma gástrico avanzado) delimita los siguientes objetivos científicos en este campo:

1. Establecimiento de un control de calidad específico en la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico, con especial énfasis en asegurar la calidad de la fase postanalítica (interpretación), teniendo en cuenta las importantes diferencias con el carcinoma de mama.
2. Promover estudios diseñados para responder a las siguientes preguntas respecto a la muestra de elección para el estudio de HER2:
 - Biopsia endoscópica frente a pieza quirúrgica.
 - Tumor primario frente a metástasis locorregional frente a metástasis a distancia.
3. Recomendar un análisis exhaustivo de algunos subgrupos del ensayo ToGA, que permita esclarecer la razón y el significado predictivo de la ausencia de correlación entre los niveles de expresión de HER2 detectados por inmunohistoquímica y el estado del gen determinado

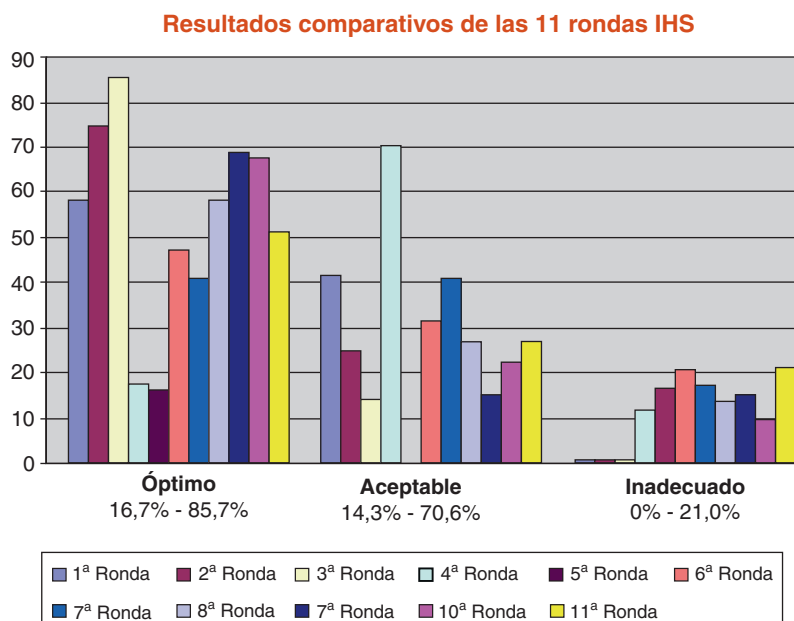


Figura 4 Resultados comparativos de las 11 rondas del módulo HER2 de hibridación *in situ* del Programa de Garantía de Calidad de la SEAP.

Tabla 10 Criterios de calidad para la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico

Adecuada dotación de recursos humanos e infraestructura
Estandarización de los procedimientos (procedimientos normalizados de trabajo para la manipulación de muestras y realización de los métodos específicos)
Uso de <i>kits</i> diagnósticos aprobados por agencias reguladoras sin modificación del protocolo recomendado
Validación inicial del método de determinación: 25 casos positivos y 25 casos negativos, cotejando los resultados con un centro de referencia y obteniendo un 95% de concordancia
Validación tras cualquier modificación del método de determinación
Número mínimo de determinaciones anuales aconsejadas para garantizar la calidad (incluyendo otros tipos tumorales):
– Inmunohistoquímica: 250 determinaciones
– Hibridación <i>in situ</i> : 100 determinaciones
Uso de controles apropiados en cada ronda de determinación
Capacitación inicial y formación periódica del personal técnico y facultativo
Participación en programas de garantía de calidad externa (SEAP, UK NEQAS, NordiQC) con resultados óptimos en el 90% de las determinaciones evaluadas
Se recomienda que los laboratorios emprendan procesos de certificación y acreditación de sus actividades

por hibridación *in situ*. En este sentido, sería muy importante la realización de estudios que analicen la concordancia entre las distintas metodologías de estudio de HER2.

Conflicto de intereses

El presente trabajo ha sido realizado con el apoyo de Roche.

Agradecimientos

Agradecemos a Roche su apoyo para la organización y el desarrollo del presente Consenso Nacional.

Agradecemos la labor de todo el personal que ha colaborado en la determinación de HER2 en los pacientes con carcinoma gástrico.

Agradecemos al Dr. Bombí, coordinador del Club de Patología Digestiva de la SEAP, la lectura del manuscrito.

