

Evaluación del estatus
de HER2 y HER3
en el adenocarcinoma
gástrico resecado en
población occidental
y su correlación
con parámetros
clinicopatológicos,
supervivencia y lugar
de recurrencia.

Nieves Martínez Lago

Programa de Doutoramento
de Investigación Clínica en Medicina
Departamento de Medicina

Santiago de Compostela 2017

USC

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA









Tese de Doutoramento

Evaluación del estatus de **HER2 y HER3** en el adenocarcinoma gástrico reseado en población occidental y su correlación con parámetros clinicopatológicos, supervivencia y lugar de recurrencia.

Nieves Martínez Lago

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Programa de Doutoramento de Investigación Clínica en Medicina

FACULDADE DE MEDICINA

Santiago de Compostela 2017



Autorización do Director/es e Tutor da Tese

Prof. Dr. Rafael López López, Profesor Asociado de Ciencias da Saúde, no Departamento de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela, Xefe de Servizo de Oncoloxía Médica do Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Prof. Dra. María Elena Padín Iruegas, Profesor Contratado Doutor de Área de Anatomía y Embrioloxía Humana no Departamento Bioloxía Funcional e Ciencias da Saúde da Universidade de Vigo.

Como Directores da Tese de Doutoramento titulada:
“Evaluación del estatus de HER2 y HER3 en el adenocarcinoma gástrico resecao en población occidental y su correlación con parámetros clinicopatológicos, supervivencia y lugar de recurrencia”

Presentada por Dna. Nieves Martínez Lago, Alumna do Programa de Doutoramento de Investigación Clínica en Medicina. Departamento de Medicina. Facultade de Medicina. Santiago de Compostela.

Autorizan a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incorre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

Para que así conste, expídese o presente certificado en Santiago de Compostela a 28 de Xullo de 2017.

Fdo. Prof. Dr. Rafael López López

Fdo. Prof. Dra. María Elena Padín Iruegas



Resumen.....	13
Abreviaturas.....	"17
Introducción.....	21
1. Epidemiología.....	23
2. Factores etiológicos.....	26
3. Clasificación del carcinoma gástrico.....	31
4. Diagnóstico.....	43
5. Estadaje: AJCC TNM 7ª edición.....	46
6. Factores pronósticos.....	50
7. Tratamiento.....	52
7.1 Enfermedad resecable.....	52
7.2 Enfermedad irresecable o metastásica.....	63
8. La familia del factor de crecimiento epidérmico humano (HER). Generalidades.....	"72
9. HER2 y su papel en la tumorigénesis.....	76
9.1 HER2 y el carcinoma gástrico o de la UGE.....	77
10. El estatus de HER3 en el adenocarcinoma gástrico y de la UGE.....	83
11. Tratamiento del cáncer gástrico HER2 positivo.....	85
12. Determinación del estatus de HER2.....	94
13. Determinación del estatus de HER3.....	103

Hipótesis.....	105
Objetivos.....	"109
Material y Métodos.....	113
1. Diseño del estudio.....	114
2. Criterios de inclusión y exclusión.....	114
3. Recogida de datos clínicos.....	116
4. Estudio histológico.....	117
5. Aspectos estadísticos.....	123
Resultados.....	"127
1. Características de la población.....	129
2. Estatus de HER2.....	"133
3. Estatus de HER3.....	"151
4. Relación entre HER2 y HER3.....	159
Discusión.....	175
Conclusiones.....	199
Bibliografía.....	205





Título:

Evaluación del estatus de HER2 y HER3 en el adenocarcinoma gástrico resecado en población occidental y su correlación con parámetros clinicopatológicos, supervivencia y lugar de recurrencia.

Introducción:

HER2 es un biomarcador predictivo de respuesta a trastuzumab en adenocarcinoma gástrico o de la UGE irresecable o metastásico. Además, el estatus de HER2 y HER3 han demostrado su impacto pronóstico en tumores resecados en población asiática. Sin embargo, el papel de dichos receptores en población occidental resecable continúa siendo controvertido.

Material y Métodos:

Se seleccionaron pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica sometidos a cirugía curativa entre Enero de 2007 y Junio de 2014 en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. La expresión de HER2 se determinó mediante inmunohistoquímica utilizando DAKO-HercepTest™ Kit y la amplificación génica mediante DuoCISH, con HER2 FISH pharmDX™ y DuoCISH™. La expresión de HER3, realizada mediante inmunohistoquímica, empleó el anticuerpo HER3 clon DAK-H3-ICHER3. Se analizó la correlación entre el estatus de HER2 y HER3 así como su relación con las características clinicopatológicas clásicas, la supervivencia y el patrón de recurrencia.

Resultados:

Se incluyeron 106 pacientes. La expresión de HER2 fue la siguiente: 71.7% expresión ausente o débil, 21.7% expresión moderada y 6.6% expresión intensa. Se objetivó amplificación de HER2 en 14 pacientes (13.2%). Se observó una asociación significativa entre la expresión y la amplificación de HER2 ($p < 0.001$). HER2 se asoció con el subtipo intestinal de Lauren ($p = 0.01$) y el grado de diferenciación ($p = 0.008$). Además, se relacionó con una peor supervivencia ($p = 0.029$), una tendencia a una mayor tasa de recurrencias ($p = 0.052$) y un patrón de recurrencia característico ($p = 0.048$).

En relación a HER3, el 71.7% presentaron expresión ausente o débil, siendo negativos; y el 27.3% expresión moderada o intensa, denominándose positivos. HER3 se asoció con el mejor grado de diferenciación ($p = 0.049$). Sin embargo, no tuvo impacto en la supervivencia ($p = 0.813$), en la tasa de recurrencias ($p = 0.800$) ni en el patrón de las mismas ($p = 0.838$).

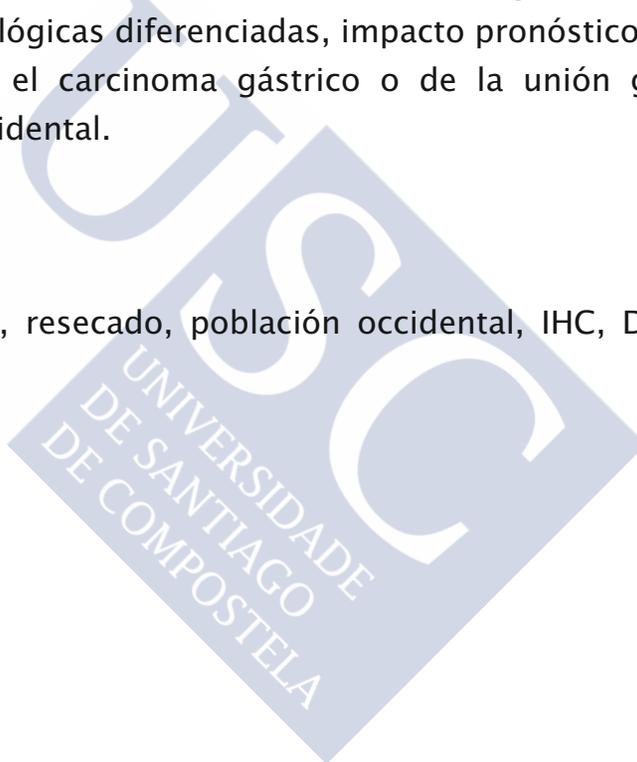
Se objetivó una relación significativa entre el estatus de HER2 y HER3 ($p = 0.018$), su relación con el subtipo intestinal de Lauren ($p = 0.020$) o el mejor grado de diferenciación ($p = 0.050$), así como su impacto en la supervivencia ($p = 0.032$).

Conclusiones:

El estatus combinado de HER2 y HER3 define un subgrupo de pacientes con características clinicopatológicas diferenciadas, impacto pronóstico y un patrón de recurrencias definido en el carcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica resecado en población occidental.

Palabras Clave:

Carcinoma gástrico, resecado, población occidental, IHC, DuoCISH, HER2, HER3, pronóstico.





Abreviaturas

5-FU:	5-fluorouracilo
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
AMP:	Amplificado
ARN:	Ácido ribonucleico
ASCO:	American Society of Clinical Oncology
BSC:	Mejor cuidado de soporte
CEN-17:	Centrómero 17
CG:	Cáncer Gástrico
CGD:	Cáncer Gástrico Difuso
CGDF:	Cáncer Gástrico Difuso Familiar
CIN:	Cromosómicamente Inestables
CISH:	Hibridación Cromogénica in Situ
CML:	Carcinoma Mama Lobulillar
CRD:	Cuaderno de Recogida de Datos
DuoCISH:	Hibridación in situ Cromogénica Dual
ECD:	Dominio extracelular
EDA:	Endoscopia Digestiva Alta
EEUU:	Estados Unidos

ESMO:	European Society for Medical Oncology
FISH:	Hibridación fluorescente in situ
GS:	Genómicamente estable
HAD:	Herencia Autosómica Dominante
HE:	Hematoxilina-Eosina
HP:	Helicobacter Pylori
HR:	Hazard Ratio
IC 95%:	Intervalo de Confianza del 95%
IHC:	Inmunohistoquímica
IMS:	Inestabilidad de Microsatélites
JGCA:	Japanese Gastric Cancer Association
LV:	Leucovorin
MAPK:	MAP Quinasas
mARN:	ARN mensajero
NS:	No Significativo
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds Ratio
PI3K:	Fosfatoinositol-3-quinasa
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
RTQT:	Radioquimioterapia
QT ady:	Quimioterapia adyuvante

QT periop:	Quimioterapia perioperatoria
SEAP:	Sociedad Española de Anatomía Patológica
SEER:	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SEOM:	Sociedad Española de Oncología Médica
SG:	Supervivencia Global
SLE:	Supervivencia Libre de Enfermedad
SLP:	Supervivencia Libre de Progresión
TC:	Tomografía Computerizada
TGCA:	Atlas del genoma humano
TTO:	Tratamiento
UGE:	Unión Gastroesofágica
USE:	Ecoendoscopia
VEB:	Virus Ebstein-Barr



Introducción



1. Epidemiología.

Las primeras descripciones del cáncer gástrico datan ya del 3000 a. C. en inscripciones jeroglíficas y manuscritos de papiros del antiguo Egipto. Sin embargo, para tener más datos habría que esperar al primer gran análisis estadístico de la incidencia del cáncer y la mortalidad del cáncer (utilizando datos recogidos en Verona, Italia de 1760 a 1839) que demostró que el cáncer gástrico era el cáncer más común y letal.

En la actualidad, el cáncer gástrico representa la quinta neoplasia en frecuencia a nivel mundial, con casi un millón de nuevos casos en el año 2012; por detrás del cáncer de pulmón, mama, colorrectal y próstata₁ (Figura 1).

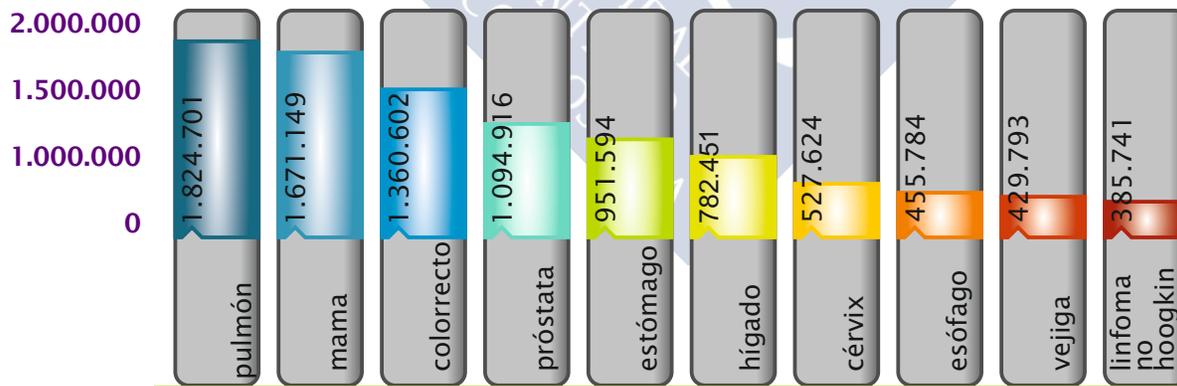


Figura 1. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes a nivel mundial. Adaptado de IARC IA. Globocan 2012.

Aunque el cáncer gástrico ha disminuido globalmente su incidencia a nivel mundial, se ha producido un aumento relativo de tumores proximales, como los localizados en la unión gastroesofágica (UGE) o el cardias^{2,3}.

Parte del descenso de la incidencia puede deberse al reconocimiento de ciertos factores de riesgo como el *Helicobacter Pylori* (HP) y otros factores, como los dietéticos y los ambientales. Sin embargo, la disminución claramente comenzó antes del descubrimiento del HP, ocurriendo primero en países con baja incidencia de cáncer gástrico como los Estados Unidos (a partir de la década de 1930), mientras que la disminución en países con alta incidencia como Japón fue más lenta. Una hipótesis interesante es la popularización de los refrigeradores.

Así, los refrigeradores mejorarían la conservación de los alimentos, reduciendo así la preservación de alimentos basada en la sal y previniendo la contaminación bacteriana y fúngica. Además, la refrigeración también permitiría una mayor disponibilidad de alimentos frescos y verduras, lo que podría ser una fuente valiosa de antioxidantes, importantes para la prevención del cáncer^{4,5}.

El riesgo de desarrollar un cáncer gástrico aumenta a partir de los 50 años y es máximo en la séptima década de la vida. La enfermedad es aproximadamente dos veces más común en los hombres que en las mujeres. Hay una variación geográfica marcada, con las tasas más altas reportadas en el este de Asia, donde se situarán aproximadamente la mitad de los casos a nivel mundial, América del Sur y Europa del Este; mientras que las más bajas se situarán en los Estados Unidos y Europa occidental⁶.

Así mismo, el cáncer gástrico representa la tercera causa de muerte por cáncer en ambos sexos a nivel mundial, con unas 723.000 muertes, representando el 8.8 % de las muertes por cáncer. Las tasas de mortalidad más altas aparecen en Asia oriental, con 24 muertes por 100.000 en hombres y 9.8 en mujeres, América del Sur y Europa del Este; y las más bajas en Europa occidental y América del Norte, con 2.8 y 1.5, respectivamente^{1,6}.

En Europa, con 140.000 nuevos casos en 2012, el cáncer gástrico representa el sexto tumor en frecuencia y, lo que es incluso más importante, la cuarta causa de muerte por cáncer, siendo responsable de 107000 muertes al año aproximadamente⁷.

Siguiendo esta línea, en España es el sexto tumor en frecuencia, con 7810 casos en el año 2012; y la quinta causa de muerte por cáncer, siendo responsable del 5.2% de las muertes por cáncer en ese mismo año. En lo referente a los datos de nuestra comunidad autónoma, en el año 2012 el carcinoma gástrico fue responsable de 329 muertes en varones y 213 en mujeres, lo que supone el 2.3 y 1.6%, respectivamente⁸.

2. Factores etiológicos.

2.1 Factores genéticos.

Aunque la mayoría de los cánceres gástricos son considerados esporádicos, se estima que aproximadamente el 5-10% de los casos presentan agregación familiar y el 1-3% de los casos están asociados con síndromes hereditarios de predisposición al cáncer. Existen tres síndromes principales asociados con el carcinoma gástrico: el Cáncer Gástrico Difuso Familiar (CGDF), la Poliposis Gástrica Proximal asociada al Carcinoma Gástrico y el Cáncer Gástrico Intestinal Familiar. A continuación, nos centraremos en el CGDF por ser el síndrome hereditario más frecuentemente asociado al cáncer gástrico⁵.

El CGDF se debe a una mutación en línea germinal en el gen supresor de tumores CDH1, localizado en el cromosoma 16q22, que codifica la proteína de adhesión celular E-cadherina. Se asocia con el desarrollo de carcinoma gástrico, especialmente del subtipo difuso de la clasificación de Lauren y con presentación a edades tempranas. Así, la edad promedio al diagnóstico son 37 años⁹⁻¹¹.

El CGDF presenta herencia autosómica dominante (HAD) y se ha relacionado con el 40% de las familias con cáncer gástrico difuso hereditario. Además, presenta una alta penetrancia, con un riesgo de desarrollar carcinoma gástrico a los 80 años del 80% para ambos sexos; y en el caso del carcinoma de mama lobulillar (CML), también asociado a dicho síndrome, el riesgo es del 60%⁹⁻¹¹.

Los principales criterios para el diagnóstico del CGDF y, en consecuencia, la realización del test genético son la presencia de 2 o más casos documentados de cáncer gástrico independientemente de la edad, siendo uno de ellos un carcinoma gástrico difuso; la presencia de un carcinoma gástrico difuso antes de los 40 años o la presencia de antecedentes familiares o personales de carcinoma gástrico difuso y CML, siendo uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años. El estudio también debe considerarse en pacientes con CML bilateral o antecedentes de dos o más casos de CML antes de los 50 años; en pacientes con antecedentes personales o familiares de carcinoma gástrico difuso y paladar hendido; o en aquellos que presenten lesiones precursoras del carcinoma de células en anillo de sello⁹.

Debido a la mortalidad asociada con el CGDF, en los pacientes con mutaciones patogénicas de CDH1, deberá considerarse la realización de una gastrectomía total profiláctica en centros expertos. Sin embargo, la gastrectomía profiláctica se asocia con diversas secuelas fisiológicas, metabólicas e, incluso, psicológicas; por lo que los pacientes que sean sometidos a gastrectomía profiláctica deberán ser seguidos por un equipo multidisciplinar con el objetivo de minimizar dichas secuelas⁹.

En lo referente al seguimiento endoscópico, cuyo papel es controvertido debido a su tasa de falsos negativos, éste se reservará para pacientes en los que no pueda llevarse a cabo la gastrectomía profiláctica, en aquellos con variantes de CDH1 de significado incierto y en los que cumplan criterios clínicos de CGDF pero no se haya identificado mutación de CDH1⁹.

Por último, debido a la asociación del CGDF y el CML, se realizará seguimiento con resonancia magnética mamaria (RMN) a partir de los 30 años en las mujeres con CDH1⁹⁻¹¹.

2.2 Factores ambientales

La presencia de diferencias geográficas y étnicas en la incidencia del cáncer gástrico en todo el mundo, así como las tendencias en cada población a lo largo del tiempo, sugieren el papel de diversos factores ambientales en la tumorigénesis del carcinoma gástrico.

De estos factores ambientales, la infección por HP es el más estudiado dentro del carcinoma gástrico esporádico. Se ha demostrado que la población infectada por HP presenta un riesgo de padecer carcinoma gástrico de 3 a 6 veces mayor que la no infectada; y que dicha infección se relaciona con parámetros clinicopatológicos como el subtipo intestinal y la localización a nivel del estómago distal.

La presencia de HP ha sido relacionada con un abanico de efectos sobre la mucosa gástrica que abarca desde la inflamación crónica inicial a diversos cambios epigenéticos que conducen, finalmente, a la transformación maligna, el proceso de invasión y el desarrollo de metástasis. Así, la presencia de la bacteria en la mucosa produce un fenómeno inflamatorio que, si no es erradicada, conduce a una inflamación crónica, con el consecuente desarrollo de una atrofia de la mucosa,

denominado gastritis atrófica, seguido de la aparición de metaplasia intestinal, que puede desembocar en displasia y, en consecuencia, el desarrollo de carcinomas gástricos. La erradicación ha demostrado la disminución del riesgo de carcinoma gástrico en pacientes con gastritis atrófica, pero no en pacientes con metaplasia o displasia, en lo que se conoce como un fenómeno de no retorno^{12,13}.

Otro patógeno asociado con el carcinoma gástrico ha sido el virus de Epstein-Barr (VEB). En la actualidad, y como describiremos más adelante, la infección por el VEB define un subgrupo molecular de carcinomas gástricos con características diferenciadas¹⁴.

Otros factores ambientales como los hábitos dietéticos y el consumo de tabaco y/o alcohol han sido asociados con el desarrollo de cáncer gástrico. En lo referente a la dieta, se ha demostrado la asociación entre el consumo de sal y derivados, y el riesgo de cáncer gástrico. En base a dichos estudios, en el año 2007 se ha clasificado los alimentos salados como posible factor de riesgo. Además, ha sido descrito un potencial efecto sinérgico entre los alimentos en salazón y la infección por HP, aunque esto no ha sido confirmado en un estudio posterior¹⁵⁻¹⁸.

Por otra parte, tal y como expusimos anteriormente, se ha visto un descenso importante en la incidencia del cáncer gástrico desde la introducción de los refrigeradores y esto podría estar en relación con la disminución del consumo de alimentos en salazón, curados o ahumados¹⁹.

También ha sido analizada la relación entre el consumo de compuestos nitrosos y la aparición de carcinoma gástrico. Así, en un metaanálisis se estimó que un consumo de más de 30 gr. de carnes procesadas aumentaba un 15% el riesgo de padecer carcinoma gástrico y; en contraposición, el consumo de frutas se asociaba a una disminución de dicho riesgo. Esto podría deberse al papel de la vitamina C en el metabolismo de los compuestos nitrogenados en la cavidad gástrica. Además, esta hipótesis explicaría porque el beneficio se limitaba al consumo de frutas, no pudiéndose identificar un efecto protector en relación al consumo de verduras^{20,21}.

Por último, también ha sido analizada la relación entre el consumo de tabaco y alcohol y el desarrollo de carcinoma gástrico. En este sentido, diversos metaanálisis han demostrado relación entre el consumo de tabaco y el carcinoma gástrico, estimando que, aproximadamente, el 18% de los carcinomas gástricos podrían deberse al tabaco. Sin embargo, no se ha conseguido relacionar la ingesta de alcohol con la tumorigénesis del carcinoma gástrico^{22,23}.

3. Clasificación del carcinoma gástrico.

3.1 Clasificación anatómica.

El estómago es la porción más dilatada del tubo digestivo que se sitúa entre el esófago distal y el intestino delgado. El estómago se divide en cuatro regiones: la unión gastroesofágica (UGE), el fundus, el cuerpo y la porción pilórica, que a su vez se divide en el antro pilórico y el píloro. Desde el punto de vista clínico es importante diferenciar los tumores propiamente gástricos, que a su vez dividiremos en proximales, que incluye a todos los tumores localizados en el cardias, el fundus y el cuerpo gástrico; y los distales, que incluye a los tumores localizados en el antro gástrico y el píloro; de los tumores de la UGE, ya que difieren en términos de incidencia, localización geográfica, etiología, presentación clínica y estrategia de tratamiento.

