

fatti un significativo aumento dei tumori dello stomaco prossimale e della giunzione esofago-gastrica e un netto decremento delle localizzazioni distali. Il dato non è privo di conseguenze sullo stato di HER2: infatti la iperespressione/amplificazione di HER2 è più comune nell'adenocarcinoma esofageo e della giunzione esofago-gastrica rispetto agli adenocarcinomi dello stomaco distale, anche in conseguenza della maggiore prevalenza delle forme di tipo diffuso (sec. Lauren) in questi ultimi.

Nello specifico la prevalenza di iperespressione di HER2 riportata in letteratura, in base ai test IIC e ISH, varia dal 13% al 41% e dipende dall'istotipo (tipo intestinale 16-34%, tipo diffuso 6-7%, non noto/misto 14-20%) e dalla sede del tumore primitivo (24-32% a livello della giunzione esofago-gastrica vs 9.5-18% gastrico) (4, 5, 6, 7). La distribuzione relativa all'iperespressione di HER2 nei tipi classificati secondo Lauren trova conferma anche nello studio ToGA dove la percentuale di positività di HER2 si è attestata sul 32,3% nel tipo intestinale contro il 6,1% nel tipo diffuso e il 20,4% nelle forme miste.

Raccomandazioni

- Il trial clinico TOGA -Trastuzumab for Gastric Cancer- ha dimostrato efficacia terapeutica di Trastuzumab nel carcinoma dello stomaco e della giunzione esofago-gastrica localmente avanzato o metastatico HER2-positivo.
- L'EMA ha approvato l'utilizzo del farmaco in prima linea per il trattamento dei carcinomi metastatici dello stomaco e della giunzione esofago-gastrica HER2-positivi (3+ all'IIC oppure 2+ all'IIC con FISH+).
- E' pertanto necessario valutare lo stato di HER2 in tutti i pazienti con carcinoma metastatico dello stomaco e della giunzione esofago-gastrica.
- La valutazione dello stato di HER2 è indicata in tutti i pazienti con carcinoma dello stomaco e della giunzione esofago-gastrica metastatici suscettibili di un trattamento con cisplatino e 5FU/capecitabina in combinazione con trastuzumab
- Il materiale istologico deve essere fissato in formalina neutra tamponata al 10%.
- I tempi di fissazione dei campioni biotici e chirurgici devono essere contenuti tra 6 e 48 ore.
- In considerazione della possibile eterogeneità di espressione di HER2 è consigliabile l'esecuzione di almeno 6 biopsie endoscopiche in aree diverse della neoplasia.
- Nel caso di campioni operatori con diagnosi istologica di carcinoma misto, si raccomanda di selezionare una inclusione che sia rappresentativa della componente ghiandolare della neoplasia.
- La tecnica di screening per l'analisi dello stato di HER2 nel carcinoma dello stomaco o della giunzione esofago-gastrica è l'immunoistochimica, corredata da ISH nei casi con score 2+.
- L'uso di reagenti diversi da quelli già clinicamente validati deve essere preventivamente validato in sede locale o in un centro di riferimento.
- I criteri per la interpretazione dei risultati di immunoistochimica e per l'assegnazione degli score sono in parte differenti da quelli utilizzati per la valutazione di HER2 nel carcinoma mammario.
- Le neoplasie dello stomaco e della giunzione esofago-gastrica mostrano caratteristiche diverse nella immunoreattività di membrana e una maggior eterogeneità intratumorale nella espressione/amplificazione di HER2.

Scoring system

- L'indagine IIC costituisce il test di primo livello: essa richiede una conferma ISH solo nei casi con score 2+. L'indagine ISH nei casi con score IIC 1+ può essere presa in considerazione, data la difficoltà di definire i tumori IIC 1+: in questi casi la definizione dello stato di HER-2 in funzione della terapia con Trastuzumab deve essere discussa individualmente con l'oncologo

Su campioni operatori:

- Lo score 3+ viene attribuito a carcinomi dello stomaco o della giunzione esofago-gastrica che presentano $\geq 10\%$ di cellule con intensa colorazione di membrana, completa, basolaterale o laterale.
- Lo score 2+ viene attribuito a carcinomi dello stomaco o della giunzione esofago-gastrica che presentano $\geq 10\%$ di cellule con moderata/debole colorazione di membrana, completa, basolaterale o laterale.
- Lo score 1+ viene attribuito alle neoplasie che presentano lieve e frammentata colorazione di membrana in almeno il 10% delle cellule neoplastiche.