Bibliografía

- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376:687–97.
- Allison M. The HER2 testing conundrum. *Nat Biotechnol*. 2010;28:117–9.
- Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1986;319:230–4.
- Cortés-Funes H, Rivera F, Alés I, Márquez A, Velasco A, Colomer R, et al. Phase II of trastuzumab and cisplatin in patients (pts) with advanced gastric cancer (AGC) with HER2/neu overexpression/amplification. *ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. J Clin Oncol*. 2007;25 Suppl:4613.
- Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, Van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52:797–805.

6. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F, et al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *J Clin Oncol.* 2009;27 Suppl:LBA4509.
7. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O, et al. Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *J Clin Oncol.* 2009;27 Suppl:4556.
8. Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch.* 2010;457:299–307.
9. García-García E, Gómez-Martin C, Angulo A, Conde E, Suárez-Gauthier A, Adrados M, et al. Hybridization for HER2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in situ hybridization with a novel fully automated dual-color silver in situ hybridization. *Histopathology.* 2011 [en prensa].
10. Gómez Martín C. *Importancia pronóstica y predictiva del estudio del oncogen HER2 en adenocarcinomas gástricos [tesis doctoral]*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2010.
11. Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, et al. FDXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell.* 2007;129:1275–86.
12. Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;354:2619–21.
13. Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell.* 2006;10:25–38.
14. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:962–72.
15. Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, et al. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg.* 2009;33:2112–8.
16. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Cancer.* 2002;98:833–7.
17. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol.* 2000;18:2201–9.
18. Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, et al. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol.* 2009;40:769–77.
19. Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, et al. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2006;15:65–71.
20. Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F, et al. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol.* 2005;205:577–84.
21. Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2006;51:1371–9.
22. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer.* 1999;85:1894–902.
23. Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol.* 2005;16:273–8.
24. Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value —conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol.* 2010;32:57–65.
25. Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol.* 2005;27:681–5.
26. Rebeschung C, Barnoud R, Stéfani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer.* 2005;8:249–52.
27. Inui T, Asakawa A, Morita Y, Mizuno S, Natori T, Kawaguchi A, et al. HER-2 overexpression and targeted treatment by trastuzumab in a very old patient with gastric cancer. *J Intern Med.* 2006;260:484–7.
28. Rech J, Arnlid D, Folprecht G, et al. A pilot study of Trastuzumab monotherapy in patients who progressed while on chemotherapy for metastatic or locally advanced HER positive gastric cancer. *Ann Oncol.* 2006;17 Suppl 9:314 (abstract 1096P).
29. Nicholas G, Cripps C, Heather-Jane A, et al. Early results of a trial of trastuzumab, cisplatin and docetaxel (TCD) for the treatment of metastatic gastric cancer overexpressing HER2. *Ann Oncol.* 2006;17 Suppl 9:316 (abstract 1105P).
30. Satoh T, Leon J, Lopez RI, Ferry DR, Bang Y, Van Cutsem E, et al. Quality of life results from a phase III trial of trastuzumab plus chemotherapy in first-line HER2-positive advanced gastric and GE junction cancer. 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract 7.
31. Wainberg ZA, Anghel A, Desai AJ, Ayala R, Luo T, Safran B, et al. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1509–19.
32. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:118–45.
33. Risio M, De Rosa G, Sarotto L, Capussoti L, Torchio B, Aglietta M, et al. HER2 testing in gastric cancer: Molecular morphology and storage time-related changes in archival samples. *Int J Oncol.* 2003;23:1381–7.
34. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:1016–9.
35. Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji H, Hicks DG, members of Ad-Hoc Committee on Immunohistochemistry Standardization. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15:124–33.
36. Burnett MG. The mechanism of the formaldehyde clock reaction. *J Chem Educ.* 1982;59:160–2.
37. Grace-Jones W. Tissue microarray. En: Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and practice of histological techniques.* 6.^a ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone-Elsevier; 2008. p. 527–35.
38. Blind C, Koepenik A, Pacyna-Gengelbach M, Fernahl G, Deutschmann N, Dietel M, et al. Antigenicity testing by

- immunohistochemistry after tissue oxidation. *J Clin Pathol.* 2008;61:79–83.
39. Hatanaka Y, Hashizume K, Kamihara Y, Itoh H, Tsuda H, Osamura RY, et al. Quantitative immunohistochemical evaluation of HER2/neu expression with Herceptest™ in breast carcinoma by image analysis. *Pathol Int.* 2001;51:33–6.
40. Mulrane L, Rexhepaj E, Penney S, Callanan JJ, Gallagher WM. Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics. *Exp Rev Mol Diagn.* 2008;8:707–25.
41. Persons DL, Tubbs RR, Cooley LD, Dewald GW, Dowling PK, Du E, et al. HER-2 fluorescence in situ hybridization. Results from the Survey Program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:325–31.