En lo referente a los tumores de la UGE, éstos se catalogan de acuerdo a la clasificación de Siewert, que subdivide a los tumores en tres tipos en función de su localización. Así, los tumores Siewert I representan a los carcinomas del esófago inferior, es decir, a aquellos cuyo centro se localiza entre 1 y 5 cm por encima de la UGE. Por su parte, los tumores Siewert II son los verdaderos carcinomas del cardias, localizados entre 1 cm por encima y 2 cm de la UGE. Por último, los Siewert III, también denominados carcinomas subcárdicos, se sitúan entre 2 y 5 cm de la UGE²⁴. (Figuras 2 y 3)

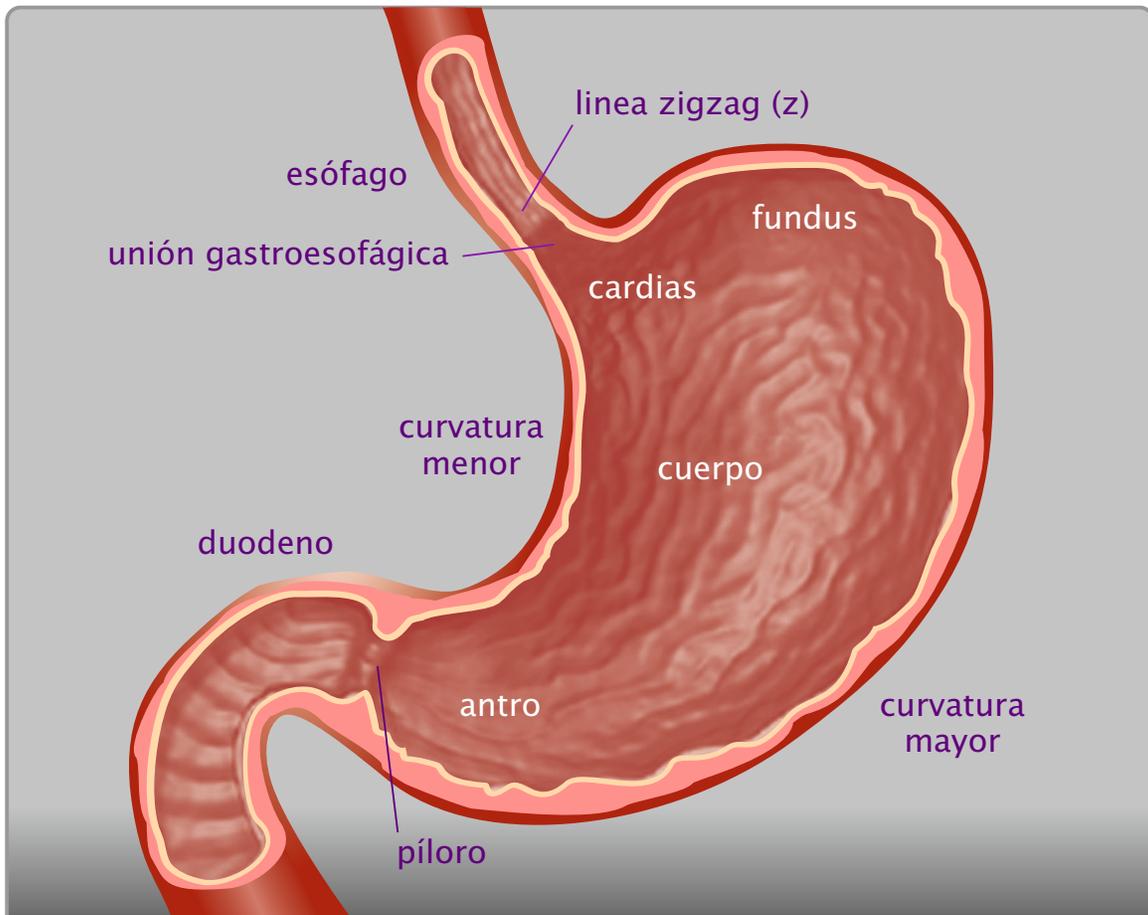


Figura 2. Anatomía del estómago y la UGE.
Adaptado de Siewert JR et al. Ann Surg. 2000; 232(3):353-61.

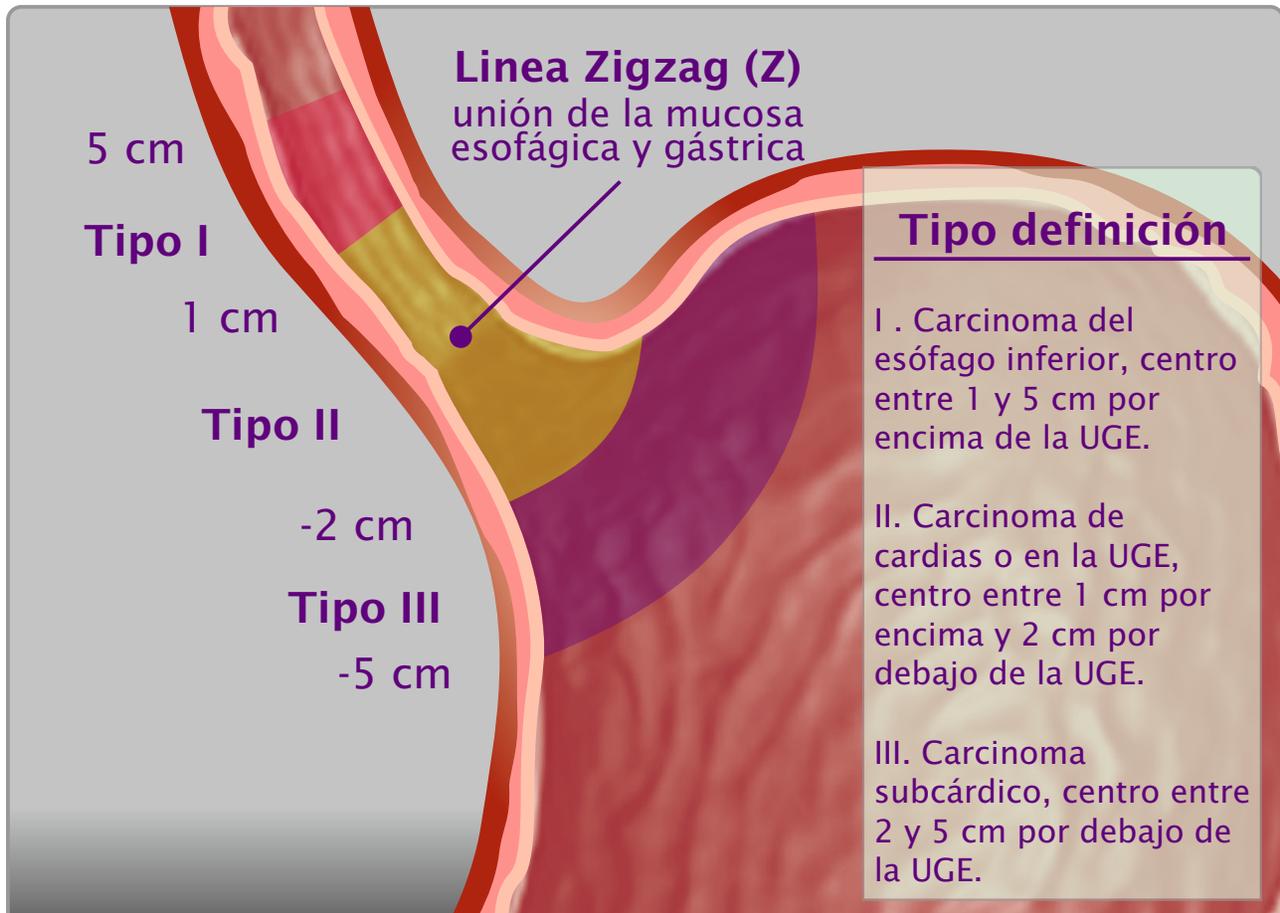


Figura 3. Clasificación de Siewert.
Adaptado de Siewert JR et al. Ann Surg. 2000; 232(3):353-61

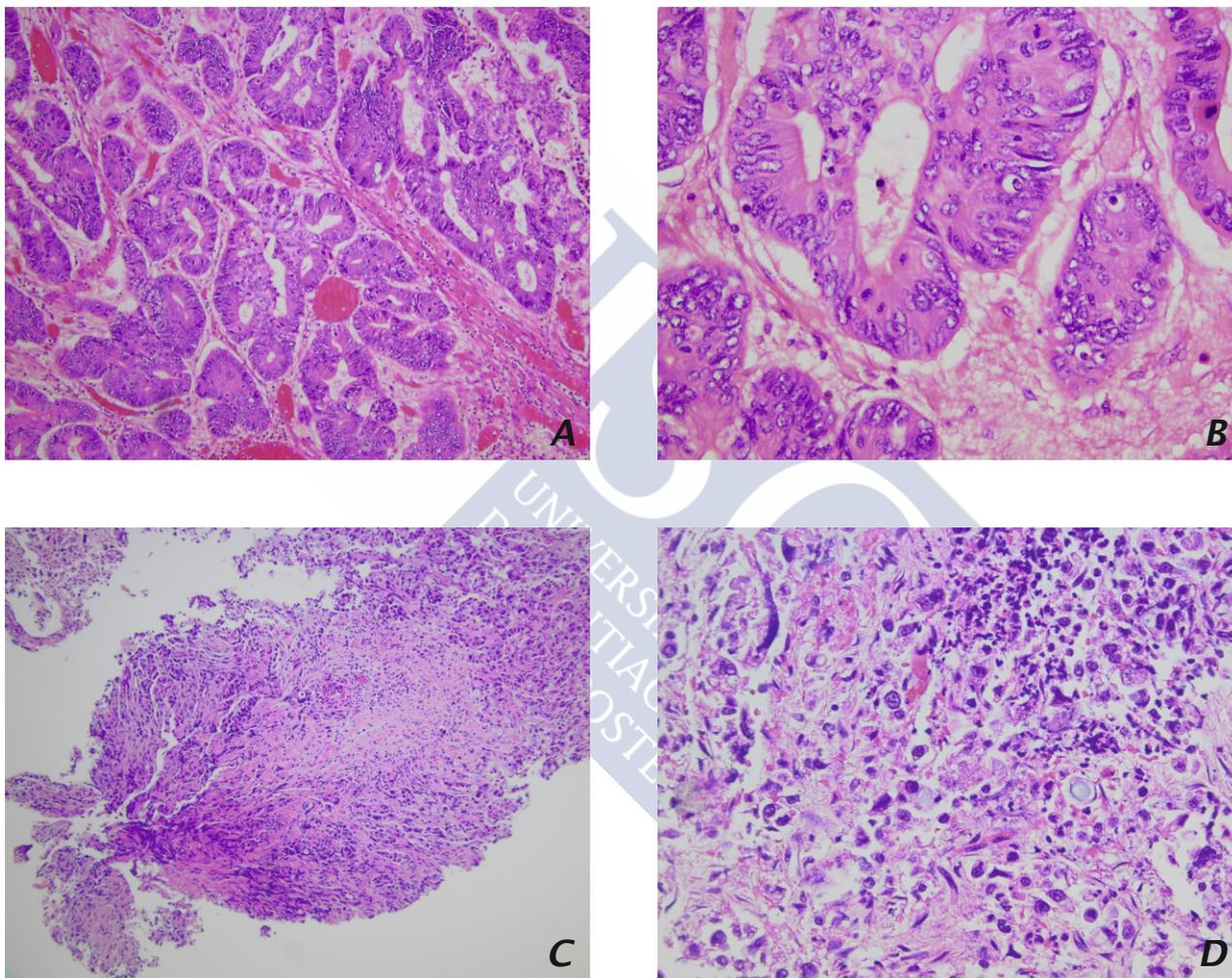
Sin embargo, dicha clasificación ha sido criticada puesto que no incluye criterios específicos para la identificación de los adenocarcinomas de UGE. Para ayudar a corregirlo, la clasificación TNM ha introducido categorías simplificadas en su 7ª edición. Así, si el epicentro del tumor se localiza en el esófago distal, la UGE o en los 5 cm proximales del estómago, pero la masa tumoral se extiende hacia la UGE o el esófago distal, se clasifica como carcinoma esofágico. Sin embargo, si el epicentro se encuentra en los 5 cm proximales del estómago, pero el tumor no se extienden hacia UGE o el esófago, o si el epicentro se encuentra a más 5 cm de la UGE, el tumor se clasifica como gástrico²⁵.

3.2 Clasificación histológica.

Aunque la mayor parte de los cánceres gástricos son adenocarcinomas, éstos son muy heterogéneos con respecto a la arquitectura y el crecimiento, la diferenciación celular, histogénesis y la patogénesis molecular. Debido a esta gran variabilidad, existe gran cantidad de clasificaciones basadas en la histopatología. Las más utilizadas son las clasificaciones de Lauren y la de la OMS, que describiremos a continuación^{26,27}.

3.2.1 Clasificación de Lauren

La clasificación de Lauren fue descrita por el patólogo del mismo nombre en 1965 y, debido a su utilidad, ha llegado hasta nuestros días. Esta clasificación permite dividir los carcinomas gástricos, en base a su distinta presentación clinicopatológica, su etiología y su incidencia en dos subtipos histológicos predominantes: intestinales y difusos²⁶ (Figura 4).



**Figura 4. Clasificación de Lauren. Tinción H-E (10 y 40X).
A-B. Subtipo intestinal. C-D Subtipo Difuso**

A) Carcinomas Intestinales. Son los carcinomas más frecuentes, representando un 54% del total. Estos tumores se caracterizan por formar estructuras glandulares de diferente grado de diferenciación. Suelen estar formados por células grandes, claramente definidas y de morfología variable. El núcleo celular es grande, hipercromático y con abundantes figuras de mitosis. Aparecen de manera habitual en el seno de mucosas con gastritis crónica y metaplasia intestinal. Su pico de máxima incidencia se sitúa entre los 60 y los 69 años. Suelen diseminarse principalmente por vía hematógena, principalmente a nivel hepático.

B) Carcinomas Difusos. Representa el 34% de los casos aproximadamente. Están constituidos por células neoplásicas pobremente cohesionadas que infiltran la pared gástrica de manera difusa, con escasa o nula formación de glándulas. La apariencia de las células suele ser redonda y pequeña, de citoplasma frágil e indistinguible y de morfología uniforme. Se disponen de manera aislada o en pequeños acúmulos, que simulan glándulas o retículos. El núcleo celular es pequeño, de borde liso, morfología regular y rara vez hipercromático. Estos tumores pueden presentar pequeñas cantidades de mucina intersticial y se asemejan a los encasillados como Tumores de Células en Anillo de Sello de la clasificación de la OMS. La tasa mitótica de los tumores difusos es inferior a la que presentan los tumores de tipo intestinal y presentan menor grado de inflamación asociada, aunque, por el contrario, el grado de desmoplasia es mayor. Aparecen a edades más tempranas con un pico de máxima incidencia entre los 50 y los 59 años. Al contrario que los carcinomas de tipo intestinal, suelen extenderse por la superficie peritoneal en forma de carcinomatosis (Figura 5).

	Intestinal (54%)	Difuso (34%)
Estructura	Estructuras Tubulares Glandulares	Infiltración difusa. Escasas estructuras glandulares
Morfología celular	Células grandes, morfología variable. Núcleo grande, hiper cromático y abundantes mitosis.	Células pequeñas, uniformes. Núcleo pequeño uniforme, raro hiper cromático y menos figuras de mitosis.
Mucosa adyacente	Gastritis crónica Metaplasia Intestinal	Desmoplasia
Pico máxima incidencia	60 - 69 años	50-59 años.
Diseminación	Hematógena (Hepática)	Trascelómica (Peritoneal)

Figura 5. Criterios clinicopatológicos y su asociación con la clasificación de Lauren.
Adaptado de Lauren P. et al. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31-49.

Finalmente existen otros tipos de carcinomas gástricos que suponen variantes raras y de escasa incidencia, representando, en conjunto, un 15% de los tumores. Entre estos podemos incluir los carcinomas adenoescamosos, los carcinomas indiferenciados, los carcinomas mixtos adenocarcinoma-carcinoide, los carcinomas de células pequeñas, los carcinomas de células parietales, coriocarcinomas, tumores del seno endodérmico, carcinomas embrionarios, tumores de células de Paneth y adenocarcinomas hepatoides.

3.2.2 Clasificación de la OMS.

Aunque la clasificación de Lauren es simple y robusta, la clasificación de la OMS, que incluye las cinco principales entidades histopatológicas del carcinoma gástrico, tiene la ventaja de que se corresponde con la clasificación del resto del tracto gastrointestinal. Las categorías de la OMS se basan en los patrones histológicos predominantes del carcinoma gástrico: tubulares, papilares, mucinosos, poco cohesivos y variantes raras²⁷. (Figura 6)

Los subtipos tubular y papilar de la OMS se corresponden con el tipo intestinal descrito por Lauren; mientras que los poco cohesivos, constituidos total o parcialmente por las células en anillo de sello, se corresponden con el tipo difuso de Lauren^{26,27}.

3.3 Clasificación molecular.

Recientemente, han sido publicadas varias clasificaciones moleculares del adenocarcinoma gástrico. De ellas, nos centraremos en la de la red del Atlas del Genoma del Cáncer (TGCA), ya que ha sido llevada a cabo predominantemente en población occidental¹⁴.

Para dicha clasificación se ha llevado a cabo el análisis de perfil genómico de 295 adenocarcinomas gástricos mediante seis plataformas que incluían el análisis de ADN, ARN y proteómica, y cuyos resultados se han fusionado diferenciándose

cuatro categorías que incluyen los tumores con positividad para el VEB, aquellos con Inestabilidad de Microsatélites (IMS), los Genómicamente Estables (GS) y, finalmente, los Tumores Cromosómicamente Inestables (CIN).

Subtipo	Código
Adenocarcinoma	8140/3
Tipo Intestinal	8144/3
Tipo Difuso	8145/3
Adenocarcinoma Papilar	8260/3
Adenocarcinoma Tubular	8211/3
Adenocarcinoma Mucinoso	8480/3
Carcinoma Células Anillo de Sello	8490/3
Otras Variantes	
Carcinoma Adenoescamoso	8560/3
Carcinoma Células Escamosas	8070/3
Carcinoma Células Pequeñas	8041/3
Carcinoma Indiferenciado	8020/3

Figura 6. Clasificación WHO del carcinoma gástrico. Adaptado de Bosman FT, et AL. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition. International Agency for Research on Cancer. 2010. p. 417.

El carcinoma gástrico positivo para el VEB representa el subtipo menos frecuente, con el 9% de los casos. Afecta fundamentalmente a varones (81%) y suele localizarse en el fundus-cuerpo gástrico, en hasta un 62% del total. Se caracteriza por la mayor prevalencia de hipermetilación del DNA. Así, todos los tumores presentan hipermetilación y, en consecuencia, silenciamiento de CDKN2A, pero carecen de hipermetilación del promotor de MLH1, característica del subtipo con IMS. Este subgrupo contiene mutaciones de PIK3CA en hasta un 80% de los pacientes, así como amplificaciones de HER2 y JAK2 en aproximadamente el 12% de los mismos. Además, se asocia con sobreexpresión de PDL1 y PDL2, así como con la presencia de señalización inmune.

En lo referente a los carcinomas con IMS, éstos representan el 22% del total. Se asocian con una mayor edad al diagnóstico, con una mediana 72 años, son más frecuentes en mujeres, con un 56% de los casos, se localizan predominantemente a nivel distal, presentan una menor afectación ganglionar y se relacionan con ausencia de respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas. Se caracterizan por un sistema de reparación ineficiente del ADN que condiciona, en consecuencia, inestabilidad genómica. Se han relacionado con las mutaciones germinales en los mecanismos de reparación genética como el síndrome de Lynch. En el caso de los tumores esporádicos, es causado predominantemente por un fenómeno epigenético que provoca la hipermetilación en la región del promotor de MLH1. Además, han sido identificadas diversas mutaciones en PIK3CA, HER3, HER2 y EGFR. Sin embargo, no se han encontrado mutaciones en el gen BRAF V600E, a diferencia del cáncer colorrectal (Figura 7).

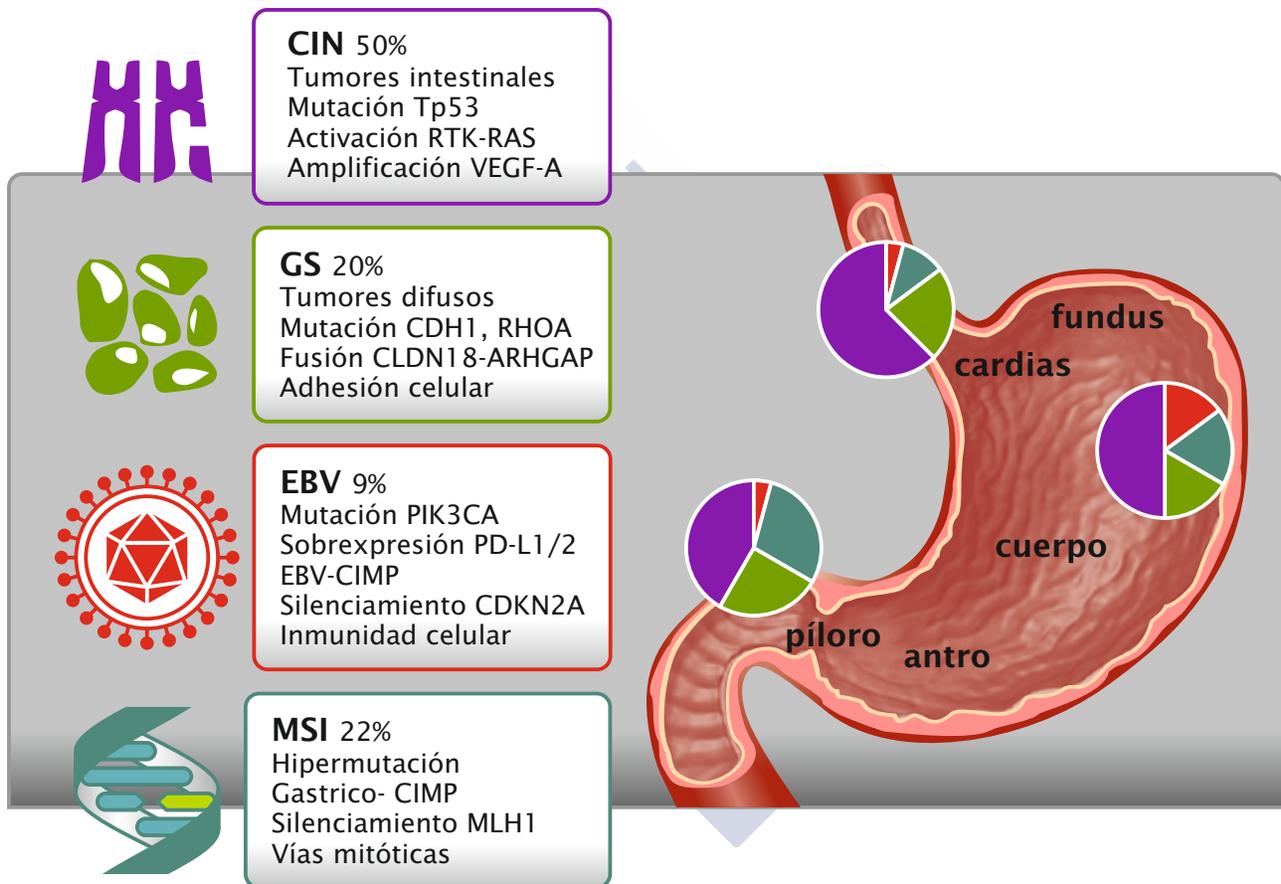


Figura 7. Subtipos moleculares del carcinoma gástrico y sus principales características. Adaptado de Bass et Al. Nature. 2014 Sep 11;513(7517):202-9.