Su biopsie endoscopiche:

- I criteri di score sono uguali a quelli sopra descritti per quanto riguarda l'intensità dell'immunocolorazione. E' richiesta la presenza di un cluster di almeno 5 cellule contigue con le caratteristiche di immunoreattività sopra descritte. Il cut off del $\geq 10\%$ di cellule positive non si applica alle biopsie endoscopiche.
- L'indagine IIC costituisce il test di primo livello: essa richiede una conferma ISH solo nei casi con score 2+. L'indagine ISH nei casi con score IIC 1+ può essere presa in considerazione, data la difficoltà di definire i tumori IIC 1+: in questi casi la definizione dello stato di HER-2 in funzione della terapia con Trastuzumab deve essere discussa individualmente con l'oncologo.
- I criteri per la definizione dello stato di amplificazione del gene HER-2 (ISH) sono analoghi a quelli utilizzati per il carcinoma mammario.

Al fini della prescrizione di Trastuzumab la determinazione di HER-2 è ritenuta positiva se:

- IIC score 3+
- IIC score 2+ confermata da ISH positiva

Referenze bibliografiche

Arrington AK, et al. J Gastrointest Surg 2009;13:1754-1761
Bang YJ et al. J Clin Oncol; 27 (suppl ASCO 2009; Abstract 4556)
Botterweck AA et al. Int J Epidemiol 2000; 29:645-654
Boyle P, Ferlay J. J Ann Oncol 2005; 16(3):481-8
Catalano V et al. Crit Rev Oncol Hematol. 2009 Aug; 71(2):127-64
Crew KD, Neugut al. Semin Oncol 2004; 3(4):450-64
Goldhirsch A et al. Ann Oncol 2009; 20:1319-1329
Gravalos C, et al. Gastrintestinal Cancers Symposium 2007;130:Abstract 89
Hayashi M et al Clin Cancer Res 2008; 14:7843-7849
Hofmann M, et al, Histopathology 2008; 52:797-805
Lauren P. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965; 64:31-49
Lordick F, et al. Eur J Cancer 2007; 5:271 (Abstract 3541)
Mizutani T et al. Cancer 1993; 72:2083-2088
Narayan M, Wilken JA, Harris LN et al Cancer Res 2009; 69:2191-2194
Park DL, et al. Dig Dis Sci 2006; 51:1371-1379
Parkin DM et al. Cancer J Vlin 2005; 55:74-108
RCP Herceptin, Gennaio 2010
Rüschoff J et al. Virchows Arch. 2010 Jul 28. -Epub ahead of print
Tanner M et al. Ann Oncol 2005; 16:273-278
Uchino S, et al. Cancer 1993; 72:3179-3184
van Cutsem E, et al. J Clin Oncol 2009; 27:Abstract 4509
Williams PL et al. Gray's Anatomy 1995, vol 38, 1753-1763
Wolff AC et al. J Clin Oncol 2007; 25:118-145
Yonemura Y et al. Cancer Res 1991; 51:1034-1038
Zhang XL, Yang YS, Xu DP, et al. World J Surg 2009; 33:2112-2118

Raccomandazioni per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma gastrico

A cura del gruppo di lavoro AIOM-SIAPEC-IAP

Carlo A.M. Barone (Roma), Roberto Biffi (Milano), Ferdinando De Vita (Napoli), Angelo Dei Tos (Treviso), Francesco Di Costanzo (Firenze), Claudio Dogliani (Milano), Nicola Fazio (Milano), Roberto Fiocca (Genova), Roberto Labianca (Bergamo), Eugenio Maiorano (Bari), Marcella Mottolese (Roma), Carmine Pinto (Bologna), Massimo Rugge (Padova), Anna Sapino (Torino), Mario Scartozzi (Ancona), Alberto Sobrero (Genova), Giuseppe Viale (Milano)



Raccomandazioni per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma gastrico

Epidemiologia e classificazione

Il tumore gastrico globalmente è la seconda causa di morte correlata al cancro, con una maggiore incidenza nei paesi asiatici rispetto all'Occidente. Nei paesi europei la malattia è al quarto posto per incidenza e al terzo per mortalità, con 171.000 nuovi casi e 137.900 decessi registrati nel 2004. A fronte di una riduzione dei casi di carcinoma squamoso esofageo e di carcinoma gastrico distale, è da registrare l'aumento dei casi di carcinoma del cardias e dell'esofago distale. La classificazione anatomica distingue i tumori gastrici in base al sito d'origine: si parla quindi di tumori prossimali (cardias o giunzione gastroesofagea, fondo) e distali (corpo, antro). La classificazione di Siewert individua 3 tipi di carcinoma della giunzione gastroesofagea a seconda della posizione rispetto alla sede anatomica del cardias, mentre quella di Lauren distingue -sulla base dell'aspetto citomorfologico e della modalità di crescita- tra forme intestinali, diffuse e miste.

L'iperespressione di HER2

L'iperespressione di HER2 è l'aspetto più interessante recentemente emerso sotto il profilo della caratterizzazione biologica dei tumori gastroesofagei e dello stomaco. Le forme intestinali secondo la classificazione di Lauren presentano un'iperespressione significativamente maggiore (32.3% vs 6%) di HER2 rispetto a quelle diffuse. Oggi il principale "database" relativo alla frequenza di espressione del c-ERB-B2 nei tumori gastrici e gastroesofagei, è rappresentato dallo studio ToGA, trial randomizzato di fase III nel quale pazienti con carcinoma dello stomaco o della giunzione esofago-gastrica in fase avanzata HER2+ sono stati randomizzati tra il solo trattamento chemioterapico con cisplatino e 5-FU o capecitabina e la stessa chemioterapia in associazione a trastuzumab. Dai dati dello studio ToGA è emersa una diversa percentuale di HER2-positività in base alla localizzazione del tumore. Nello stesso tempo, è stata riscontrata una variabilità geografica nella distribuzione delle localizzazioni tumorali tra i vari paesi che hanno partecipato allo studio.

Le differenze tra tumore mammario e gastrico

Un metodo validato per la valutazione dello stato di HER2, basato su un apposito scoring system, è disponibile da tempo per i tumori della mammella. Le differenze riscontrate tra i tumori gastrici e mammari ha reso però necessario apportare modifiche allo scoring system già utilizzato nella valutazione di HER2 nel cancro della mammella.

Nel valutare l'espressione di HER2 nel carcinoma gastrico occorre tenere in conto alcune differenze rispetto al carcinoma mammario:

- maggiore eterogeneità tumorale dei carcinomi gastrici rispetto a quelli mammari;
- incompleta immunoreattività di membrana legata alla polarizzazione funzionale delle cellule di carcinoma gastrico;
- maggiore frequenza di casi FISH+/IIC 0-1 rispetto al carcinoma mammario.

Uno scoring system modificato di HER2 per il cancro gastrico è stato messo a punto per identificare i pazienti candidabili all'arruolamento nello studio ToGA.

Le evidenze cliniche sul ruolo prognostico dell'iperespressione di HER2 nel carcinoma gastrico hanno condotto così alla validazione dell'Herceptest Scoring System per l'interpretazione dei risultati di HER2 nel tumore gastrico, che ha tenuto conto della maggiore eterogeneità tumorale dei carcinomi gastrici rispetto a quelli mammari e dell'incompleta immunoreattività di membrana legata alla polarizzazione funzionale delle cellule di carcinoma gastrico.

Nella popolazione dello studio ToGA il 22,1% dei pazienti è risultato eleggibile al trattamento con trastuzumab in seguito al riscontro di una positività IIC3+ e/o FISH+, determinata rispettivamente mediante Herceptest e dualcolor FISH Dako. Più nel dettaglio, un'analisi esplorativa ha chiarito che il 16,6% dei soggetti esaminati mostravano una positività IIC3+ oppure IIC2+/FISH+ mentre il 5,5% dei pazienti pur caratterizzati da un responso IIC 0 o 1+ sono tuttavia risultati positivi alla FISH.

Preparazione dei tessuti e problemi metodologici

Nell'esecuzione del test per HER2 è fondamentale in primo luogo la standardizzazione dei processi di raccolta, fissazione, inclusione in paraffina, sezionamento e sparaffinatura delle sezioni.

La raccolta dei tessuti

Cancro gastrico o della giunzione gastroesofagea operato o non resecabile

- Sia i campioni chirurgici che quelli biotipici sono idonei per la valutazione dello stato di HER2.

Preparazione iniziale dei tessuti

- Dopo il prelievo il trasporto al laboratorio deve avvenire in tempi rapidi (entro 20-30 minuti).
- Il campione viene chinato, sezionato e fissato in laboratorio.

La fissazione

- Una inadeguata fissazione dei tessuti è la più comune causa di errore del test di rilevazione dello stato di HER2.
- Disporre il tessuto nel fissativo il più rapidamente possibile (entro 20 minuti).
- Durata della fissazione
 - Campioni prelevati chirurgicamente: 6-48 ore (ma almeno 1 ora/mm di spessore del tessuto).
 - Biopsie endoscopiche: non più di 24 ore.
- Tipo di fissativo
 - Formalina neutra tamponata 10%, preparata di recente (da sostituire regolarmente)
 - Per ottenere risultati affidabili l'impiego di altri fissativi deve essere validato
 - L'esecuzione dei test IIC e ISH può essere ostacolata dall'impiego di fissativi non a base di formalina.