El tercer subgrupo estaría formado por los tumores GS, formado por el 20% de los pacientes. Estos tumores suelen aparecer a edades más tempranas, con una mediana de edad de 59 años y se asocian con frecuencia con mutaciones somáticas del gen CDH1, presentes en hasta un 37% de los casos. Además, se han identificado, de forma recurrente, mutaciones en RHOA y fusiones en CLDN18-ARHGAP. Sin embargo, no han sido identificadas mutaciones o amplificaciones que puedan ser utilizadas como dianas para tratamientos dirigidos.

Por último, nos encontramos con los tumores CIN, el subtipo molecular más frecuente, que aparece en el 50% de los casos aproximadamente. Se asocian con el subtipo difuso de la clasificación de Lauren, presente en hasta el 73% de los casos, y la localización proximal, sobre todo a nivel del cardias o la UGE en hasta dos tercios del total. En este subgrupo se han identificado mutaciones de p53 hasta en el 73% de los pacientes. Además, se ha observado la activación de diversos receptores tirosina quinasa, la amplificación de VEGF-A o de mediadores del ciclo celular como CCNE1, CCND1 y CDK6.

4. Diagnóstico.

La mayoría de los pacientes con cáncer gástrico en estadios iniciales se encuentran asintomáticos o mínimamente sintomáticos y, por lo tanto, el diagnóstico se hace, con frecuencia, cuando la enfermedad se encuentra en estadios más avanzados. Los síntomas más comunes, al diagnóstico, son la presencia de anorexia, dispepsia, pérdida de peso y dolor abdominal. En el caso de tumores ulcerados pueden producirse sangrados que pueden exteriorizarse en forma de hematemesis y/o melenas; en tumores del estómago distal, que obstruyen la salida gástrica, pueden aparecer vómitos y en aquellos situados en la UGE o el estómago proximal, disfagia.

Ante la sospecha de una neoplasia gástrica o de la UGE debe realizarse, en primer lugar, una endoscopia digestiva alta (EDA) con toma de biopsia para el diagnóstico histológico de malignidad. En caso de confirmarse dicha malignidad, se procederá a la realización del estudio de extensión para el estadiaje del tumor.

La estadificación del carcinoma gástrico ha mejorado en los últimos años con la incorporación de técnicas de imagen como la ecoendoscopia (USE), la tomografía computerizada (TC), el PET-TC, la RMN o técnicas quirúrgicas como la laparoscopia diagnóstica.

La USE representa uno de los pilares del estadiaje locorregional del carcinoma gástrico o de la UGE, tanto para la evaluación de la invasión tumoral en profundidad

(T) como para la detección de adenopatías locorregionales (N). Su eficacia ha sido demostrada en un metaanálisis, donde se objetivó una sensibilidad para diferenciar entre carcinomas gástricos superficiales (T1-2) y avanzados (T3-4) de 0.86 (IC del 95%: 0.81-0.90). Además, en lo referente a los tumores superficiales (T1a vs T1b) y el estado de los ganglios linfáticos (positivos vs negativos) la sensibilidad fue de 0.87 (0.81-0.92) y 0.83 (0.79-0.87), respectivamente. Como inconveniente de dicha técnica cabe destacar que la precisión de la USE es dependiente del operador²⁸.

En lo referente al TC, éste cumple dos funciones fundamentales en el diagnóstico y estadiaje del carcinoma gástrico o de la UGE. Por una parte, la determinación de invasión tumoral en profundidad (T), con precisión estimada entre el 43 y el 82%; y, por otra, la detección de enfermedad metastásica.

En relación al papel del PET-TC y la RMN, cabe resaltar que dichas pruebas de imagen no se utilizan de forma rutinaria en la estadificación del cáncer gástrico. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que el PET-TC podría mejorar los resultados a través de una mayor detección de ganglios linfáticos afectados y enfermedad metastásica. Sin embargo, dicha técnica no resulta siempre informativa, especialmente en pacientes con tumores mucinosos o con histología difusa, debido a la baja acumulación del trazador, lo que podría conducir a una infraestadificación del tumor. En el caso de la RMN, ésta se está posicionando especialmente para la detección de metástasis peritoneales, difíciles de diagnosticar con métodos de imagen convencionales^{29,30}.

Por último, analizaremos el papel de la laparoscopia en la estadificación. La laparoscopia diagnóstica, con o sin lavado peritoneal para las células malignas, sigue siendo un tema de controversia. Sin embargo, recientemente, grupos de expertos han recomendado incluirla en el estadiaje de pacientes con cáncer gástrico o de la UGE potencialmente curables. Así, en pacientes que están siendo considerados para la resección quirúrgica sin terapia preoperatoria, la laparoscopia podría ser útil para la detección de enfermedad metastásica radiográficamente oculta en pacientes con tumores T3 y/o afectación ganglionar en las pruebas de imagen preoperatorias.

Por otra parte, en pacientes que han recibido terapia preoperatoria, la laparoscopia junto con el lavado peritoneal, podría ayudar en la detección de enfermedad metastásica peritoneal microscópica, lo que contraindicaría la intervención quirúrgica³¹.

5. Estadiaje: AJCC TNM 7ª edición.

EL sistema TNM es la clasificación más utilizada en el mundo para el estadiaje de los pacientes con carcinoma gástrico y de la UGE, y ha sido adoptada por diversas organizaciones como la American Joint Committee on Cancer (AJCC), la Japanese Gastric Cancer Association (JGCA) y la European Society for Medical Oncology (ESMO)²⁵.

Esta clasificación estratifica los adenocarcinomas gástricos en cuatro estadios (I, II, III, IV) de acuerdo con la extensión del tumor primario (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia, o no, de metástasis a distancia (M) (Figura 8).

El empleo de sufijos permite determinar si el estadiaje se basa en los resultados obtenidos en la pieza quirúrgica (pTNM), si se trata de un estadificación clínica (cTNM), ecográfica (uTNM), o incluso si esta se ha realizado tras recibir el paciente tratamiento antineoplásico (ypTNM).

La aceptación universal de esta clasificación viene justificada por su capacidad de dividir, de manera fiable, los carcinomas gástricos en grupos según su pronóstico, así como por la facilidad de su empleo y reproducibilidad de los resultados.

T = Tumor primario

TX	No se puede evaluar el tumor primario
T0	No existe evidencia del tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade la lámina propia, muscularis mucosa o submucosa
T1a	El tumor invade la lámina propia o la muscularis mucosa
T1b	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscularis propia
T3	El tumor penetra el tejido conjuntivo de la subserosa sin invasión del peritoneo visceral o de las estructuras adyacentes
T4	El tumor invade la serosa (peritoneo visceral) o las estructuras adyacentes
T4a	El tumor invade la serosa (peritoneo visceral)
T4b	El tumor invade las estructuras adyacentes

N = Ganglios linfáticos regionales

NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe evidencia de metástasis a los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en 1-2 ganglios linfáticos regionales
N2	Metástasis en 3-6 ganglios linfáticos regionales
N3	Metástasis en ≥ 7 ganglios linfáticos regionales
N3a	Metástasis en 7-15 ganglios linfáticos regionales
N3b	Metástasis en ≥ 16 ganglios linfáticos regionales

M = Metástasis a distancia

MX	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	No existe evidencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2 T1	N0 N1	M0 M0
IIA	T3 T2 T1	N0 N1 N2	M0 M0 M0
IIB	T4a T3 T2 T1	N0 N1 N2 N3	M0 M0 M0 M0
IIIA	T4a T3 T2	N1 N2 N3	M0 M0 M0
IIIB	T4b T4b T4a T3	N0 N1 N2 N3	M0 M0 M0 M0
IIIC	T4b T4b T4a	N2 N3 N3	M0 M0 M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Figura 8. Clasificación AJCC TNM 7ª edición para el carcinoma gástrico. Adaptado de Washington et al. Ann Surg Oncol. 2010 Dec;17(12):3077-9.

6. Factores pronósticos.

Se definen como factor pronóstico toda aquella variable biológica, histopatológica o molecular que influye en la evolución de la enfermedad neoplásica, determinando la historia natural de la misma.

En el carcinoma gástrico reseccionado el estadiaje tumoral, de acuerdo a la clasificación AJCC TNM, es el principal factor pronóstico utilizado en la práctica clínica diaria. En relación al mismo, la mayor parte de los datos disponibles se derivan de series que estratificaron los resultados usando como referencia la clasificación AJCC TNM 6ª edición. Sin embargo, más recientemente, se ha llevado a cabo una actualización de dicha clasificación, la AJCC TNM 7ª edición, que establece el pronóstico de los pacientes en función del estadiaje usando como referencia las tasas de supervivencia de más de 10.000 pacientes sometidos a cirugía entre 1991 y 2000; la cual oscila entre el 70.8% para los estadios IA y 4% para los estadios IV a los 5 años²⁵ (Figura 9).

Además, han sido desarrollados nomogramas que en base a diversos parámetros clínicopatológicos permiten predecir la probabilidad de supervivencia condicional después de una resección R0. Entre las principales críticas a dichos nomogramas se encuentra que no tienen en cuenta los tratamientos adyuvantes o perioperatorios, y, por lo tanto, pueden predisponer el pronóstico en ciertos grupos de pacientes. A fecha de hoy, dichos nomogramas carecen de aplicabilidad en la práctica clínica diaria³²⁻³⁴.

En lo referente a biomarcadores pronósticos, a fecha de hoy, carecemos de biomarcadores pronósticos validados que nos permitan identificar subgrupos de peor pronóstico.

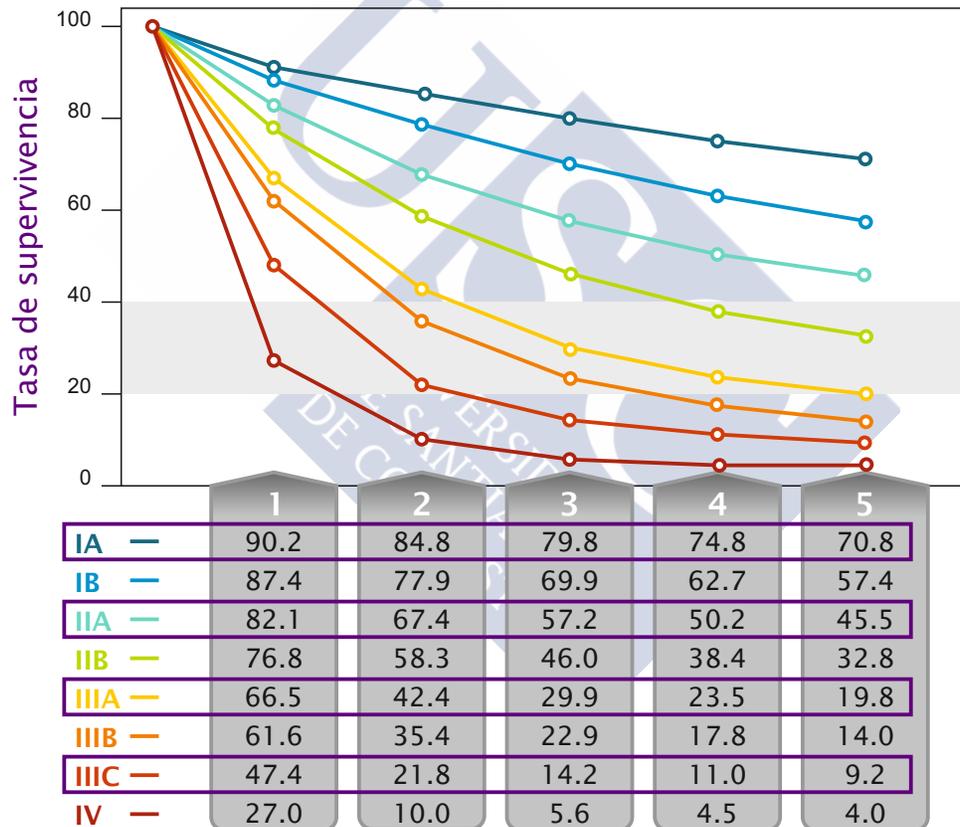


Figura 9. Tasas de supervivencia tras cirugía para los diferentes estadios acorde a la AJCC TNM 7ª edición.

Adaptado de Washington et al. Ann Surg Oncol. 2010 Dec;17(12):3077-9.

7. Tratamiento

7.1 Enfermedad resecable.

7.1.1 Tratamiento quirúrgico.

La cirugía es el tratamiento inicial y la única opción curativa para los pacientes con cáncer gástrico localizado. El objetivo principal de la cirugía es la resección completa con márgenes adecuados, de al menos 4 cm, y una linfadenectomía adecuada. El tipo de resección, ya sea mediante una gastrectomía total o parcial, junto a la extensión de la disección ganglionar continúan siendo temas controvertidos. En la práctica diaria, la gastrectomía subtotal es de elección para el carcinoma gástrico distal, mientras que la gastrectomía total es de elección para los tumores localizados en el tercio superior del estómago, histología con células en anillo de sello o con presencia de gastritis atrófica asociada. En estadios muy avanzados, con afectación de órganos vecinos como el páncreas, el hígado, el bazo, el colon transversal, el riñón, la glándula suprarrenal, el intestino delgado o el retroperitoneo (T4); la cirugía requiere la resección en bloque de las estructuras afectas. Por el contrario, en estadios muy iniciales (T1a), la resección endoscópica podría ser una alternativa válida al tratamiento quirúrgico³⁵⁻³⁸.

7.1.1.1 Linfadenectomía

La linfadenectomía ha sido motivo de controversia en el carcinoma gástrico, tanto en lo referente al número mínimo de adenopatías que deben extraerse, como a los territorios ganglionares que deben abordarse.

En relación al número de adenopatías, un análisis retrospectivo en población occidental ha demostrado que la disección de al menos 15 ganglios linfáticos mejora la supervivencia de pacientes con carcinoma gástrico sometidos a resección radical. Así, un análisis de la SEER, en el que se incluyeron 1 377 pacientes diagnosticados de carcinoma gástrico localmente avanzado sometidos a resección radical, demostró que los pacientes en los que se habían resecado al menos 15 adenopatías N2 y más de 20 N3 presentaban una mejor supervivencia^{39,40}.

Por otra parte, en lo referente a la extensión de linfadenectomía, la JGCA ha definido las estaciones ganglionares, así como los tipos de linfadenectomía a realizar. Así, para una gastrectomía total, una linfadenectomía D1 incluye una disección de las estaciones 1 a 6; una D0 incluye una disección incompleta de los territorios anteriormente descritos y una D2 incluye, además de los niveles 1 a 6 anteriormente descritos, la resección de las estaciones 7 a 11^{41,42} (Figura 10).

Tipo de linfadenectomía	Adenopatías resecaadas
D0	Resección incompleta de los ganglios linfáticos N1 Curvatura menor (estaciones 1, 3 y 5) Curvatura mayor (estaciones 2, 4 y 6)
D1	Resección completa de los ganglios linfáticos N1 Curvatura menor (estaciones 1, 3 y 5) Curvatura mayor (estaciones 2, 4 y 6)
D2	Resección completa de los ganglios linfáticos N1 Curvatura menor (estaciones 1, 3 y 5) Curvatura mayor (estaciones 2, 4 y 6) Además: Territorio arteria gástrica izquierda (estación 7) Territorio arteria hepática común. (estación 8) Tronco celiaco (estación 9) Hilio esplénico (estación 10). Arteria esplénica. (estación 11)

Figura 10. Tipos de resección ganglionar en función de la extensión de la linfadenectomía. Adaptado de Japanese Gastric Cancer Association. Gastric Cancer. 2011 Jun;14(2):113-23.

Mientras que en población asiática la combinación de una gastrectomía, ya sea total o subtotal, asociada a una linfadenectomía D2 se considera la técnica de elección; en población occidental la extensión de la linfadenectomía continúa siendo un tema de controversia, debido a los resultados discordantes de los estudios llevados a cabo en dicha población y que detallaremos a continuación.

En primer lugar, en el Estudio del Grupo Holandés de Cáncer Gástrico (DGCGT), que randomizó a 711 pacientes a una linfadenectomía D2 vs D1, la linfadenectomía D2 se asoció a un aumento significativo de la morbilidad (25 vs. 43%, $p < 0.001$) y la mortalidad postoperatoria (4 vs. 10%, $p = 0.004$), pero sin impacto en la SG (30 vs. 35%, $p = 0.53$). Sin embargo, en los datos de supervivencia a largo plazo, con una mediana de seguimiento de 15 años, la linfadenectomía D2 se asoció a una menor tasa de recidivas locales (12 vs. 22%), regionales (13 vs. 19%) y de muertes relacionadas con el cáncer (37 vs. 48%) y un beneficio no significativo en SG, con una tasa de SG a 15 años del 21 y 29% respectivamente ($p = 0.34$)^{43,44}.

Por otra parte, el British Cooperative trial (BCT) tampoco consiguió demostrar el beneficio de la linfadenectomía D2 frente a la linfadenectomía D1. Así, la linfadenectomía D2 se asoció con aumento de la morbilidad y la mortalidad postoperatorias sin impacto en la SG a 5 años (35 vs. 33%)⁴⁵.

En relación a un estudio unicéntrico retrospectivo no randomizado llevado a cabo en nuestro país, en que se analizaron 85 pacientes sometidos a una linfadenectomía D1 y 71 pacientes sometidos a una linfadenectomía D2, la D2 se asoció con mejores tasas de SG (50.6 vs. 41.4%), sin diferencias significativas en la morbilidad (48.2 vs. 53.5%) ni en la mortalidad postoperatorias (2.3 vs 0%)⁴⁶.

Por otra parte, en un estudio fase II randomizado del Grupo Italiano para el Estudio de Cáncer Gástrico (IGCS), que comparó la linfadenectomía D2 y D1 en 267 pacientes, no se evidenciaron diferencias significativas en la morbimortalidad postoperatoria, con una tasa de mortalidad del 17.9 y 12% respectivamente ($p=0.183$); ni en lo referente a la mortalidad en los 30 primeros días del postoperatorio, con un 3% frente a un 2.2% respectivamente ($p=0.722$). En lo referente a la supervivencia, no se observaron diferencias en la tasa de SG a 5 años, con un 66.5% frente al 64.2% ($p=0.695$). Sin embargo, la linfadenectomía D2 se asoció con una tendencia no significativa a una mejor SLP en paciente con tumores localmente avanzados y enfermedad ganglionar ($p=0.055$)^{47,48}.

Por último, más recientemente, en un metaanálisis que incluyó 1642 pacientes de 5 estudios todos ellos sometidos a cirugía curativa entre 1982 y 2005, se analizó el beneficio de la linfadenectomía D2 frente a la D1. Se observó que la linfadenectomía D2 se asoció con una mayor mortalidad hospitalaria postoperatoria (7.5 vs 3.8%, $p=0.0003$), una tasa de reoperación significativamente superior (11.4 vs. 5.1%, $p=0.0001$); pero, sin objetivarse diferencias en la SG a 5 años (44.9 vs. 43.5%, $p=0.58$). Sin embargo, en un subanálisis de los estudios llevados a cabo más recientemente no se objetivaron diferencias en mortalidad entre ambos grupos (1.2 vs 1.5%, $p=0.70$). Por otra parte, en relación a la mortalidad asociada a la esplenectomía o pancreatometomía profiláctica, se objetivó una mayor tasa de mortalidad en los pacientes sometidos a la resección profiláctica de ambos órganos (5.9 vs. 16.1%, $p=0.02$)⁴⁹.

En base a los estudios anteriormente referidos, la realización de una gastrectomía, ya sea total o subtotal, en combinación con una linfadenectomía D1 o D2 modificada, evitando la pancreatometomía o esplenectomía profiláctica, y con la resección de al menos 15 ganglios linfáticos, debe ser considerado el tratamiento de elección en el carcinoma gástrico o de la UGE en población occidental^{35-40,46-49}.

7.1.2 Tratamiento complementario

Pese a los avances llevados a cabo en el tratamiento quirúrgico en los últimos años, que hemos descrito con anterioridad, la cirugía continúa siendo curativa exclusivamente estadios iniciales (T1). En estadios localmente avanzados resecables, las tasas de supervivencia a los 5 años continúan siendo pobres, oscilando entre el 10 y el 50%, por lo que son necesarias estrategias de tratamiento complementario²⁵.

Diversas estrategias como la quimioterapia perioperatoria, la radioquimioterapia adyuvante o la quimioterapia adyuvante han sido testadas con un beneficio absoluto en las tasas de SG en torno al 10-15%, pero sin que a fecha de hoy exista unanimidad sobre cuál es la estrategia de elección. Así, mientras que la quimioterapia perioperatoria es la estrategia más popular en Europa, en EEUU predomina la radioquimioterapia adyuvante y en Asia, la quimioterapia complementaria⁵⁰⁻⁵⁵ (Figura 11).