L'inclusione in paraffina

- I campioni tissutali vengono disidratati in etanolo/xilene e inclusi in paraffina
- Si deve evitare una prolungata incubazione in paraffina liquida perché le alte temperature possono degradare l'epitopo
- I campioni inclusi in paraffina possono essere conservati per un tempo indefinito prima del sezionamento.

Il sezionamento e la sparaffinatura

Sezionamento

- Idealmente, le sezioni tissutali andrebbero ottenute immediatamente prima dell'esecuzione del test HER2
- Le sezioni devono essere ricavate da un'area rappresentativa del tumore
- Lo spessore delle sezioni tissutali può influenzare l'interpretazione dei risultati: è opportuno assicurarsi che lo spessore sia inferiore a 5µm
- Le sezioni vengono disposte su vetrini ed essiccate per 12-24 ore a temperatura ambiente o un'ora alla temperatura di 60 °C.

Sparaffinatura

Si raccomanda di praticare una completa rimozione della paraffina: la paraffina residua determina risultati falsi-negativi e aumenta il rischio di colorazione non-specifica.

I problemi metodologici

L'Immunostochimica (IIC) è il test di primo livello di riferimento per la valutazione dello stato di HER2 nel carcinoma gastrico. L'IIC deve essere standardizzata ed associata all'utilizzo di idonei campioni di controllo. I casi con reattività IIC2+ devono essere ritestati con altre procedure (ISH); altri casi possono essere ritestati su richiesta del curante nell'appropriato contesto clinico.

Modalità e tempi di fissazione dei campioni tissutali

Formalina neutra tamponata al 10%.

Altri composti, alternativi alla formalina (tranne Bouin, non utilizzabile per FISH) previa validazione della procedura.

La procedura di fissazione deve essere immediata, adeguata e completa. E' necessario mettere in opera tutte le procedure atte a garantire le suddette condizioni, anche attraverso adeguata sensibilizzazione degli altri operatori. Tempo di fissazione ottimale: fra le 6 e le 48 ore, in relazione alla tipologia di campione. La determinazione dello status di HER2 su frammenti precedentemente congelati è sconsigliata.

Come effettuare il test IIC

Anticorpi poli- e monoclonali sono ugualmente affidabili nel contesto di una procedura tecnica validata. L'utilizzo di reattivi singoli deve avvenire seguendo una procedura standardizzata e validata, costantemente affiancata da idonei controlli e sottoposta a verifica periodica.

Procedimento tecnico

Sezioni tagliate di recente (< 3 mesi)

Recupero antigenico (H.I.E.R.)

- 0.01M Tampone citrato, pH 6.0 o 0.01M EDTA, pH 8.0
- 40 min. a 95° in bagno termostatico o 14 min. a 750W in forno a microonde.

Anticorpi

Lo studio ToGA ha utilizzato Herceptest® per la valutazione dell'espressione di HER2. Sono disponibili tuttavia almeno 25 differenti anticorpi anti-HER2 (4B5, CB11, A0485 ecc.); per questa ragione è raccomandata per ciascun laboratorio la validazione della procedura immunostochimica utilizzata e la partecipazione a programmi di controllo di qualità.

Interpretazione dei risultati

I campioni da analizzare dovrebbero comprendere strutture normali residue da usare come riferimento interno. In tali strutture l'espressione di membrana di HER2 deve essere assente o solo minimamente apprezzabile. Nel caso di biopsia gastrica endoscopica, per definire la neoplasia HER2 positiva è sufficiente che sia presente un cluster di almeno 5 cellule contigue positive.

Se la neoplasia gastrica è risultata negativa per HER2 (score IIC 0 o 1+) su prelievi biotipici, si raccomanda di ripetere la determinazione sul campione operatorio o sulla lesione metastatica, quando disponibili.

Valutare a piccolo ingrandimento tutta l'area neoplastica infiltrante e non meno di 10 campi a forte ingrandimento (x40).

Tenere conto di possibili variazioni di espressione all'interno del campione. Evitare campi periferici (possibili artefatti da essiccamento, insufficiente dispensazione del reattivo, effetti da schiacciamento, etc.).

Problemi frequenti in IIC

Sottostima

- Sovrafissazione in formalina
- Insufficiente ri-esposizione antigenica
- Scelta dell'anticorpo.

Sovrastima

- Post-fissazione alcoolica (confrontare con cellule normali!)
- Colorazione citoplasmatica
- Valutazione di componenti non neoplastiche.

Refertazione

Lo stato di HER2 deve essere espresso mediante lo scoring system dello studio ToGA (da 0 a 3+) con la possibile aggiunta della percentuale di cellule positive, della completezza e dell'intensità della colorazione di membrana.

Correlazione dei test IIC vs FISH

E' opportuno che ciascun laboratorio provveda a validare una quota parte della casistica valutata in IIC con ibridazione in situ, ottenendo una concordanza non inferiore al 90% nei casi 3+.

La correlazione globale tra IIC/FISH deve essere > 80%. Valutazioni discordanti riguardano casi giudicati 2+ (immunoreattività di membrana, di debole-moderata intensità in >10% di cellule della componente invasiva): fino al 50% di tali casi dimostra amplificazione di HER2 con FISH. E' opportuno che ciascun laboratorio provveda a validare una quota parte della casistica valutata in IIC con FISH/CISH. In caso di concordanza inferiore al 80%, procedere ad una verifica della procedura IIC utilizzata.

Controlli di qualità

All'interno del singolo laboratorio si deve procedere ad un controllo di qualità dell'attività svolta, che comprenda l'uso di sezioni di controllo positive (3+) e negative (0, 1+) e/o linee cellulari con e senza iperespressione di HER2, fissate in formalina ed incluse in paraffina.

Verifica periodica (annuale/semestrale) della percentuale di positività IIC per HER2 nei casi testati localmente (la percentuale attesa di casi con iperespressione di HER2 2+/3+ è di circa il 20% dei casi di carcinoma primitivo gastrico o della giunzione esofago-gastrica).

L'uso sporadico delle procedure e/o la valutazione di un limitato numero di casi/anno deve consigliare la centralizzazione dei test presso un laboratorio di riferimento.

La riproducibilità delle procedure IIC

Il trasferimento dello Scoring System messo a punto per il cancro mammario alla valutazione IIC per il cancro gastrico ha comportato una notevole variabilità dei risultati tra i singoli operatori all'interno del laboratorio e tra diversi laboratori. E' essenziale quindi un corretto addestramento dei patologi per migliorare l'interobserver agreement e la riproducibilità dei test per il cancro gastrico. In quest'ambito il French-German ring study ha fornito istruzioni pratiche di facile applicazione.

HER2 nel carcinoma gastrico: impatto prognostico e predittivo

Lavori sperimentali su linee cellulari gastriche e su topi xenograft hanno dimostrato che l'iperespressione di HER2 è legata all'amplificazione del gene, correla con l'andamento clinico e condiziona negativamente la prognosi e la risposta alla chemioterapia. Il silenziamento dell'espressione di HER2 riduce la proliferazione cellulare e la crescita del tumore.

Numerosi studi hanno valutato l'impatto prognostico e predittivo dell'espressione e dell'amplificazione di HER2 nel carcinoma gastrico mediante le tecniche IIC e FISH. I dati disponibili in letteratura nel periodo 1991-2009 evidenziano che nel carcinoma gastrico l'iperespressione di HER2, stabilita attraverso IIC, varia dal 7% al 34%. Tra questi, lo studio di Park, dopo aver rilevato una percentuale di positività all'esame IIC pari al 15,9% ha mostrato come l'amplificazione di HER2/neu mediante FISH/CISH si associ a una riduzione dei tassi di sopravvivenza rispetto ai pazienti con tumore non amplificato (21,4% vs 63%).

Inoltre, è stata dimostrata una correlazione tra l'espressione di HER2 e alcuni aspetti prognostici sfavorevoli del tumore (dimensioni del tumore, invasione della sierosa e interessamento linfonodale).

Le percentuali di positività rilevate mediante IIC sono prossime a quelle registrate mediante FISH (Fluorescence in situ hybridisation). L'amplificazione genica di HER2, riportata in letteratura, varia infatti tra il 7% e il 42%. Il valore medio di positività alla FISH è identico a quello ricavato dall'analisi delle percentuali di positività 3+ del tumore gastrico al test immunostochimico (17,6%).

Per quanto riguarda invece lo studio ToGA, la principale fonte di informazione sulle frequenze di espressione di HER2, la percentuale di positività è risultata superiore a quanto indicato in letteratura. Lo screening è stato condotto con successo su 3667 pazienti utilizzando IIC o FISH: su questa popolazione, il 22%, pari a 810 pazienti, sono risultati HER2 positivi (IIC 3+ e/o FISH+).

HER2 e istotipo/sede del tumore primitivo

Nei paesi Occidentali si è prodotto negli ultimi anni uno "shift" epidemiologico relativo alle caratteristiche del cancro gastrico: è stata registrato in-