Estudio	Población	Tipo Tto	Estadios	D2	SG 5 años
INT 0116 2001	EEUU	RTQT	IB - Iva	10%	43 vs 28%
MAGIC 2006	Europea	QT periop.	II-III	28%	36 vs 23%
ACTS GC 2007	Asiática	QT ady.	II-III	100%	78 vs 69%
FNCLCC 2011	Europea	QT periop.	NA	NA	38 vs 24%
CLASSIC 2012	Asiática	QT ady	II-III	100%	71.7 vs 61.1%
ARTIST 2012	Asiática	QT ady +/- RT	IB - Iva	100%	73 vs 75%
CRITICS 2016	Europea	QT periop +/- RTQT	IB - IVa	NA	41.3 vs 40.9%

Figura 11. Estudios fase III en adenocarcinoma gástrico o UGE localmente avanzados resecables.

7.1.2.1 Radioquimioterapia adyuvante

El beneficio de la radioquimioterapia adyuvante fue testado en un estudio fase III randomizado multicéntrico, el estudio SWOG 9008/INT-0116, que comparó un esquema de radioquimioterapia basal en 5-fluorouracilo (5-FU) en bolus y leucovorin (LV) frente a observación en 556 pacientes sometidos cirugía con intención curativa, 69% de los cuales presentaban tumores localmente avanzados y el 85% afectación ganglionar. El tratamiento postoperatorio se asoció con un aumento significativo de

la SLE y la SG, con una mediana de SG de 36 meses para el brazo de tratamiento frente a 27 meses para el brazo de observación ($p=0.005$). También se objetivó un beneficio significativo en la tasa de SG y SLE a los 3 años, con una tasa SG a 3 años de 50 vs 41% ($p=0.005$), y una tasa de SLE a 3 años de 48 vs. 31% ($p<0.001$), respectivamente. En lo referente a los datos de supervivencia a largo plazo, con una mediana de seguimiento de 10 años, se confirmó el beneficio significativo en SG y SLE, con una mediana de 35 vs. 27 meses y 27 vs. 19 meses, respectivamente ($p<0.001$). Además, en un análisis del patrón de recurrencia, la radioquimioterapia adyuvante se asoció a una reducción significativa de las recidivas locorregionales, 24 vs. 36% ($p<0.01$), pero sin diferencias en las recidivas a distancia (11 vs 11%, $p=NS$)^{50,56}.

Sin embargo, dicho tratamiento fue relacionado con importantes tasas de toxicidad grave, grado 3-4, entre las que se incluía un 54% de toxicidad hematológica y un 33% de toxicidad gastrointestinal; lo que conllevó que solo un 64% de los pacientes completaran el tratamiento adyuvante, con un 17% de suspensiones de tratamiento por toxicidad y 3 muertes tóxicas. Por dicho motivo, diversos esquemas de alternativos de tratamiento han sido testados con un perfil de toxicidad más tolerable, y sin comprometer la eficacia^{50,56,57}.

Más recientemente, otro estudio randomizado, el estudio ARTIST, testó el papel de la adicción de radioterapia adyuvante a esquema de quimioterapia basado en cisplatino y capecitabina en población asiática reseca con intención curativa y

la realización de una linfadenectomía D2. La radioquimioterapia adyuvante se asoció con un beneficio no significativo en SLE, con una tasa a 3 años de 78 vs 74% ($p=0.0862$) y sin diferencias en SG a 5 años, 73 vs. 75% ($p=0.484$). Sin embargo, en un subanálisis de los pacientes con afectación ganglionar, el tratamiento de combinación se asoció con un aumento de la SLE, con una tasa de SLE a los 3 años 77.5 vs. 72.3% ($p=0.0365$). En base a estos resultados, se ha puesto en marcha nuevo estudio, el ARTIST II, que pretende testar el beneficio de la radioquimioterapia en pacientes con afectación ganglionar tras linfadenectomía D2 (NCT0176146)⁵¹.

Por otra parte, el estudio CRITICS, ha comparado el papel de la radioquimioterapia frente a la quimioterapia adyuvante tras la administración de quimioterapia perioperatoria y cirugía con intención radical en población europea tras linfadenectomía D1-2. En los resultados preliminares comunicados en ASCO 2016, no se han objetivado diferencias en SG, con una tasa de SG 5 años 41.3% para el brazo de radioquimioterapia frente al 40.9% para el brazo de quimioterapia ($p=0.99$). A fecha de hoy, a la espera de la publicación de los datos definitivos, no existe evidencia que avale la administración de radioquimioterapia adyuvante tras la administración de quimioterapia perioperatoria y cirugía con intención radical⁵².

7.1.2.2 Quimioterapia perioperatoria.

La quimioterapia perioperatoria se considera el tratamiento complementario de elección para el carcinoma gástrico localmente avanzado resecable en población europea en base a dos estudios fase III randomizados: el estudio MAGIC y el FNCLCC^{54,58}.

El estudio MAGIC testó la eficacia de la quimioterapia perioperatoria basada en el esquema ECF (epirrubicina, cisplatino y 5-FU) frente a la cirugía sola en pacientes con carcinoma gástrico o de la UGE localmente avanzado resecable, estadios II y III. Se incluyeron un 56% de pacientes localmente avanzados y un 71% de pacientes con afectación ganglionar. La administración de quimioterapia perioperatoria se asoció con un aumento significativo de la supervivencia, con una tasa de SG a 5 años del 36% vs. 23% ($p < 0.001$)⁵⁸.

Por otra parte, el estudio FNCLCC, que analizó el papel de la quimioterapia perioperatoria basada en cisplatino y 5-FU frente a la cirugía sola en adenocarcinomas gástricos, de la UGE o el esófago inferior resecables, mostró resultados similares, objetivándose un beneficio significativo en SG y SLE, con una tasa de SG a 5 años del 38% para la quimioterapia perioperatoria en comparación con un 24% para la cirugía sola ($p = 0.02$)⁵⁴.

7.1.2.3 Quimioterapia adyuvante.

La quimioterapia adyuvante es, a fecha de hoy, el tratamiento de elección tras la cirugía con intención radical en población asiática. El papel de dicha estrategia de tratamiento ha sido testado en dos estudios fase III randomizados recientes en población asiática tras linfadenectomía D2: el estudio ACTS GC y el estudio CLASSIC^{53,55,59}.

El estudio ACTS GC, realizado íntegramente en población japonesa, evaluaba la administración de S1 durante 1 año frente a cirugía sola en pacientes con cáncer gástrico estadio II-III que fuesen sometidos a una resección R0 con una linfadenectomía D2. La administración de quimioterapia adyuvante se asoció con un aumento significativo de la SG, con una tasa SG a 3 años del 80.1% vs. el 70.1% para los pacientes sometidos exclusivamente a cirugía ($p=0.003$); beneficio que se confirmaba en la tasa de SG a 5 años (71.7% vs 61.1%). En lo referente al cumplimiento del tratamiento, un 65.8% de los consiguió completar el tratamiento adyuvante, lo que revela una alta tasa de cumplimiento en relación con la radioquimioterapia o la quimioterapia perioperatoria^{53,59}.

Por otra parte, el estudio CLASSIC, que evaluó el papel de la quimioterapia adyuvante basada en una combinación de capecitabina y oxaliplatino durante 6 meses en pacientes con cáncer gástrico estadio II-III B tras resección R0 con linfadenectomía D2 y, al menos, 15 ganglios resecados. La quimioterapia adyuvante se asoció con un incremento significativo de la supervivencia, con una tasa de SLE a los 3 años del 74% para el tratamiento adyuvante frente a un 59% para el brazo de la cirugía ($p<0.0001$); que se confirmaba posteriormente con una tasa de SG a 5 años del 78% y el 69%, respectivamente ($p=0.0015$)⁵⁵.

7.2 Enfermedad irreseccable o metastásica.

El pronóstico de los pacientes con carcinoma gástrico metastásico, a fecha de hoy, continúa siendo muy pobre con medianas de supervivencia que oscilan entre los 4 meses para los pacientes que reciben cuidados de soporte exclusivamente y los 12 meses para los pacientes que reciben quimioterapia de combinación. Sin embargo, debido al beneficio en supervivencia que, aunque es discreto, se asocia al tratamiento antineoplásico, así como al mejor control sintomático y la mejoría en términos de calidad de vida; la quimioterapia se considera de elección para todos aquellos pacientes que presenten buen estado general y adecuada función de órganos^{60,61}.

El tratamiento del carcinoma gástrico avanzado ha ido evolucionando en los últimos años. Así, en la década de 1980, el esquema FAM (5-FU, adriamicina y mitomicina) era considerado el tratamiento de elección, en base al estudio NCCTG, que comparaba el esquema FAM con 5-FU en monoterapia y 5-FU adriamicina, en el que no se objetivaron diferencias en SG entre los 3 brazos, pero si unas mayores tasas de respuesta en los brazos de quimioterapia de combinación. Posteriormente, un estudio fase III randomizado compararía el esquema FAMTX (5-FU, adriamicina y metotrexato) con el clásico esquema FAM, demostrando un beneficio significativo

en SG y tasa de respuestas, convirtiendo el esquema FAMTX en tratamiento de elección. Más adelante, el esquema ECF (epirrubicina, cisplatino y 5-FU) sería testado frente al esquema FAMTX, demostrando un incremento significativo de SG y tasa de respuestas, convirtiéndose en el estándar de tratamiento de primera línea de carcinoma gástrico avanzado, que ha llegado a nuestros días. Así, aun a fecha de hoy, los tripletes de quimioterapia basados en epirrubicina continúan siendo considerados tratamiento de elección⁶²⁻⁶⁵.

Sin embargo, el papel de la epirrubicina en el tratamiento del adenocarcinoma gástrico avanzado resulta controvertido, por lo que han sido llevados a cabo dos metaanálisis con el objetivo de intentar dilucidar dicha cuestión. Por una parte, en un metaanálisis llevado a cabo por la Cochrane se ha sugerido el beneficio de la adición de la epirrubicina a un régimen basado en cisplatino y 5-FU (HR 0.77; IC 95% 0.62-0.95); mientras que el metaanálisis del GASTRIC group, basado en los datos individuales de los pacientes, mostraba la ausencia de papel de la epirrubicina en combinación con una fluoropirimidina y un platino. En base a estos resultados, a fecha de hoy, seguimos sin conocer el papel de la epirrubicina en el tratamiento de primera línea del carcinoma gástrico o de la UGE avanzado^{60,66}.

Por otra parte, en relación a la composición de los dobletes basados en

platinos y fluoropirimidinas, varios estudios han sido llevados a cabo para evaluar la posibilidad de sustituir el cisplatino por oxaliplatino, y el 5-FU por capecitabina, con el objetivo de disminuir la toxicidad y evitar la necesidad de colocación de una vía central.

Así, el German Study Group, comparó el esquema FLO (5-FU, leucovorin y oxaliplatino) con el FLP (5-FU, leucovorin y cisplatino); demostrando que el esquema FLO presentaba un perfil de toxicidad favorable y una tendencia no significativa a una mejor SLP, con una mediana de 5.8 meses para el esquema FLO frente a 3.9 meses para el esquema FLP ($p=0.077$) sin diferencias significativas en la SG, con una mediana de 10.7 vs. 8.8 meses, respectivamente. Además, cuando se analizaba el subgrupo de mayores de 65 años, el esquema FLO se asociaba con una mayor tasa de respuestas (41.3% vs. 16.7%, $p=0.012$) y un aumento significativo de la SLP (6 vs. 3.1 meses, $p=0.029$) y la SG (13.9 vs. 7.2 meses), en comparación con el esquema FLP⁶⁷.

En esta misma línea, el estudio REAL-2, un estudio fase III con diseño dos por dos de no inferioridad, testó el papel de sustituir el cisplatino por oxaliplatino y el 5-FU por capecitabina en un esquema de quimioterapia basado en epirrubicina. No se observaron diferencias en SG, SLP ni en tasas de respuestas entre los cuatro regímenes de quimioterapia. No obstante, las combinaciones basadas en

oxaliplatino presentaron un perfil de toxicidad favorable cuando se comparaban con esquemas basados en cisplatino, con una menor incidencia de neutropenia, alopecia, toxicidad renal y tromboembolismo; pero con mayor tasa de diarrea y neuropatía. En contraposición, no se encontraron diferencias en términos de toxicidad al comparar los esquemas basados en 5-FU y capecitabina⁶⁸.

En paralelo, el estudio ML17032, un estudio fase III randomizado de no inferioridad, comparó la combinación de cisplatino capecitabina (XP) con el estándar de tratamiento cisplatino 5-FU (FP). El esquema XP se asoció con la no inferioridad en términos de SLP, con una mediana de 5.6 meses para el esquema XP frente a 5 meses para el esquema FP. Además, XP se asoció con un aumento de la tasa de respuestas, 41 vs. 29%, y SG, 10.5 vs. 9.3 meses; sugiriendo que la capecitabina es una alternativa eficaz al 5-FU en el carcinoma gastroesofágico avanzado⁶⁹.

Por otra parte, también ha sido testado el papel de los triplete basados en taxanos. Así, el estudio V325 comparó la combinación de docetaxel, cisplatino y 5-FU (TCF) con un doblete basada en cisplatino y 5-FU. El esquema TCF se asoció con un incremento significativo del tiempo a la progresión (5.6 vs. 3.7 meses, $p < 0.001$), la SG (9.2 vs. 8.6 meses, $p = 0.02$) y la tasa de respuestas (37% vs. 25%, $p = 0.01$) en comparación con el doblete CF. Sin embargo, también se relacionó con un

incremento significativo de la toxicidad, sobre todo en lo referente a neutropenia, mucositis y diarrea; motivo por el cual su uso se ha visto limitado, aún a fecha de hoy⁷⁰.

Por último, también se ha estudiado el papel de irinotecan en el tratamiento del adenocarcinoma gástrico avanzado. Así, en un estudio fase III de no inferioridad, la combinación de irinotecan, 5-FU y leucovorin (IF) se comparó con el esquema CF; demostrándose que IF era no inferior a CF en términos de SLP pero no en términos de tiempo a progresión o SG. Sin embargo, el esquema IF se asoció con un perfil de toxicidad más favorable. Por otra parte, el estudio fase III del French Intergroup Study, comparó FOLFIRI con ECX como tratamiento de primera línea. FOLFIRI se asoció con un aumento significativo del tiempo hasta el fallo del tratamiento, con una mediana de 5.1 meses para el brazo de FOLFIRI frente a 4.2 meses para ECX ($p=0.008$) pero sin impacto en la SLP (5.3 vs. 5.8 meses, $p=0.96$), la SG (9.5 vs 9.7 meses, $p=0.95$), o la tasa de respuestas (39.2% vs 37.8%). Además, el tratamiento con FOLFIRI se asoció con un perfil de toxicidad favorable, por lo que, al igual que en el estudio anterior, las combinaciones basadas en irinotecan podrían considerarse una alternativa al tratamiento con platinos^{71,72} (Figura 12).

Estudio	Tratamiento	Tasa respuestas (%)	Supervivencia global (meses)
MacDonald 1980	FAM	42%	5.5
Wils 1991	FAMTX vs FAM	41 vs 9 %	9.7 vs 6.7
Webb 1997	ECF vs FAMTX	45 vs 21%	8.9 vs 5.7
Van Cutsem 2006	DCF vs CF	24 vs 24%	9.6 vs 8.2
Cunningham 2008	ECF vs ECX vs EOF vs EOX	41 vs 46 vs 42 vs 48%	9.9 vs 9.9 vs 9.3 vs 11.2
Al-Batran 2008	PFO vs PFL	35 vs 25%	10.7 vs 8.8
Dank 2008	IF vs CF	31 vs 25%	9 vs 8.7
Ryu 2009	XP vs FP	41 vs 29%	10.5 vs 9.3
Bang 2010	T-XP/T-FP vs XP/FP	47 vs 35%	13.8 vs 11
Guimbaud 2014	FOLFIRI vs ECX	39 vs 37%	9.5 vs 9.7

Figura 12. Estudios fase III en primera línea de carcinoma gástrico avanzado o metastásico.

En lo referente a las dianas dirigidas, en la década de los años 2000, diversos agentes con actividad frente a los distintos receptores del factor de crecimiento epidérmico, las vías antiangiogénicas, las moléculas de adhesión y los mediadores de la transducción intracelulares han sido testados⁷³⁻⁷⁹.

De todos ellos, solo trastuzumab, un fármaco con actividad frente al receptor de HER2, en combinación con un doblete platino y fluoropirimidina, ha mejorado los resultados en supervivencia, superándose por primera vez el umbral de los 12 meses de mediana de SG para una población seleccionada. Los resultados se describirán con mayor detalle en el apartado correspondiente⁷⁵.

Sin embargo, pese a los avances producidos en los últimos años, el beneficio de la primera línea de tratamiento continúa siendo limitado con una mediana de SG que oscila entre los 9 y los 11 meses en población no seleccionada. Por dicho motivo, se han desarrollado diversos estudios randomizados que han demostrado el beneficio de administrar una segunda línea de tratamiento tras la progresión en pacientes que mantengan buen estado general y adecuada función orgánica, y que detallaremos a continuación.

En lo referente a la población europea, dos estudios han testado el papel de la quimioterapia de segunda línea en comparación con el mejor tratamiento de soporte (BSC). Por una parte, el estudio del grupo AIO, llevado a cabo en Alemania, comparó la administración de irinotecan en monoterapia frente a BSC. La administración de irinotecan se asoció con un aumento significativo en supervivencia, con una mediana de SG de 4 meses para el brazo de irinotecan frente a 2.4 meses para el brazo de BSC ($p=0.012$); y con una tasa de control de enfermedad del 53%. Por otra parte, el estudio COUGAR-02, realizado en Reino Unido, testó el papel de docetaxel en monoterapia, demostrando un beneficio en términos de SG, con una mediana de 5.1 meses para los pacientes que recibieron docetaxel frente a 3.6 meses para los pacientes que recibieron BSC ($p=0.01$)^{80,81}.

En paralelo, en población asiática, un gran estudio fase III comparó la administración de quimioterapia, ya fuese irinotecan o docetaxel, frente al BSC. La administración de quimioterapia, independientemente del esquema de tratamiento, demostró un incremento significativo en SG, con una mediana de SG de 5.3 vs. 3.8 meses ($p=0.007$). Sin embargo, no se objetivaron diferencias en supervivencia entre los pacientes que recibieron irinotecan y docetaxel ($p=0.116$)⁸².

En base a estos resultados se estableció la administración de taxanos o irinotecan como tratamiento de elección para el carcinoma gástrico avanzado en progresión a una primera línea de quimioterapia.

Más recientemente, ramucirumab, un anticuerpo antiVGEFR-2, ha cambiado el paradigma del tratamiento de segunda línea del carcinoma gástrico avanzado en base a dos grandes estudios: el estudio RAINBOW y el REGARD^{83,84}.

El estudio RAINBOW, un fase III randomizado que testaba la adicción de ramucirumab a un esquema de quimioterapia basado en paclitaxel, demostró un incremento significativo en SG, con una mediana de 9.6 meses para el tratamiento de combinación vs 7.4 meses para paclitaxel en monoterapia ($p=0.017$). Además, se asoció con un beneficio en términos de SLP, tasa de respuestas y un perfil de toxicidad manejable. Por otra parte, el estudio REGARD, un estudio fase III que comparaba ramucirumab con placebo en pacientes no candidatos a tratamiento con taxanos, mostró que ramucirumab se asociaba con un incremento significativo de la SG, con una mediana de 5.2 meses en comparación con 3.8 meses para los pacientes que recibían placebo ($p=0.047$). En base a estos estudios, la combinación de paclitaxel-ramucirumab se ha convertido en el tratamiento de elección para la segunda línea del carcinoma gástrico avanzado. Sin embargo, en pacientes que presentasen un peor estado general (ECOG PS2) podrían plantearse otras opciones como los taxanos o irinotecan en monoterapia; y en aquellos no candidatos a recibir taxanos, la posibilidad de ramucirumab en monoterapia^{83,84}.

8. La familia del factor de crecimiento epidérmico humano (HER). Generalidades.

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) está formada por cuatro receptores: HER1, también denominado factor de crecimiento epidérmico o EGFR; HER2, HER2-neu o ERBB2; HER3 o ERBB3; HER4 o ERBB4.

Todos los componentes de la familia HER presentan una elevada homología entre si y comparten una estructura común, formada por un dominio extracelular (ECD) de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa⁸⁵.

La unión del ligando al ECD desencadena cambios conformacionales de receptores que exponen el dominio de dimerización para la unión a otro receptor, induciendo la formación de homodímeros/heterodímeros que, posteriormente, provocan la activación del dominio tirosina quinasa de ambos recetores.

A pesar de poseer los mismos dominios esenciales, existen diferencias en la actividad funcional de cada receptor de la familia HER. Así, EGFR y HER4 poseen actividad tirosina quinasa y varios ligandos con capacidad para unirse a su dominio extracelular, como Betacelulina, Heregulina, TGF α , HB-EGF, Amphirregulina o Neuregulina. Por el contrario, HER3 comparte la capacidad de unirse a varios de estos

ligandos, pero carece de actividad tirosina quinasa intrínseca, presentando en su lugar seis puntos de unión a fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), estimulando intensamente dicha vía, en cooperación con HER2.

Así, HER3, una vez activado, se dimeriza, fundamentalmente con HER2, con la activación del receptor tirosina quinasa de dicho receptor. En lo referente a HER2, no han sido identificados ligandos conocidos pero, en contraposición, presenta la actividad catalítica más potente. Además, el ECD de HER2 presenta una conformación abierta permanentemente, por lo que puede dimerizarse con facilidad con otros receptores de la familia HER. Debido a las características anteriormente descritas, el heterodímero HER2-HER3 presenta la capacidad de señalización más potente⁸⁶⁻⁹⁰.

Tras el proceso de dimerización del receptor, se produce la fosforilación cruzada de cada uno de los dos componentes del mismo, creando un cambio conformacional que facilita el reclutamiento y la unión de los efectores de las vías a activar y la transmisión de la señal intracelular, lo que conduce a la activación dos vías de señalización fundamentalmente: la vía de las MAP quinasas (MAPK) y la vía del PI3K-Akt.

La activación de la vía MAPK produce un incremento en la transcripción de genes que controlan la proliferación y la migración celular, la diferenciación celular y la angiogénesis a través de un incremento en los niveles de expresión de, entre otros, Ciclinas D1 y D2, Myc y VEGF-A.

Por otra parte, la activación de la vía de PI3K-Akt conduce a un aumento de la supervivencia celular y las señales antiapoptóticas. En primer lugar, la activación de PI3K se produce mediante su unión y fosforilación directa por los residuos tirosina quinasa de los dímeros o a través de moléculas adaptadoras unidas a los dímeros como es el complejo GRB2-Sos-Ras. Tras la fosforilación de PI3K se produce la activación de Akt, familia de moléculas con actividad serina-treonina-quinasa que, mediante sucesivas fosforilaciones en cascada de múltiples proteínas, inician un proceso que regula la supervivencia celular, el ciclo celular y la supresión de la apoptosis a través de la activación o supresión de, entre otros, mTOR, p27, BAD, NK- κ B, GSK3 β ^{87,88,91-95} (Figura 13).

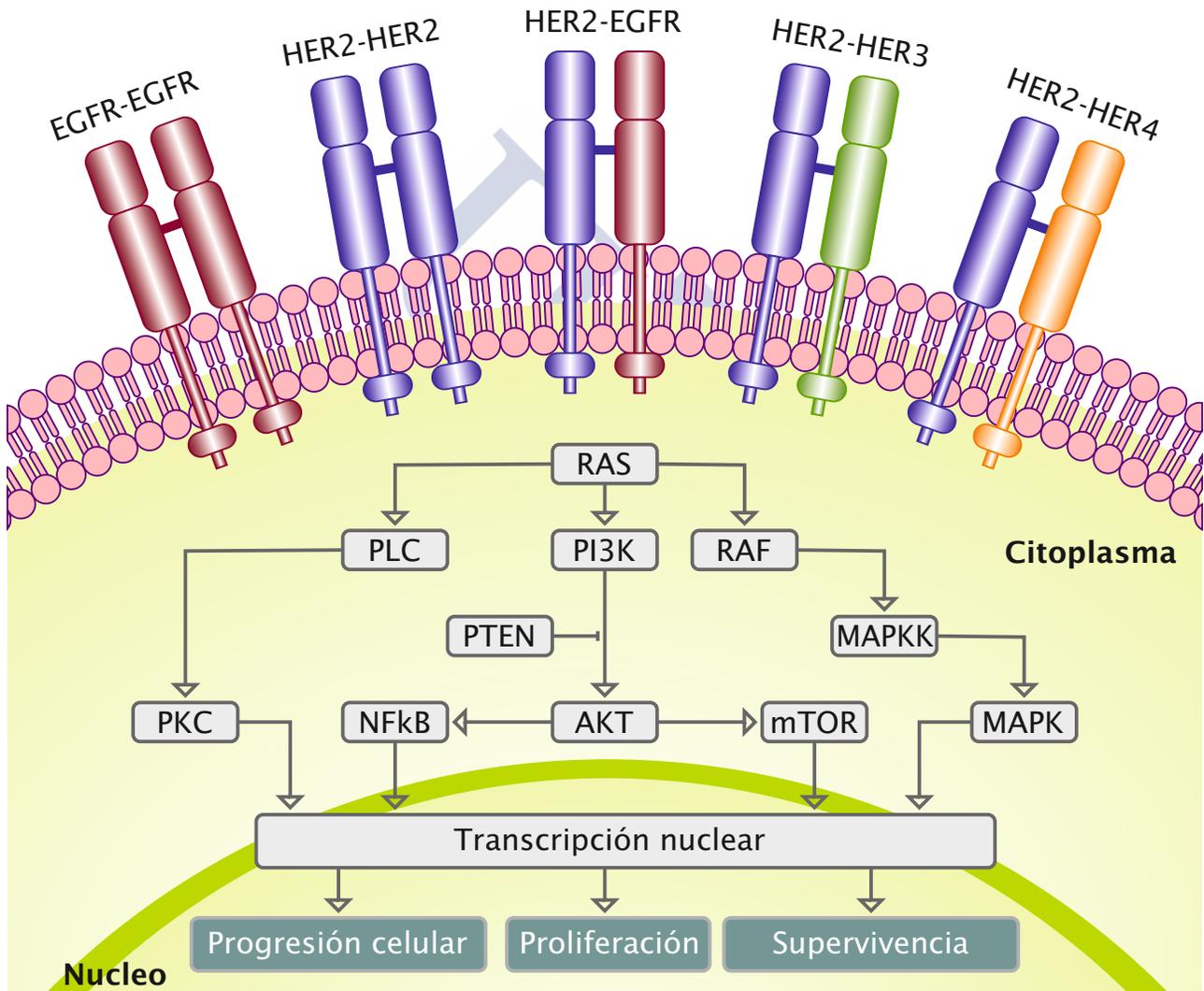


Figura 13. Principales vías de señalización reguladas por los receptores HER.
 Fornaro et Al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jun 7;8(7):369-83.

9. HER2 y su papel en la tumorigénesis.

El oncogén HER2/neu se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17q11.2-q12) y codifica la proteína HER2, una proteína de 185kDa cuya estructura y función hemos descrito anteriormente. De todos los miembros de la familia HER, ha sido el más ampliamente estudiado, clásicamente, en el cáncer de mama y, más recientemente, en el cáncer gástrico o de la UGE.

En lo referente al cáncer de mama, el estatus de HER2 ha demostrado su papel como un factor de mal pronóstico, tanto en enfermedad metastásica como localizada; sin embargo la aparición de terapias dirigidas antiHER2, para las cuales la amplificación de HER2 es un biomarcador predictivo de respuesta a la terapia antiHER2, ha mejorado, en consecuencia, el pronóstico de estos pacientes. Además, los tumores de mama HER2 amplificados se han caracterizado por un patrón cohesivo de características clínicas que incluye un patrón de diseminación y recurrencias diferenciado.

Así, en un estudio retrospectivo del MD Anderson de 2091 pacientes con cáncer de mama avanzado se analizó la evolución de 3 cohortes de pacientes, las HER2 negativas, las HER2 positivas tratadas con trastuzumab y las HER2 positivas no tratadas con terapia antiHER2, apreciándose que las HER2 positivas tratadas con terapia antiHER2 presentaban mejor supervivencia que las otras dos cohortes⁹⁶⁻⁹⁸.

Por otra parte, en un estudio de 3726 mujeres, se analizó el impacto pronóstico y en el patrón de recurrencia en función del subtipo molecular. Así, los

tumores HER2/luminales y HER2 puro se asociaron con una mediana de supervivencia significativamente inferior a los tumores luminales ($p < 0.01$); con un patrón de recurrencia caracterizado por una tasa significativamente mayor de enfermedad metastásica hepática, cerebral y pulmonar; en comparación con los tumores luminales HER2 negativos, donde la localización metastásica más frecuente era la enfermedad ósea⁹⁹.

Finalmente, también ha sido estudiado el papel de la coexpresión HER2-HER3. En un análisis retrospectivo de 100 tumores se analizó el estatus de HER2 y HER3, su patrón de dimerización y el impacto en supervivencia. Así, tanto la homodimerización de HER2 como la heterodimerización de HER2-HER3, se asociaron con un pronóstico significativamente peor, tanto en términos de SLE ($p = 0.008$ y $p = 0.00016$, respectivamente), como en SG ($p = 0.019$ y 0.001 , respectivamente), demostrándonos el impacto pronóstico de la heterodimerización HER2-HER3 en el cáncer de mama¹⁰⁰.

9.1 HER2 y el carcinoma gástrico o de la UGE.

9.1.1 Expresión y amplificación de HER2.

Los primeros trabajos sobre la amplificación del gen HER2 y su sobreexpresión proteica en carcinomas gástricos, fueron publicados en 1986. Desde entonces, multitud de estudios han confirmado la presencia de amplificación y sobreexpresión de este oncogén, y del receptor que codifica, en el carcinoma gástrico o de la UGE. A continuación, nos centraremos en los principales estudios de IHC e hibridación llevados a cabo en población occidental¹⁰¹.

El estudio GASTROHER, un estudio fase II de un solo brazo en primera línea de carcinoma gástrico avanzado en población española, que, como expondremos más adelante, testó la combinación de trastuzumab y cisplatino, documentó positividad de HER2, definida como la expresión intensa de HER2 (HER2 3+) o la expresión moderada y amplificación acompañante mediante FISH (HER2 2+ amplificado), en 22 de los 228 pacientes sometidos a selección, lo que representaba un 10% del total¹⁰².

Por otra parte, en el estudio TOGA, realizado en población occidental y asiática, 3665 pacientes fueron sometidos a selección, de los cuales 810 pacientes, un 22.1% del total, fueron considerados positivos de acuerdo a unos criterios estandarizados, por presentar HER2 3+ o amplificación del gen mediante FISH^{103,104}.

Además, en diversos análisis retrospectivos de los principales estudios fase III llevados a cabo en población resecable se ha analizado el estatus de HER2. A continuación, nos centraremos en los estudios que incluyeron población occidental.

En el estudio INT 0116, se llevó a cabo un análisis retrospectivo no planificado del estatus de HER2, determinado mediante IHC y FISH en las 258 muestras tumorales disponibles de los 559 pacientes incluidos en el estudio. Se detectó amplificación de HER2 en 28 de los 258 pacientes, lo que representa un 10.9% de positividad¹⁰⁵.

Por otra parte, en el estudio MAGIC, realizado en población europea, donde el análisis retrospectivo de HER2 se realizó mediante técnicas de IHC y BDISH, se objetivó positividad para HER2, definida como IHC3+ o IHC2+ amplificado, en 47 de

los 327 pacientes, un 14.4% del total¹⁰⁶.

Por último, en un metaanálisis, en el que se incluyeron los resultados de 15 estudios realizados mayoritariamente en población asiática y que habían utilizado, en la mayor parte de los mismos, solo técnicas de IHC para la determinación del estatus de HER2; se analizó la frecuencia de positividad de HER2, su asociación con características clinicopatológicas clásicas y su impacto pronóstico. Se objetivó que la mediana de positividad era del 13.2%, con un rango comprendido entre el 3.8 y el 18.8%. Dicha variabilidad podría explicarse por la heterogeneidad de las poblaciones, las distintas técnicas para su determinación y los distintos scores para su evaluación¹⁰⁷.

9.1.2 HER2 y parámetros clinicopatológicos clásicos.

El status de HER2 ha sido asociado con diversos parámetros clinicopatológicos clásicos. Desde los primeros estudios en los que se describía la sobreexpresión/amplificación de HER2 en población occidental, ésta se ha relacionado con el subtipo intestinal de la clasificación de Lauren y la localización proximal. Así, en el estudio GASTROHER, descrito anteriormente, con una positividad para HER2 del 10% de los pacientes, se observó una asociación no significativa con el subtipo histológico intestinal, con un 16% de positividad de los tumores con diferenciación intestinal frente a un 7% en los tumores difusos ($p=0.276$); y una relación significativa con la localización tumoral, con un 25% de positividad en los tumores de la UGE y sólo un 9.5% en los tumores localizados a nivel gástrico ($p=0.01$)^{102,108}.

Estos datos se vieron confirmados más adelante en el estudio TOGA, donde también se relacionó la positividad de HER2 y el subtipo histológico y la localización tumoral. Así, en lo referente al subtipo histológico, el 34% para los tumores intestinales fueron clasificados como HER2 positivos, frente al 6% de los difusos y el 20% de los mixtos. Por otra parte, en relación con la localización tumoral, la positividad fue objetivada en el 32% de los tumores de la UGE frente a sólo el 18% de los tumores gástricos^{104,109}.

Más recientemente, en el metaanálisis descrito con anterioridad, se analizó la relación entre la positividad de HER2 y diversos parámetros clinicopatológicos clásicos. Así, la positividad de HER2 se relacionó con el subtipo Bormann ($p < 0.001$), el mejor grado de diferenciación ($p < 0.001$), el subtipo intestinal de la clasificación de Lauren ($p < 0.001$), la afectación ganglionar ($p = 0.001$) y la invasión linfovascular ($p = 0.01$). Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela debido a diversos motivos como la heterogeneidad de los tumores incluidos, que incluían en algunos estudios carcinomas esofágicos; la distinta metodología para la determinación de HER2, que mayoritariamente se había realizado exclusivamente con técnicas de IHC; y al predominio de población asiática en la muestra¹⁰⁷.

9.1.3 HER2 e impacto pronóstico.

El papel de HER2 como factor pronóstico en el cáncer gástrico o de la UGE continúa siendo controvertido, debido a los resultados discordantes entre el estatus HER2 y la SG en los diferentes trabajos.

En los primeros estudios, realizados en población asiática durante los años 90, se encontraron resultados dispares. Sin embargo, en la mayor parte de los estudios se objetivó una relación significativa entre el estatus de HER2 y un peor pronóstico, determinado fundamentalmente por el tamaño al diagnóstico y la afectación ganglionar¹¹⁰⁻¹¹⁴.

Más recientemente, tras la instauración de una metodología estandarizada para la determinación e interpretación del estatus de HER2, se han realizado diversos estudios retrospectivos en población reseca con el objetivo de determinar el papel pronóstico de HER2 en dicha población. En población asiática, los trabajos realizados han demostrado el impacto pronóstico del estatus de HER2. Por ejemplo, en un estudio de 168 pacientes de procedencia asiática que analizó el estatus de HER2 mediante IHC y DuoCISH, se objetivó relación estadísticamente significativa entre la amplificación de HER2 y una peor SG, con una tasa de supervivencia a 5 años del 21% para amplificados frente al 63% para los no amplificados ($p < 0.05$). Sin embargo, en población occidental, el impacto pronóstico del estatus de HER2 continúa siendo un tema controvertido, debido a los resultados contradictorios de los pocos estudios de los que disponemos. Así, en un estudio en población Finlandesa que analizó la relación entre la amplificación de HER2 mediante CISH y el pronóstico, se observó que la amplificación de HER2 se relacionaba con una tendencia no significativa a una peor supervivencia, con una mediana de 6.6 meses para tumores amplificados frente a 12.7 meses los no amplificados ($p = 0.37$). Sin embargo, en un análisis retrospectivo de 924 pacientes de procedencia alemana e inglesa, en los que HER2 se determinó por técnicas de IHC con diferentes metodologías de interpretación, no se objetivó relación entre el estatus de HER2 y la supervivencia de los pacientes^{98,115,116}.

Finalmente, en el metaanálisis que ya comentamos previamente, realizado en población predominantemente asiática, se analizó el impacto pronóstico de HER2, objetivándose una peor supervivencia en la población HER2 positiva (HR=1.56, IC 95% 1.05–2.07; $p < 0.001$)¹⁰⁷.



10. El estatus de HER3 en el adenocarcinoma gástrico y de la UGE.

Como ya expusimos previamente, el receptor de HER3 es un miembro de la familia HER caracterizado por la ausencia de la actividad tirosina quinasa intrínseca, lo que condiciona que deba heterodimerizarse con otros miembros de la familia HER, especialmente HER2. El dímero HER2-HER3 ha sido descrito como el dímero con mayor actividad catalítica y, en cáncer de mama, ha sido relacionado con una peor SG al igual que los tumores HER2 positivos.

En relación al papel de HER3 en el adenocarcinoma gástrico y de la UGE, debemos resaltar que, a fecha de hoy, carecemos de estudios en población occidental europea, por lo que tenemos que recurrir a los estudios realizados en otras poblaciones, cuyos resultados han sido publicados recientemente¹¹⁷⁻¹²³.

Así, en un metaanálisis en el que se incluyeron 1016 pacientes procedentes de 5 estudios, realizados íntegramente en población asiática, y en los que HER3 se determinó mediante técnicas de IHC. La tasa de positividad para HER3 fue del 35.5%, con un rango que osciló entre el 13.7% y el 62.0% en los distintos estudios. En lo referente a la relación entre HER3 y los parámetros clinicopatológicos clásicos, HER3 se asoció significativamente con la invasión tumoral (OR 0.44 IC95% 0.29-0.67, $p=0.0002$), la afectación ganglionar (OR 0.40 IC95% 0.20-0.77, $p=0.007$), la invasión vascular (OR 0.51 IC95% 0.27-0.6, $p=0.026$) y una tendencia a estadios más avanzados de acuerdo al estadio TNM ($p=0.10$).

En lo referente al impacto pronóstico, HER3 se asoció con un peor pronóstico cuando se analizaron los datos de los 5 estudios conjuntamente (RR=0.70, 95%CI 0.62-0.80, $P<0.00001$). Al analizar los datos individualmente, en cuatro de estos estudios se mantuvo el impacto pronóstico; mientras que en el estudio restante no se observó dicha asociación (RR=0.88, 95%CI 0.64-1.20)¹²².

Finalmente, en un estudio llevado íntegramente a cabo en población brasileña, en el que se testó el impacto del estatus de HER1-HER4 en carcinoma gástrico reseccionado, se analizó el estatus de HER3 mediante técnicas de inmunohistoquímica, determinando la expresión citoplasmática y nuclear, y FISH, para la amplificación génica. La frecuencia de sobreexpresión citoplasmática y nuclear fue del 64% y el 34%, respectivamente. No se objetivó amplificación de HER3. La sobreexpresión se asoció con el subtipo intestinal de Lauren y el mejor grado de diferenciación ($p<0.01$). En lo referente al impacto pronóstico, la sobreexpresión nuclear se asoció con una peor supervivencia ($p=0.035$)¹²³.

1.1. Tratamiento del cáncer gástrico HER2 positivo.

En el ámbito del carcinoma gástrico o de la UGE se ha procedido al desarrollo clínico de varios fármacos con actividad frente a HER2, cuyo mecanismo describiremos a continuación (Figura 14).

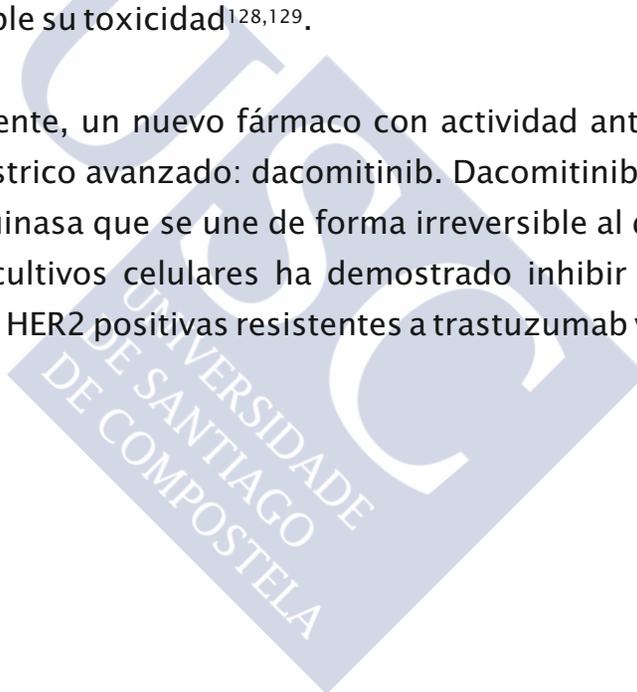
-**Trastuzumab** es un anticuerpo monoclonal que se une al dominio IV del segmento extracelular del receptor HER2. Se han propuesto diversos mecanismos de acción para trastuzumab entre los que se incluyen la inhibición de la internalización de HER2, la inhibición de la vía PI3K-Akt, la atenuación de la señalización celular, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la inhibición de la angiogénesis tumoral¹²⁴.

-**Lapatinib** es un inhibidor tirosina quinasa dirigido contra EGFR y HER2 que induce la detención del ciclo celular G1 en las líneas celulares de cáncer gástrico, probablemente a través de las vías Akt y MAPK¹²⁵.

-**Pertuzumab** es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el dominio de dimerización extracelular (Dominio II) de HER2, por lo que bloquea la heterodimerización de HER2 con EGFR, HER3 y HER4. El sitio de unión del pertuzumab es diferente al del trastuzumab. In vitro, el pertuzumab fue más eficaz que el trastuzumab en el bloqueo de la dimerización de HER2/HER3 y HER1/HER2. Pertuzumab también posee actividad mediando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una manera similar al trastuzumab^{126,127}.

-**Trastuzumab Emtansina** (T-DM1) es un conjugado que incorpora las propiedades antiHER2 de trastuzumab con la actividad citotóxica del agente antimicrotúbulos DM1 (derivado de maitansina), permitiendo la administración de esta última específicamente en las células con sobreexpresión de HER2, mejorando la eficacia y reduciendo de forma notable su toxicidad^{128,129}.

Además, recientemente, un nuevo fármaco con actividad antiHER2 han sido testados en carcinoma gástrico avanzado: dacomitinib. Dacomitinib (PF-00299804) es un inhibidor tirosina quinasa que se une de forma irreversible al dominio ATP de HER1, HER2 y HER4. En cultivos celulares ha demostrado inhibir la actividad de células de cáncer de mama HER2 positivas resistentes a trastuzumab y lapatinib¹³⁰.



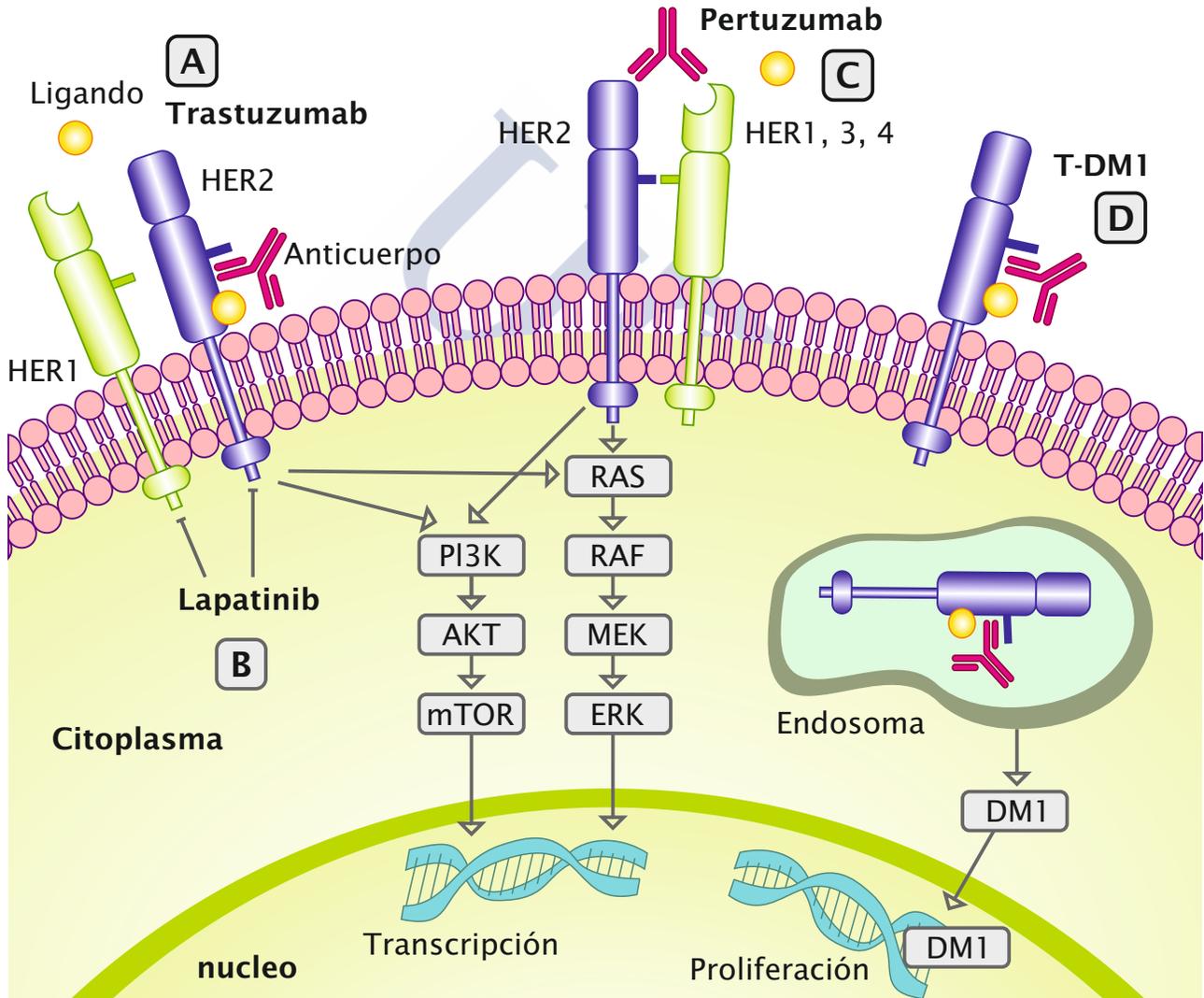


Figura 14. Fármacos con actividad frente al receptor HER2.

11.1 Enfermedad irreseccable o metastásica.

Dada la evidencia previamente descrita sobre el papel de HER2 en la tumorigénesis del carcinoma gástrico y los efectos aditivos antitumorales de trastuzumab en modelos preclínicos, éste fue testado en combinación con cisplatino en el estudio GASTROHER, un estudio fase II de un solo brazo llevado a cabo íntegramente en España. La tasa de respuestas, su objetivo primario, fue del 32% y la tasa de control de enfermedad, del 64%; con una mediana de tiempo a progresión de 5.1 meses. El tratamiento presentó un perfil de toxicidad manejable. En base a estos resultados, sería llevado a cabo el estudio pivotal que supondría una revolución en el tratamiento del adenocarcinoma gástrico: el estudio TOGA^{102,104,131}.

El estudio TOGA, un estudio fase III randomizado multicéntrico, que estudió el beneficio de la adición de trastuzumab a la quimioterapia estándar basada en cisplatino y fluoropirimidinas en carcinoma gástrico o de la UGE localmente avanzado irreseccable o metastásico HER2 positivo (HER3+/FISH+). El objetivo primario del estudio fue la SG. De los 3665 pacientes examinados, 810 presentaban tumores HER2 positivos y, de estos, 594 fueron incluidos finalmente en el estudio. La combinación de trastuzumab y quimioterapia se asoció significativamente con una mayor SG, con una mediana de 13.8 meses para el brazo con trastuzumab frente a 11.1 meses para el brazo de quimioterapia sola ($p=0.0002$). Además, también se relacionó con una mayor SLP: con una mediana de 6.7 vs. 5.5 meses ($p=0.005$); y un aumento significativo de la tasa de respuestas: 47 vs 35% ($p=0.002$). Así mismo, tras

un análisis exploratorio post hoc en función del estado de HER, se objetivó un mayor beneficio de en supervivencia cuando se seleccionaba a los pacientes de acuerdo a los criterios Hoffman (HER2 3+/HER2 2+ FISH amplificado); con una mediana de 16 meses para el brazo de quimioterapia y trastuzumab frente a 11.8 para el brazo de quimioterapia sola ($p=0.036$); mientras que el beneficio se perdía en los pacientes con HER2 0-1+ FISH amplificado: 10 vs 8.7 meses. Además, la adicción de trastuzumab no se asociaba con una mayor tasa de cardiotoxicidad. En base a estos resultados, la combinación de trastuzumab con cisplatino y una fluoropirimidina fue aprobada como tratamiento de primaria línea para carcinoma gástrico o de la UGE avanzado HER2 positivo^{75,103}.

Sin embargo, este beneficio no ha podido ser constatado con otros fármacos con actividad antiHER2. Así, en el estudio LOGIC, un estudio fase III randomizado que estudiaba la combinación de lapatinib y un esquema de quimioterapia basado en oxaliplatino y capecitabina (XELOX) en primera línea de enfermedad metastásica no obtuvo los mismos resultados observados en el TOGA. Así, aunque la combinación de quimioterapia y lapatinib mostró beneficio en SG, su objetivo primario, con una mediana de SG de 12.2 vs 10.5 meses, éste no alcanzó la significación estadística ($p=0.30$); hecho que también se constata en lo referente a la SLP, con una mediana de 6.4 vs 5.4 meses ($p=0.10$). Sin embargo, la adicción de lapatinib si se asoció con un aumento significativo de la tasa de respuestas: 53 vs 39% ($p=0.0031$). Sin embargo, en base a estos resultados, no ha sido posible demostrar el beneficio de la adicción de lapatinib a un régimen de quimioterapia basado en capecitabina y oxaliplatino⁷⁶.

En lo referente a pertuzumab, se encuentra en marcha el estudio JACOB, un estudio fase III randomizado, que pretende analizar el papel de la combinación de pertuzumab y trastuzumab y un esquema de quimioterapia basado en cisplatino y fluoropirimidinas (NCT017747869)¹³².

Pese a los avances en el tratamiento del cáncer gástrico HER2 positivos, todos los pacientes terminarán progresando debido al desarrollo de diversos mecanismos de resistencia como el escape a la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la sobreexpresión de otros miembros de la familia HER como HER1 y HER3, la expresión de otros receptores tirosina quinasa como IGFR1 y MET, la activación de la vía PI3K-Akt-mTOR y la alteración de la apoptosis y el control del ciclo celular. Sin embargo, a fecha de hoy, carecemos de estrategias de tratamiento dirigidas contra dichos mecanismos de resistencia. Existe controversia sobre el esquema de tratamiento óptimo para el adenocarcinoma gástrico o de la UGE HER2 positivo tras la progresión a un régimen basado en platino, fluoropirimidina y trastuzumab. A continuación analizaremos los datos disponibles en dicha población.

En relación a los datos de población HER2 positiva de los dos estudios de registro de ramucirumab, REGARD y RAINBOW, han sido llevado a cabo análisis retrospectivos de la población HER2 positiva. Así, en el estudio REGARD, que comparaba ramucirumab en monoterapia con placebo en pacientes no candidatos a recibir taxanos, se realizó un subanálisis de la población HER2 positiva. Así de los 152 pacientes testados, se objetivó positividad de HER2 en 21 pacientes (14%). En el análisis de la SG y SLP en función del brazo de tratamiento y el estatus de HER2, no se objetivó ausencia de beneficio en la población HER2 positiva. Por otra parte, en lo

referente al estudio RAINBOW, que testó la adición de ramucirumab a un régimen de quimioterapia con paclitaxel, se llevó a cabo un subanálisis retrospectivo de los 39 pacientes tratados previamente con trastuzumab, demostrándose un beneficio en SLP (HR 0.399; IC 95% 0.194-0.822). Así, pese a los escasos datos disponibles en esta subpoblación, no existe evidencia que contraindique la administración de ramucirumab, ya sea en monoterapia o en combinación, en población HER2 positiva^{83,84,133}.

En lo referente a fármacos con actividad frente al receptor HER2, lapatinib y T-DM1 han sido testados en sendos estudios fase III randomizados con resultados francamente decepcionantes. Así, el estudio Tytan, realizado íntegramente en población asiática, exploró la combinación de paclitaxel y lapatinib tras el fallo al tratamiento de primera línea. La adición de lapatinib a paclitaxel no aumentó de forma significativa ni la SG, su objetivo primario, ni la SLP. Sin embargo, lapatinib si se asoció significativamente con una mayor tasa de respuestas: 27 vs. 9% ($p < 0.001$). Además, en un análisis retrospectivo de los pacientes con expresión intensa de HER2 (HER2 3+), lapatinib si se asoció con un beneficio significativo en SG y SLP. Por tanto, aunque se ha observado un beneficio en un subgrupo de pacientes, al no haber alcanzado su objetivo primario, no existe evidencia para la administración de lapatinib y paclitaxel en segunda línea de carcinoma gástrico avanzado. Por otra parte, el estudio Gatsby, llevado a cabo en población occidental, evaluó el papel de T-DM1 frente a docetaxel o paclitaxel en pacientes con carcinoma gástrico HER2 positivo tras progresión a una primera línea. Tras un análisis interino, en el que T-DM1 no demostró beneficio en SG en comparación con el tratamiento con taxanos, con una mediana de 7.6 meses frente a 8.6 meses ($p = 0.86$), el estudio ha

sido cerrado prematuramente. Tampoco se ha objetivado beneficio en SLP ni en tasa de respuestas, por lo que no puede recomendarse el uso de T-DM1 en segunda línea de tratamiento de carcinoma gástrico o de la UGE avanzado¹³⁴.

Por otra parte, en lo referente a nuevas moléculas, un nuevo fármaco con actividad panHER2, dacomitinib, ha sido testado en segunda línea de cáncer gástrico avanzado. Así, en un estudio fase II de un solo brazo de 27 pacientes, 7 de los cuales habían recibido tratamiento antiHER2 previo, dacomitinib alcanzó una tasa de respuestas del 7.4%, su objetivo primario; una tasa de control de enfermedad del 40.7% y una SLP de 2.1 meses¹³⁰.

Por último, en relación al beneficio de continuar trastuzumab en segunda línea, tras la progresión a un régimen de primera línea que contenga trastuzumab, en carcinoma gástrico o de la UGE, a diferencia del carcinoma de mama, carecemos de datos de estudios randomizados que avalen dicha estrategia. Un solo estudio unicéntrico ha analizado de forma retrospectiva el beneficio de trastuzumab tras la progresión, concluyendo que podría considerarse una opción en pacientes seleccionados¹³⁵.

11.2 Enfermedad resecable.

A fecha de hoy, carecemos de estudios randomizados, que testen el papel de la terapia antiHER2 en el tratamiento del carcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica localmente avanzados resecables. En población occidental, los escasos datos de los que disponemos, proceden fundamentalmente de dos pequeños estudios fase II de un solo brazo: el estudio NEOHX y el HER-FLOT^{136,137}.

En el estudio NEOHX, un estudio fase II multicéntrico de un solo brazo de 36 pacientes realizado en España que evaluó la eficacia y toxicidad de 6 ciclos de XELOX-Trastuzumab perioperatorios seguido de 12 ciclos de trastuzumab en monoterapia en pacientes con cáncer gástrico o de la UGE localmente avanzado resecable HER2 positivo (IHC3+ o IHC2+/FISH+); se objetivó una SLE a los 18 y 24 meses del 71 y 60% respectivamente. Además, la tasa de resección R0 fue del 78%, la tasa de respuestas 47.3% y la tasa de respuestas patológicas del 8.3%, con un perfil de toxicidad manejable¹³⁶.

Por otra parte, en el estudio HER-FLOT, un estudio fase II multicéntrico de un solo brazo de 58 pacientes en población alemana que testó la eficacia y toxicidad de 8 ciclos de FLOT-trastuzumab perioperatorios seguido de 8 ciclos de trastuzumab en monoterapia en pacientes con cáncer gástrico o de la UGE localmente avanzado resecable HER2 positivo (IHC3+ o IHC2+/FISH+); se observó una tasa de respuestas completas patológicas, su objetivo principal, del 22% con un perfil de toxicidad manejable¹³⁷.

Actualmente, se encuentran en marcha 2 estudios para testar el papel de la terapia antiHER2 en combinación con la quimioterapia perioperatoria en carcinoma gástrico o de la UGE localmente avanzado: el estudio INNOVATION, un estudio fase II que compara el papel de la combinación de trastuzumab-pertuzumab frente a trastuzumab en combinación con cisplatino-capecitabina (NCT02205047); y el estudio PETRARCA, un fase II/III que testa el papel de trastuzumab-pertuzumab con quimioterapia según esquema FLOT (NCT02581462)^{138,139}.

12. Determinación del estatus de HER2

Diversas metodologías han sido empleadas para determinar el estatus de HER2, entre las que se encuentran las técnicas de Western Blot, ELISA e IHC para valorar la expresión proteica; Northern Blot para el estudio de mRNA y Southern Blot, RT-PCR y técnicas de hibridación in situ como FISH, CISH o DuoCISH para el análisis de la expresión génica del ADN.

Gran cantidad de estudios han sido llevados a cabo para confirmar la presencia de sobreexpresión y/o amplificación de HER2 en carcinoma gástrico o de la UGE; con una amplia gama de resultados, debido a la gran variabilidad en las técnicas utilizadas y los scores utilizados para su evaluación.

Para intentar solucionarlo, en el año 2008, Hoffman y colaboradores, realizaron un análisis exploratorio con el objetivo de establecer un algoritmo diagnóstico para determinación de HER2 en el carcinoma gástrico utilizando técnicas de IHC (Herceptest Dako©) y FISH (HER2 pharm Dx Dako©)¹⁰³.

En lo referente a la evaluación de la IHC, se llevó a cabo una primera evaluación utilizando los criterios definidos para cáncer de mama; poniéndose de manifiesto diferencias muy importantes en los patrones de expresión entre el carcinoma gástrico y el carcinoma de mama: la presencia de tinción de membrana incompleta y heterogeneidad tumoral. Así, por una parte, en el carcinoma gástrico o de la UGE,

debido a las características de las células secretoras gástricas y su mayor agrupación en luces glandulares, es frecuente que la tinción de la membrana celular sea incompleta y se localice fundamentalmente a nivel de la membrana basolateral sin presencia de tinción a nivel luminal. Por otra parte, la presencia de una mayor heterogeneidad intratumoral, hace que muchas veces en los tumores gástricos o de la UGE nos encontremos con zonas de expresión intensa de HER2 pero bajo porcentaje de celularidad. Si en estas dos situaciones aplicásemos los criterios de valoración de cáncer de mama estos casos serían clasificados como negativos (falsos negativos).

Por dichos motivos, plantearon una modificación de los criterios de evaluación de la expresión proteica de HER2 para adaptarlos al carcinoma gástrico o de la UGE y procedieron a la reevaluación de la muestra.

Además, evaluaron la presencia de amplificación génica mediante técnicas de hibridación (FISH), definiendo como amplificados todos los casos en los que el ratio HER2/centrómero cromosoma 17 (CEN-17) fuese mayor o igual a 2.

Posteriormente, se analizó la concordancia entre las técnicas de IHC y FISH, objetivando una concordancia global del 93.5%. Posteriormente, se observó dicha concordancia en función de la expresión de HER2, viéndose que todos los casos con expresión intensa de HER2 (HER2 3+) presentaban amplificación del mismo y sólo 1

de los 121 casos (0.8%) con expresión ausente o débil de HER2 (HER2 0-1+), presentaba amplificación del gen. Sin embargo, el mayor porcentaje de discordancia se objetivaba en los pacientes con expresión moderada de HER2, donde sólo 7 de los 21 pacientes (33.3%) presentaban amplificación del gen.

En base a estos hallazgos, los autores definieron un algoritmo que combinaba técnicas de IHC como primera elección, que clasificaba a los pacientes como negativos si presentaban expresión ausente o débil (0-1+), como positivos si presentaban expresión intensa (3+) y como equívocos si presentaban expresión moderada (2+); reservando en este subgrupo de pacientes la realización de técnicas de hibridación para clasificar a los pacientes en positivos o negativos en función de la amplificación génica (Figura 15).

Posteriormente, en el estudio TOGA, sería aplicada la metodología descrita por Hofmann y cols. para la evaluación de HER2, observándose que un 73.6% de los pacientes presentaban expresión intensa de HER2 (HER2 3+) o expresión moderada y amplificación (HER2 2+ amplificado), definidos como positivos según la clasificación de Hoffman; mientras que un 22.4% restante presentaban expresión ausente o débil (HER2 0-1+) con amplificación acompañante, motivo por el que habían sido incluidos en el estudio. Sin embargo, cuando se analizaron los datos de eficacia para esta subpoblación, no se observó beneficio significativo de la adicción de trastuzumab a

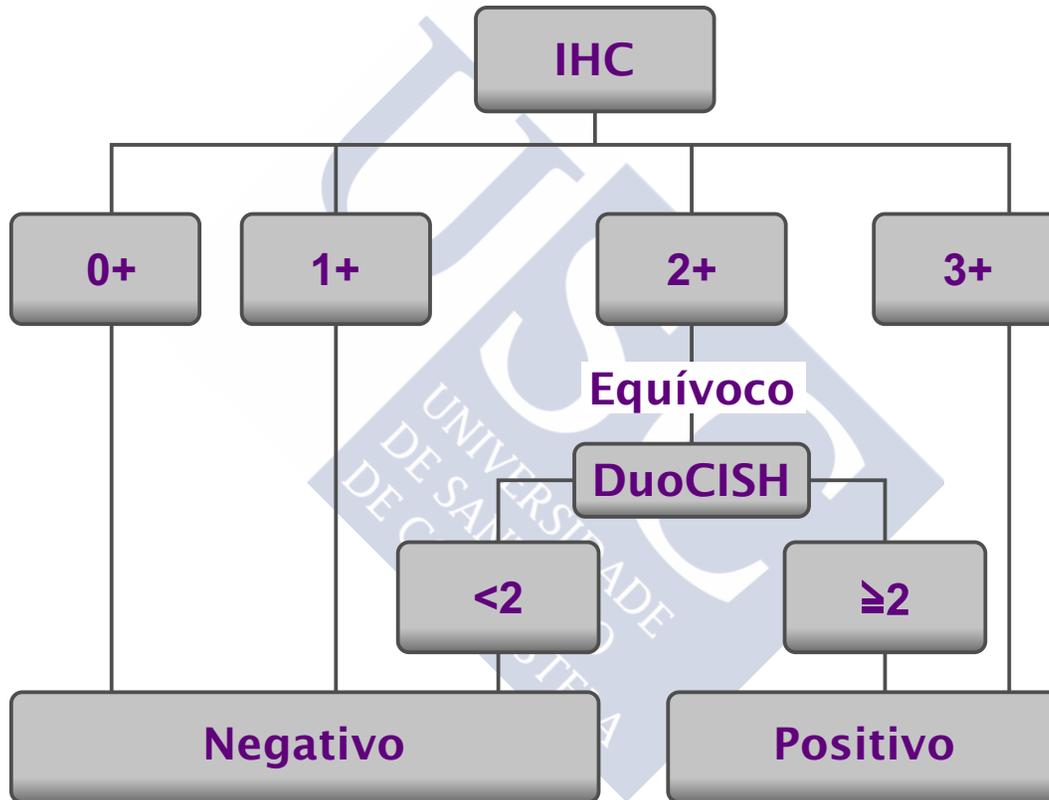


Figura 15. Algoritmo para la determinación de HER2 en carcinoma gástrico. Adaptado de Hofmann et al. Histopathology. 2008 Jun;52(7):797-805.

la quimioterapia de primera línea. Estos resultados dieron validez el algoritmo de Hofmann para la selección de paciente candidatos a tratamiento con trastuzumab^{103,104}.

Más recientemente, ha sido llevado a cabo un estudio de validación del procedimiento para la determinación de HER2 en carcinoma gástrico. Así, han sido analizadas la variabilidad entre las distintas técnicas de IHC y la variabilidad interobservador, tanto por distintos miembros del mismo laboratorio como entre distintos laboratorios. Además en dicho estudio se ha establecido el punto de corte de al menos un 10% de células positivas en muestras quirúrgicas o de 5 células en biopsias endoscópicas¹⁴⁰.

Finalmente, en los últimos años diversas sociedades científicas nacionales como SEAP o SEOM, o internacionales como ASCO han publicado documentos de consenso sobre el procedimiento de determinación y evaluación de HER2 en carcinoma gástrico avanzado o de la UGE. Además, tanto técnicas de IHC como de hibridación in situ (FISH, DuoCISH) han sido validadas por las principales agencias reguladoras, como la FDA o la EMA^{141,142}.

12.1 Técnicas de Inmunohistoquímica (IHC)

Las técnicas de inmunohistoquímica, utilizadas para determinar expresión proteica, presentan una serie de ventajas que las hacen muy atractivas como técnicas de primera elección como el hecho de tratarse de técnicas sencillas, rápidas y relativamente baratas, que pueden llevarse a cabo en la mayoría de los laboratorios de Anatomía Patológica empleando únicamente microscopios de campo claro estándar. Además, las muestras pueden ser almacenadas durante largos periodos de tiempo y ser posteriormente reevaluadas. Sin embargo, también presentan una serie de desventajas como la variabilidad interobservador debido a la subjetividad inherente a la interpretación de una escala semicuantitativa de tinción, y que los resultados pueden alterarse por variaciones en el protocolo de tinción empleado y, sobre todo, por alteraciones en la fase preanalítica relacionadas con problemas de fijación del tejido y con la conservación de las muestras parafinadas por periodos prolongados.

En lo referente a la determinación de HER2, se emplean anticuerpos mono o policlonales contra distintos epítomos de la proteína p185. En la actualidad, uno de los métodos más utilizados es el kit HERCEPTEST™ (Dako, Carpinteria, California USA) que emplea el anticuerpo policlonal A805; y cuyo patrón de tinción de las células tumorales es evaluado conforme a un sistema de interpretación especialmente desarrollado para dicha técnica (Figura 16).

Score	Muestra quirúrgica patrón de tinción	Muestra de biopsia patrón de tinción	Evaluación de HER2
0	Sin reactividad o reactividad membranosa en <10% de las células tumorales	Sin reactividad o reactividad membranosa en <5 células tumorales	Negativa
1+	Reactividad membranosa débil o prácticamente imperceptible en >10% de las células tumorales; las células son reactivas solo en parte de su membrana.	> 5 células tumorales con reactividad membranosa débil o prácticamente imperceptible con independencia del porcentaje de células tumorales teñidas	Negativa
2+	Reactividad membranosa completa basolateral o lateral de débil a moderada en >10% de las células tumorales.	> 5 células tumorales con una reactividad membranosa completa basolateral o lateral de débil a moderada con independencia del porcentaje de células tumorales teñidas	Equivoca
3+	Reactividad membranosa completa basolateral o lateral fuerte en >10% de las células tumorales.	> 5 células tumorales con una reactividad membranosa completa basolateral o lateral fuerte con independencia del porcentaje de células tumorales teñidas	Positiva

Figura 16. Criterios de evaluación de HER2 por IHC en biopsia y muestra quirúrgica. Adaptado de Hofmann et al. Histopathology. 2008 Jun;52(7):797-805.

12.2 Técnicas de Hibridación

12.2.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH)

El FISH es una técnica utilizada para la localización de una secuencia de ADN de un gen o cromosoma en una muestra histológica mediante el anillamiento de una cadena simple de ADN, marcada con fluorescencia, a la secuencia diana complementaria. En el caso de HER2, es un método sensible y específico para identificar el número de copias del gen HER2, en relación con el número de copias de un gen usado como control, el centrómero 17 (CEN-17), en caso de técnicas duales. Existen tres métodos aprobados por las agencias reguladoras internacionales, de ellos el más utilizado en nuestro medio es el HER2 FISH pharmDX kit (Dako, Carpinteria, California USA©).

Además, el análisis del resultado es cuantitativo y se expresa como el número de copias de HER2 en los casos sin control centromérico, y como el ratio HER2/CEN-17 en el caso de técnicas duales.

Entre las ventajas de esta técnica destaca que debido a la mayor estabilidad del ADN respecto a las proteínas, existe menos impacto de los factores preanalíticos en el resultado final. Además la interpretación es más objetiva y existe menor variabilidad interobservador. Sin embargo, también presenta inconvenientes como

la falta de control morfológico directo del área donde se hace la determinación, el coste económico y la pérdida de fluorescencia con el tiempo si no se almacena adecuadamente.

12.2.2 Hibridación cromogénica in situ dual (DuoCISH)

El CISH es una modificación del método FISH para la detección de la amplificación de HER2. Existen dos tipos de CISH: el CISH monocromo o el CISH dual también denominado DuoCISH.

El DuoCISH utiliza dos sondas simultáneamente, una marcada con dioxigenina para la detección de HER2 y otra con biotina para la detección del centrómero del cromosoma 17 (CEN-17). Así, nos permite calcular el ratio de amplificación génica de la misma forma que con el FISH, así como la detección de polisomías del cromosoma 17. El kit Dako DuoCISH™ (Dako, Carpinteria, California USA) es uno de los más utilizados. La interpretación es idéntica a la utilizada en el FISH y se expresa como el ratio HER2/CEN17. Se considera amplificado todo aquel carcinoma gástrico cuyo ratio es mayor o igual a 2.

Diversos estudios han sido llevados a cabo sobre la correlación entre los resultados de FISH y DuoCISH, con concordancias de al menos el 95%. La principal ventaja del CISH es la determinación de la amplificación génica mediante el uso de un microscopio de campo claro permitiendo disminuir el tiempo de determinación y eliminando la necesidad de microscopio de fluorescencia¹⁴³.

13. Determinación del estatus de HER3

En lo referente al estatus de HER3, este miembro de la familia HER ha sido mucho menos estudiado. En los pocos estudios de los que disponemos, llevados a cabo en población asiática, la evaluación se ha realizado mediante técnicas de IHC, evaluando la expresión citoplasmática del receptor y con escalas basadas fundamentalmente en la intensidad (0=ausencia de expresión, 1=expresión débil, 2=expresión moderada y 3=expresión intensa); donde los pacientes con expresión moderada o intensa (2-3+) se han definido como positivos, mientras que los pacientes con expresión ausente o débil, como negativos. Sin embargo, a fecha de hoy, carecemos de documentos de consenso sobre la realización o interpretación de la IHC de HER3¹¹⁷⁻¹²¹.



Hipótesis



La familia HER se ha relacionado con la tumorigénesis del carcinoma gástrico y de la UGE. Así, en enfermedad avanzada, ya sea irresecable o metastásica, la positividad de HER2, definida por la presencia de sobreexpresión y/o amplificación, ha demostrado su papel como factor predictivo de respuesta al tratamiento basado en trastuzumab en combinación con quimioterapia.

Sin embargo, su impacto pronóstico continúa siendo controvertido, ya que, mientras en población asiática la positividad de HER2 o HER3 ha demostrado ser un factor de mal pronóstico en diversos estudios y sendos metaanálisis, en población occidental su papel no ha sido aclarado todavía.

Así, en lo referente a HER2, debido a los escasos datos de los que disponemos y la heterogeneidad de los mismos, con la inclusión simultánea de pacientes resecables y metastásicos; de carcinomas gástricos, de la UGE o incluso esofágicos; con diferentes metodologías para su evaluación e interpretación, que incluyen en algunos casos técnicas de IHC, mientras que en otros se complementan con técnicas de hibridación; han llevado a la obtención de resultados muy dispares y difícilmente comparables. Por otra parte, en lo referente a HER3, carecemos de estudios en dicha población.

Teniendo esto en cuenta, nuestra hipótesis de trabajo es que “el estatus de HER2 y/o HER3 define un subgrupo de pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la UGE resecado en población occidental con características clinicopatológicas diferenciadas, peor pronóstico y distinto patrón de recurrencia”.



Objetivos



Objetivo Principal

1- Analizar si el estatus de HER2 y/o HER3 posee impacto pronóstico en el carcinoma gástrico o de la UGE resecado en población occidental.

Objetivos Secundarios

2- Determinar el estatus de HER2 mediante el análisis semicuantitativo de la expresión proteica con técnicas de IHC y de la amplificación génica mediante DuoCISH.

3- Correlacionar el score de expresión proteica y el ratio de amplificación génica de HER2.

4- Analizar la relación entre el estatus de HER2 y los parámetros clinicopatológicos clásicos.

5- Objetivar si existe relación entre HER2 y el patrón de recurrencia.

6- Establecer el estatus de HER3 mediante el análisis semicuantitativo de la expresión proteica con técnicas de IHC.

7- Observar si existe relación entre el estatus de HER3 y los parámetros clinicopatológicos clásicos.

8- Analizar si existe relación entre HER3 y el patrón de recurrencia.

9- Establecer la relación entre el estatus de HER2 y HER3, así como sus posibles implicaciones.



Material y Métodos

1. Diseño del estudio.

Hemos llevado a cabo un estudio retrospectivo observacional unicéntrico cuyo objetivo fue tratar de determinar el impacto del estatus de HER2 y HER3 en pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la UGE sometidos a cirugía con intención curativa. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo el 17 de marzo de 2015, siendo, además, realizado acorde a los estándares éticos de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado antes de su inclusión en el estudio.

2. Criterios de inclusión y exclusión.

Se seleccionaron pacientes con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma gástrico o de la UGE, sometidos a cirugía con intención radical en el periodo comprendido entre enero 2007 y junio de 2014 en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y cuyas muestras histológicas se encontraban almacenadas en el biobanco de dicho complejo. Se excluyeron a los pacientes con antecedentes de neoplasia en los cinco años previos, con incapacidad para entender los procedimientos del estudio y firmar el consentimiento informado, que hubiesen recibido tratamiento antineoplásico previo a la cirugía, que hubiesen fallecido en el postoperatorio inmediato, definido como los sesenta días tras la cirugía; que careciesen de material histológico o con datos clinicopatológicos o de seguimiento incompletos (Figura 17).

Criterios de inclusión

1. Edad mayor a 18 años.
2. Adenocarcinoma gástrico o de la UGE
3. Cirugía con intención curativa entre Enero 2007 y Junio 2014.
4. Material histológico disponible en el biobanco.

Criterios de exclusión

1. Incapacidad para entender los procedimientos del estudio y firmar el consentimiento informado
2. Neoplasia en los 5 años previos (excepto carcinoma in situ de cérvix o carcinoma de células basales de la piel).
3. Tratamiento antineoplásico previo a la cirugía
4. Éxito en el postoperatorio inmediato (<60 días después de la cirugía).
5. Datos clinicopatológicos o de seguimiento incompletos (al menos 60 meses o hasta éxito).
6. Material histológico insuficiente.

Figura 17. Criterios de inclusión y exclusión.

3. Recogida de datos clínicos

Una vez seleccionados los pacientes candidatos a participar en el estudio y tras la obtención del consentimiento informado, procedimos a la revisión de las historias clínicas para la obtención de los datos clínicos de dichos pacientes y su posterior recogida en el Cuaderno de Recogida de datos (CRD).

Los datos clínicos recogidos en el CRD se describen a continuación:

- a. Fecha de nacimiento.
- b. Sexo del paciente.
- c. Fecha de diagnóstico, definida como la fecha de realización de la cirugía con intención radical.
- d. Tipo de Cirugía, incluyendo el tipo de linfadenectomía realizada de acuerdo a la clasificación del JGCA y subdividiendo a los pacientes en función de si se había realizado una linfadenectomía D0-1 o una D2.
- e. Tratamiento complementario recibido, incluyendo si este se había administrado o no (y el motivo en caso de no haberse administrado); así como el tipo de tratamiento complementario.
- f. Fecha de Recurrencia.
- g. Lugar de recurrencia, clasificando las recurrencias como locales, si se localizaban a nivel de la anastomosis quirúrgica o en el remanente gástrico; regionales, si aparecían en la cavidad peritoneal, incluyendo la cápsula hepática, los ganglios linfáticos o el peritoneo; o a distancia, si aparecían metástasis hepáticas intraparenquimatosas o en otras localizaciones fuera de la cavidad abdominal.
- h. Fecha de éxitus, de pérdida de seguimiento o de última visita.

4. Estudio histológico

Todo el estudio histológico fue llevado a cabo con muestras procedentes de las piezas quirúrgicas de las gastrectomías a las que fueron sometidos nuestros pacientes. Previo a la realización de las técnicas para la determinación del estatus de HER2 y HER3, todas las muestras histológicas disponibles y los informes de anatomía patológica fueron revisados para la obtención de las características anatomopatológicas basales y su posterior recogida en el CRD. En el CRD fueron recogidos datos como la localización del tumor primario, el subtipo histológico de acuerdo a la clasificación de Lauren, el grado de diferenciación (G), la invasión tumoral en profundidad (T), la afectación ganglionar linfática (N), el número de adenopatías resecaadas, el estadiaje siguiendo la clasificación AJCC TNM séptima edición, la invasión linfovascular o perineural y los márgenes de resección.

Posteriormente, previo a la realización de técnicas de IHC e hibridación, se procedió a la selección de los bloques tumorales idóneos para llevar a cabo dichos estudios. Para ello, se evaluaron todas las preparaciones histológicas disponibles, seleccionando muestras representativas de la neoplasia y evitando áreas hipocelulares, con necrosis o hemorragia, escasa calidad tisular, autólisis o artefactos. En el caso de tumores mixtos se seleccionaron áreas con histología de tipo intestinal, pues la probabilidad de observar sobreexpresión de HER2 es mucho mayor que en las áreas de tipo difuso. Una vez elegidas las preparaciones más representativas de cada caso, se seleccionaron sus respectivos bloques y éstos se recogieron en el CRD.

4.1 Determinación de la expresión de la proteína HER2 mediante IHC.

El estudio de la expresión de la proteína HER2 se realizó mediante técnicas de IHC utilizando el kit aprobado por la FDA para la determinación de HER2 en carcinoma gástrico avanzado, Herceptest™ Kit (Dako, Carpinteria, California USA). El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, que brevemente describiremos a continuación.

Se realizan cortes de 3,5 µm de los bloques quirúrgicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina. Dicho tejido se fija a los portaobjetos manteniéndolos en calor (65°C) durante 1 hora. Posteriormente, se procede al desparafinado con pases sucesivos de xilol (4x5´), alcohol 100% (2x3´), alcohol 96° (2x3´) y, finalmente, agua destilada (3´). Una vez desparafinada la muestra, se procede al pretratamiento con el buffer del kit, 40 minutos a 97°C en el equipo Dako PTLINK. Tras ello, se enfría durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, y tras lavar las muestras, se tratan con peroxidasa durante 5 minutos y, tras lavar nuevamente la muestra, se aplica el anticuerpo primario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lava y se aplica el anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lava y se aplica diaminobencidina durante 10 minutos; para luego teñir con hematoxilina durante 7 minutos, deshidratar en pases sucesivos de buffer, alcoholes de graduación creciente, xilol y, finalmente, se montan para su interpretación.

Tras la realización del procedimiento, todas las secciones fueron evaluadas por dos observadores de forma independiente. En los casos discordantes se realizó un acuerdo interobservadores para el análisis estadístico final.

Para la interpretación de los resultados se siguieron las recomendaciones de las principales guías de consenso y dichas preparaciones fueron evaluadas acorde a la metodología de Rüschoff/Hoffman para muestra quirúrgica (Figura 18).

Puntuación	Descripción	Resultado
0	Ausencia de tinción o tinción en menos del 10% de las células	Negativo
1	Tinción de membrana, al menos lateral, casi imperceptible, en al menos el 10% de las células	Negativo
2	Tinción de membrana, al menos lateral, moderada, en al menos el 10% de las células	Equivoco
3	Tinción de membrana, al menos lateral, intensa, en al menos el 10% de las células	Positivo

Figura 18. Metodología de Rüschoff/Hoffman para la determinación de la expresión de HER2 por IHC en muestra quirúrgica del adenocarcinoma gástrico o de la UGE.
Adaptado de Hofmann et al. Histopathology. 2008 Jun;52(7):797-805.

4.2 Determinación de la amplificación del gen HER2 mediante DuoCISH

Una vez analizada la expresión proteica de HER2, procedimos al estudio de la amplificación de HER2, usando la técnica de DuoCISH para la cual se utilizaron los kits HER2 FISH pharmDx™ y DuoCISH™ (Dako, Carpinteria, California USA). Este procedimiento fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras la hibridación de las secuencias diana con las sondas para la detección del gen HER2 y del CEN-17 se procedió con la técnica de IHC para la detección de los fluorocromos (FITC, TR). La detección del FITC se realizó mediante un anticuerpo anti-FITC marcado con peroxidasa, mientras que la detección de TR se realizó con un anticuerpo anti-TR marcado con fosfatasa alcalina. La tinción específica en el lugar de hibridación se realizó mediante el empleo de dos cromógenos consecutivos: tinción de HER2/anti-FITC-P con Fast Red y tinción del complejo CEN-17/anti-TR-AP con Indolium. Finalmente, se realizó una contratinción de hematoxilina y montaje en medio permanente que no contiene etanol ni xilol.

La cuantificación se realizó en un microscopio óptico de campo claro, empleando un objetivo de 60x en seco, excepto en los casos con alta amplificación, en los que se usó un objetivo de 100x en inmersión.

A pesar de que en la bibliografía principal existe un consenso de que los pacientes con expresión positiva (3+) o negativa (0-1+) no requieren estudios adicionales con técnicas de hibridación complementarias, en este trabajo se ha llevado a cabo en todos los casos con el objetivo de estudiar si existía relación entre la intensidad de la expresión y la amplificación de HER2, así como entre la intensidad

de amplificación y el pronóstico de los pacientes. Debemos considerar que si bien, a fecha de la finalización de esta tesis, la técnica aprobada por la FDA para la determinación de la amplificación de HER2 en carcinoma gástrico avanzado es el FISH, nosotros seleccionamos DuoCISH por las diversas ventajas que presenta frente al FISH ya que puede ser realizada de forma automatizada, no requiere microscopios de fluorescencia para su interpretación y permite identificar con mayor facilidad los núcleos celulares del tejido normal.

Para la interpretación de la técnica DuoCISH se seleccionaron áreas de carcinoma invasivo identificadas en las tinciones de hematoxilina-eosina, que se correspondiesen con las áreas mayor expresión de HER2 en la IHC realizada previamente y con citomorfología de malignidad para ayudar a seleccionar células idóneas. Una vez seleccionadas los campos, se procedió a la cuantificación de las señales de HER2 y CEN-17 acorde a las directrices del fabricante. Para ello se seleccionaron 20 núcleos, se cuantificaron las señales de HER2 y CEN-17 y se calculó el ratio entre ambas señales. Los pacientes cuyo ratio HER2/CEN-17 fue inferior a dos fueron considerados negativos o no amplificados, mientras que los pacientes cuyo ratio fue igual o superior a dos fueron considerados positivos o amplificados.

4.3 Determinación de la expresión de la proteína HER3 mediante IHC.

El status de HER3 fue determinado mediante el estudio de la expresión proteica utilizando técnicas de IHC. Para ello, se utilizó el anticuerpo HER3 clon DAK-H3-ICHER3 (Dako, Carpinteria, California USA), con capacidad de unión a la porción intracelular de HER3. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del

fabricante. Brevemente: se usaron cortes de 3,5 μm de tejido embebido en parafina. El tejido fue fijado al portaobjetos manteniéndolo en calor (65°C) durante 1 hora, tras lo cual se procedió a la desparafinización con pases sucesivos en xilol y alcoholes de graduación decreciente, al igual que en el protocolo aplicado para la IHC de HER2. Seguidamente, se realizó un pretratamiento con un buffer de pH 9 durante 20 minutos en el equipo Dako PTLINK.

Tras el enfriado a temperatura ambiente y los lavados correspondientes, se bloquea con peroxidasa durante 5 minutos y, tras un nuevo lavado, se aplica el anticuerpo primario durante 30 minutos a temperatura ambiente a una dilución 1:50. Tras los lavados posteriores, se aplica el anticuerpo secundario durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, y tras lavar, se aplica diaminobencidina durante 10 minutos. Finalizaremos con hematoxilina durante 15 minutos, tras la cual se rehidrata y se monta, siguiendo los pasos indicados para HER2.

Todas las secciones fueron evaluadas por dos observadores de forma independiente. En los casos discordantes se realizó un acuerdo interobservadores para el análisis estadístico final. La expresión de HER3 fue evaluada a nivel citoplasmático de acuerdo con la clasificación que exponemos a continuación (Figura 19).

Puntuación	Descripción	Resultado
0	Ausencia de tinción o tinción en menos del 10% del citoplasma las células	Negativo
1	Tinción citoplasmática, casi imperceptible, en al menos el 10% de las células	Negativo
2	Tinción citoplasmática, moderada, en al menos el 10% de las células	Positivo
3	Tinción citoplasmática, intensa, en al menos el 10% de las células	Positivo

Figura 19. Metodología para la interpretación de la expresión de HER3 por IHC.

5. Aspectos estadísticos.

5.1 Cálculo del tamaño muestral.

Para el cálculo del tamaño muestral hemos asumido un error tipo I del 5%, un nivel de significación del 95%, un poder estadístico del 80%, una proporción de pacientes positivos del 20% y una diferencia en la supervivencia a 3 años del 30%, que se considera clínicamente significativa. Con todo ello, el tamaño muestral resultante es de 97 pacientes. Además, si asumimos un porcentaje de pérdidas de 5%, el tamaño muestral total será de 100 pacientes.

5.2 Análisis estadístico.

Los datos recogidos, tanto variables clínicas como anatomopatológicas procedentes del CRD, fueron volcados en una tabla Excel (MS Excel, Microsoft Office 2007, Microcomputer Software, Redmond, Washington, USA).

El análisis estadístico se realizó usando el software estadístico SPSS 19.0. En primer lugar, se efectuó un análisis descriptivo de las diferentes variables cualitativas y cuantitativas objeto del estudio. Se procedió al análisis de frecuencias o porcentajes de las variables cualitativas y a la determinación de media y desviación estándar, mediana y rango de las variables cuantitativas. La comparación de grupos independientes, respecto a las variables cuantitativas, se realizó mediante la aplicación del test t de Student (comparación de dos grupos), o Anova (comparación de más de dos grupos) cuando la variable seguía una distribución normal. En aquellos casos en que la variable no siguiese una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico Wicoxon-Mann-Whitney (para la comparación de dos grupos) o el test no paramétrico Kruskall-Wallis (comparación de más de dos grupos). Las comparaciones de las variables categóricas se analizaron utilizando la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher en función del tamaño de la muestra de subgrupos.

En lo referente a los datos de supervivencia, en primer lugar definimos los conceptos de SG y SG específica. Así, se denominó la SG como el intervalo entre la fecha de la cirugía hasta la fecha de la muerte por cualquier causa o la pérdida

seguimiento. En lo referente a la SG específica por carcinoma gástrico, esta se determinó como el intervalo desde la fecha de la cirugía a la fecha de muerte por dicha patología, siendo censurados los pacientes fallecidos por otras causas.

Para el análisis de la SG y la SG específica se realizó aplicando en primer lugar un modelo de Kaplan-Meier, estimando la mediana y el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias en las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el test de Log-Rank. Para todos los análisis realizados se estableció un riesgo bilateral, o nivel de significación $p=0.05$.



Resultados



1. Características de la población.

En nuestro estudio se incluyeron 106 pacientes, 68 de los cuales eran hombres (64.2%) y 38, mujeres (35.8%); con un ratio 2:1. La mediana de edad de dicha población fue de 69 años, con un rango comprendido entre 38 y 81 años. En lo referente a la localización tumoral, que clasificaba como proximales a los tumores localizados en la UGE, el fundus o el cuerpo gástrico, y como distales a los localizados en el antro o píloro; 35 pacientes (33%) presentaban tumores de localización proximal, 11 de los cuales (10.4%) se encontraban a nivel de la UGE; mientras que 70 (66%), presentaban tumores distales y solamente un paciente tenía afectación de todo el estómago. Todos ellos fueron sometidos a intervención quirúrgica con intención curativa.

En relación a la histología, y siguiendo la clasificación de Lauren, 77 pacientes (72.6%) fueron clasificados como intestinales y 25 (23.6%) como difusos y los 4 pacientes restantes (3.8%), debido a que presentaban áreas concurrentes de ambos subtipos, fueron clasificados como mixtos. Cuando se analizó el grado de diferenciación, 17 pacientes (16%) presentaban tumores bien diferenciados, 47 (44.3%), moderadamente diferenciados, 39 (36.8%), pobremente diferenciados y 3 pacientes (2.8%), tumores indiferenciados.

La mediana de ganglios extraídos fue de 24, con un rango entre 3 y 65. Cuando dividimos a los pacientes en función de si se ha realizado una linfadenectomía correcta, definida con la resección de al menos 15 adenopatías, ésta se llevó a cabo

en 88 pacientes (83%). En lo referente a la extensión de la linfadenectomía, una linfadenectomía D2 se realizó en 62 pacientes (58.5%) mientras que una D0-D1, fue realizada en 44 (41.5%).

Durante el estudio anatomopatológico, se catalogaron las muestras en base a la clasificación TNM AJCC 7ª edición. En lo referente a la infiltración tumoral en profundidad (T), 15 pacientes (14.2%) fueron clasificados como T1, 28 (26.4%) como T2; 56 (52.4%) como T3 y 7 (6.6%) como T4, por infiltración de estructuras adyacentes. En relación a la afectación ganglionar, 48 pacientes (45.3%) no presentaron afectación ganglionar. De los 58 pacientes con ganglios afectados, 22 pacientes (20.8%) presentaban de 1 a 2 adenopatías afectas, por lo que fueron clasificados como N1; 18 pacientes (17%) presentaban de 3 a 6 adenopatías afectas y fueron clasificados como N2, y 18 pacientes (17%) presentaban más de 7 adenopatías afectas y fueron definidos como N3. Cuando se analizó la infiltración linfovascular y/o perineural, se observó su presencia en 58 (54.7%) y 54 (50.4%) pacientes, respectivamente.

Tras el tratamiento quirúrgico los pacientes fueron valorados para la administración de tratamiento adyuvante. De los 106 pacientes sometidos a resección radical, 60 (56.6%) pacientes recibieron tratamiento complementario con radioquimioterapia. Los 46 pacientes restantes no recibieron tratamiento adyuvante debido a diversos motivos: 25 pacientes (23.6%), por tratarse de estadíos iniciales (T1-2N0) y los 21 restantes (19.8%), por las características del paciente como la edad avanzada, el estado general y/o la presencia de comorbilidades (Figura 20).

Características	Total (%)
Edad	
Mediana	69
Rango	38- 81
Sexo	
Hombre	68 (64.2)
Mujer	38 (35.8)
Localización	
Proximal	35 (33.0)
Distal	70 (66.0)
NA	1 (1.0)
Subtipo Histológico	
Intestinal	77 (72.6)
Difuso	25 (23.6)
Mixto	4 (3.8)
Grado Diferenciación (G)	
Bien diferenciado (G1)	17 (16.0)
Moderadamente diferenciado (G2)	47 (44.3)
Pobrementemente diferenciado (G3)	39 (36.8)
Indiferenciado (G4)	3 (2.8)
Linfadenectomía	
D 0-1	44 (41.5)
D 2	62 (58.5)
Adenopatías Resecadas	
< 15	18 (17.0)
≥ 15	88 (83.0)

Invasión Tumoral (T)	
T1	15 (14.2)
T2	28 (26.4)
T3	56 (52.8)
T4	7 (6.6)
Afectación ganglionar (N)	
N0	48 (45.3)
N1	22 (20.8)
N2	18 (17.0)
N3	18 (17.0)
Estadio	
IA	10 (9.4)
IB	24 (22.6)
IIA	20 (18.9)
IIB	17 (16.0)
IIIA	19 (17.9)
IIIB	14 (13.2)
IIIC	2 (1.9)
Invasión Vascular	
Si	58 (54.7)
No	48 (45.3)
Invasión Perineural	
Si	54 (50.9)
No	52 (49.1)
Radioquimioterapia Adyuvante	
Si	60 (56.6)
No	44 (43.4)

Figura 20. Características de la población.

2. Estatus de HER2.

2.1 Expresión proteica y amplificación génica.

En primer lugar, procedimos al análisis de la expresión de HER2 mediante técnicas de IHC. Así, de los 106 pacientes incluidos en el estudio, en 60 (56.6%) no se apreció expresión de HER2, por lo que se evaluaron como SCORE 0 o 0+; en 16 pacientes (15.1%) observamos expresión débil y fueron clasificados como SCORE 1 o 1+; en 23 (21.7%), expresión moderada y se interpretaron como SCORE 2 o 2+ y en los 7 pacientes restantes (6.6%) la expresión fue intensa, siendo clasificados como SCORE 3 o 3+.

Tras la evaluación de la intensidad de la expresión de HER2 los resultados fueron clasificados en 3 categorías. Así, 76 tumores con expresión 0-1+ fueron etiquetados como negativos, 7 con expresión 3+ fueron clasificados como positivos y los 23 restantes, con SCORE 2, se catalogaron como equívocos.

Posteriormente, procedimos al análisis de la amplificación de HER2 mediante DuoCISH. Así, de los 7 pacientes con expresión intensa de HER2, HER2 3+ o positivos, todos presentaron amplificación génica. Por el contrario, en ninguno de los 76 pacientes con ausencia de expresión o expresión débil de HER2, HER2 0-1+ o negativos, se observó amplificación de HER2. En lo referente a los 23 pacientes con expresión moderada, 2+ o equívocos, encontramos el mayor grado de discrepancia,

ya que sólo 7 pacientes (30.4%) presentaron amplificación de HER2 mientras que los 16 pacientes restantes (69.6%) no tuvieron amplificación del mismo. De manera global, 14 pacientes fueron clasificados como HER2 positivos (13.2%), mientras que los 92 restantes (86.8%), se designaron como HER2 negativos. Al analizar la relación entre los resultados de expresión proteica mediante IHC y amplificación génica mediante DuoCISH, se objetivó una relación significativa entre ambas técnicas ($p < 0.001$) (Figura 21 y 22).

IHC	DuoCISH (Ratio HER2/CEN-17)		Total
	<2	≥2	
0-1+	76	0	76
2+	16	7	23
3+	0	7	7
Total	92	14	106

Figura 21. Relación entre la intensidad de expresión proteica y la amplificación génica de HER2. Análisis combinado de los resultados de IHC y DuoCISH.

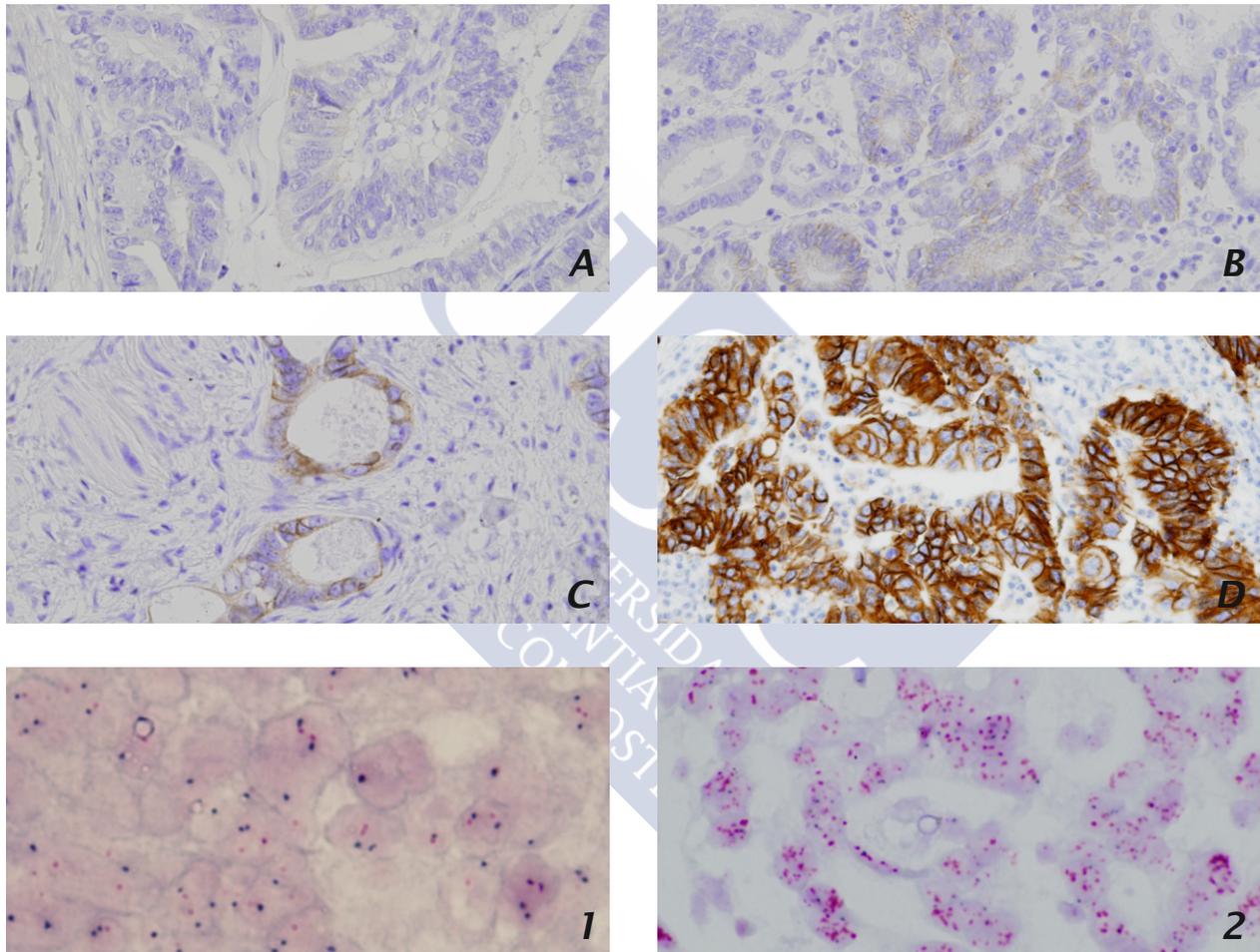


Figura 22. Expresión y amplificación de HER2. A-D Técnicas de IHC (40x).

A. Ausencia de expresión (SCORE 0 o 0+). B. Expresión débil (SCORE 1 o 1+).
C. Expresión moderada (SCORE 2 o 2+). D. Expresión intensa (SCORE 3 o 3+).

1-2. Amplificación de HER2 mediante DuoCISH.

1. DuoCISH no amplificado. 2. DuoCISH amplificado.

Tras el estudio del estatus de HER2, de acuerdo a las distintas técnicas de determinación, procedimos a analizar la mediana de los ratios de amplificación de HER2 en función de la intensidad de expresión proteica con el objetivo de determinar si existía relación entre el número de copias del gen y la expresión proteica observada. Así, en los 7 pacientes con expresión intensa de HER2 la mediana del ratio de amplificación, determinada por el cociente HER2/CEN-17, fue de 8.1 (rango 5.4-13.3). En contraposición, en los 76 pacientes negativos, con expresión ausente o débil, el ratio de amplificación fue de 1.1 (0.9-1.6), sin que existiesen diferencias entre los pacientes con expresión ausente y en aquellos con expresión débil. En lo referente a los 23 pacientes con expresión moderada o equívocos, en este grupo existe una gran heterogeneidad en los resultados, con un ratio de 1.3 (0.9-6.1). Por dicho motivo, procedimos al subanálisis de los pacientes con expresión moderada en función de si los pacientes presentaban o no amplificación de HER2; objetivando que en los 7 pacientes amplificados la mediana era de 4.2 (2.3-6.1), mientras que en los 16 no amplificados, ésta era de 1.1 (0.9-1.6). Por último, clasificamos a los pacientes en función del estatus de HER2 en positivos o negativos, obteniendo un ratio de 1.1 (0.8-1.6) en los 92 pacientes HER2 negativos, sin diferencias entre los distintos subgrupos; mientras que en los 14 pacientes HER2 positivos, la mediana era de 5.2 y un rango comprendido entre 2.3 y 13.3, observándose diferencias entre los pacientes con expresión moderada y aquellos con expresión intensa, observándose un ratio de 8.1 (5.4-13.3) para los pacientes con expresión intensa frente a 4.2 (2.3-6.1) para los con expresión moderada amplificados, como ya describimos con anterioridad (Figura 23).

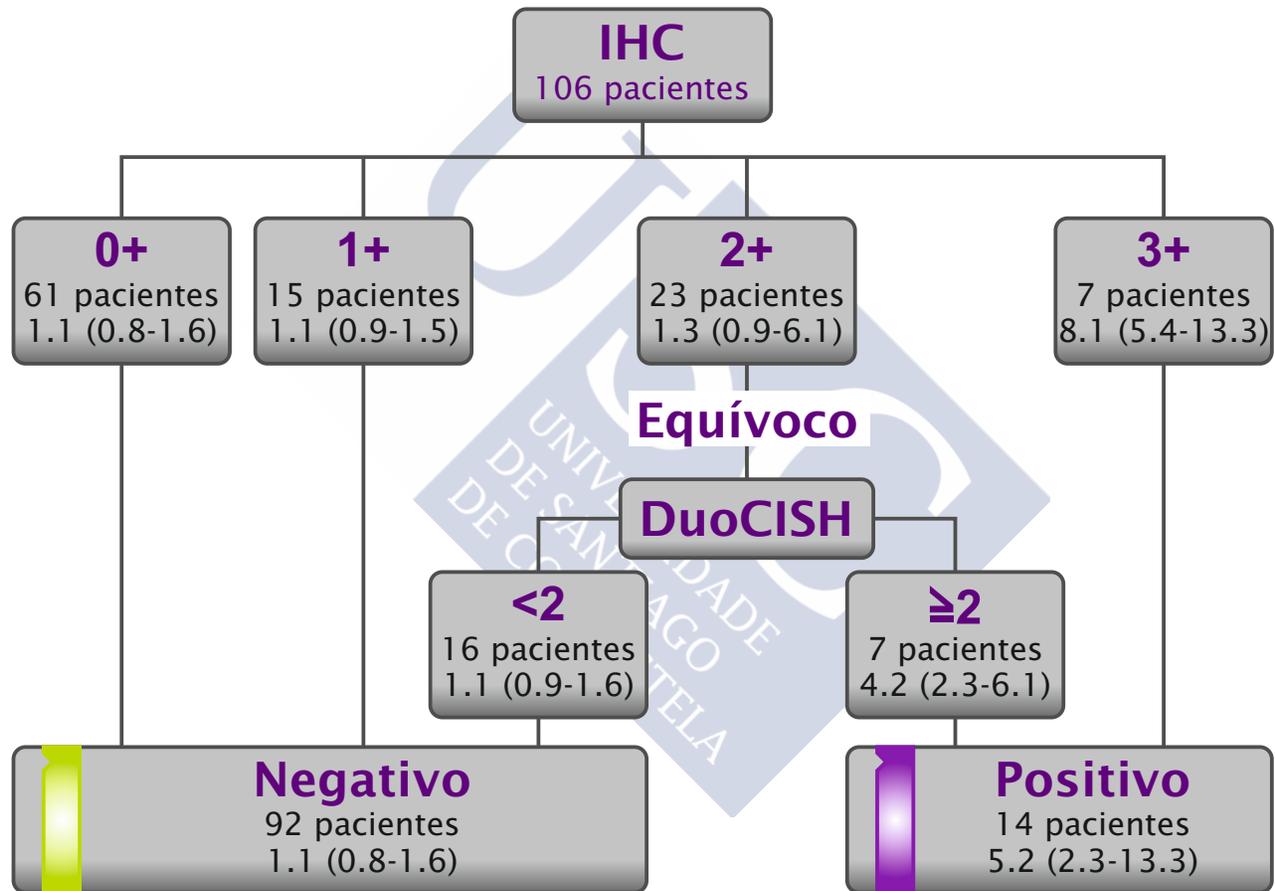


Figura 23. Clasificación de los pacientes en función de la expresión proteica y la amplificación génica de HER2.

2.2 Asociación con parámetros clinicopatológicos clásicos.

Tras el análisis de las características de la población seleccionada, de las frecuencias de expresión y amplificación de HER2, así como de la relación entre ambas técnicas de determinación del mismo, procedimos al análisis entre el estatus de HER2 y los parámetros clinicopatológicos clásicos con el objetivo de determinar si el estatus de HER2 definía un subgrupo de pacientes con características diferenciadas.

En primer lugar, detectamos una relación significativa entre la positividad de HER2 y el subtipo intestinal de la clasificación de Lauren ($p=0.010$), observándose que el 100% de los pacientes HER2 positivos pertenecían al subtipo intestinal frente al 68.5% de los HER2 negativos.

Además, HER2 también se asoció con mejor grado de diferenciación ($p=0.008$). Así, mientras el 92.9% de los pacientes HER2 positivos presentaban tumores bien-moderadamente diferenciados, solo el 55.4% de los pacientes HER2 negativos presentaban dicha diferenciación.

Así mismo, en lo referente a la invasión tumoral en profundidad de la pared gástrica, definida como T en la clasificación TNM, se observó una relación significativa entre la positividad de HER2 y una menor invasión en profundidad ($p=0.018$). Así, mientras que el 71.4% de los tumores HER2 positivos presentaban

invasión limitada a la muscular propia, definidos como T1-2; solo el 35.9% de los pacientes HER2 negativos presentaban tumores T1-2. Estos resultados podrían sugerirnos que HER2 se relacionaba con estadios más iniciales. Sin embargo, cuando procedimos al análisis de la afectación ganglionar, observamos una tendencia no significativa a una mayor afectación ganglionar en la población HER2 positiva con un 64.3% frente a un 53.3% para los tumores HER2 negativos ($p=0.568$).

Por dicho motivo, procedimos a un subanálisis de la relación entre la invasión tumoral en profundidad (T) y la afectación ganglionar (N) en función del estatus de HER2.

Así, cuando analizamos la relación entre el T y el N en los tumores HER2 negativos, nos encontramos que ninguno de los pacientes con enfermedad limitada a la muscular propia presentaba afectación ganglionar, apareciendo ésta en los pacientes con enfermedad localmente avanzada, definida como T3-4. Además, en lo referente a los 6 tumores con afectación de órganos vecinos, definidos como T4, 4 no presentaban afectación ganglionar. Sin embargo, en los tumores HER2 positivos observamos que 7 de los 10 pacientes con tumores T1-2 presentaban afectación ganglionar y, de estos, 3 presentaban al menos 7 adenopatías afectas. En contraposición, solo 1 paciente presentaba un tumor T4, con afectación ganglionar (Figura 24).

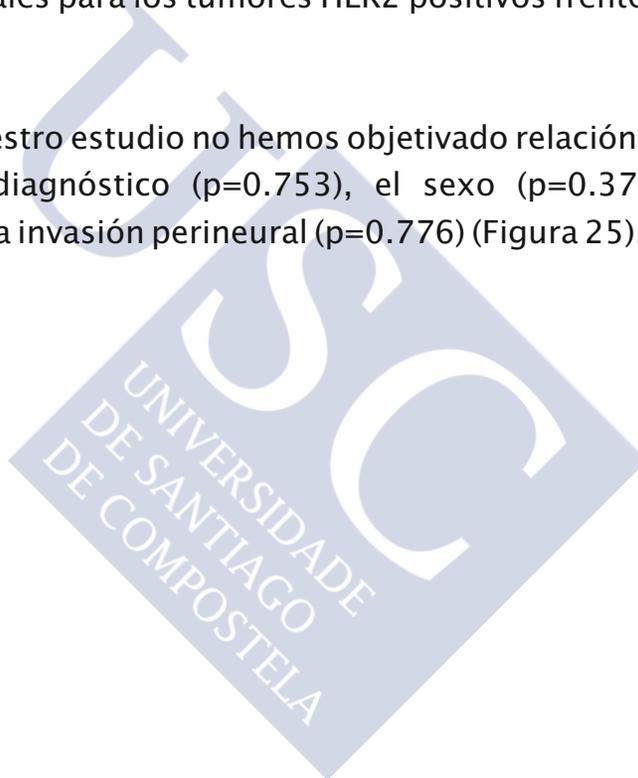
A	T1	T2	T3	T4	Total
N0	8	19	12	4	43
N1	3	3	12	0	18
N2	0	0	17	0	17
N3	0	0	12	2	14
Total	11	22	53	6	92

B	T1	T2	T3	T4	Total
N0	2	1	2	0	5
N1	1	3	0	0	4
N2	0	0	0	1	1
N3	1	2	1	0	4
Total	4	6	3	1	14

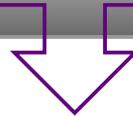
Figura 24. Relación entre la invasión tumoral en profundidad (T) y la afectación ganglionar (N) en función del estatus de HER2.
 A. Tumores HER2 negativos. B. Tumores HER2 positivos.

En lo referente a la localización tumoral, observamos una asociación no significativa entre la localización proximal y la positividad de HER2 ($p=0.074$), con un 42.9% de tumores proximales para los tumores HER2 positivos frente al 31.5% de los HER2 negativos.

Sin embargo, en nuestro estudio no hemos objetivado relación entre el estatus de HER2 y la edad al diagnóstico ($p=0.753$), el sexo ($p=0.370$), la invasión linfovascular ($p=0.539$) o la invasión perineural ($p=0.776$) (Figura 25).



Características	Total 106 (%)	HER2 negativo 92 (86.7%)	HER2 positivo 14 (13.2%)	P
Edad				
≥65 años	75 (70.8)	64 (69.6)	11 (78.6)	0.490
<65 años	31 (29.2)	28 (30.4)	3 (21.4)	
Sexo				
Hombre	68 (64.2)	57 (62.0)	11 (78.6)	0.227
Mujer	38 (35.8)	35 (38.0)	3 (21.4)	
Localización				
Proximal	35 (33.0)	29 (31.5)	6 (42.9)	0.074
Distal	70 (66.0)	63 (68.5)	7 (50.0)	
NA	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (7.1)	
Subtipo Histológico				
Intestinal	77 (72.6)	63 (68.5)	14 (100)	0.010
No intestinal	29 (27.4)	29 (31.5)	0 (0.0)	
Grado Diferenciación				
G1-G2	64 (60.4)	51 (55.4)	13 (92.9)	0.008
G3-G4	42 (39.6)	41 (44.6)	1 (7.1)	



Invasión Tumoral				
T1-T2	43 (40.6)	33 (35.9)	10 (71.4)	0.018
T3-T4	63 (59.4)	59 (64.1)	4 (28.6)	
Afectación Ganglionar				
No	48 (45.3)	43 (46.7)	5 (35.7)	0.568
Si	58 (54.7)	49 (53.3)	9 (64.3)	
Invasión Vascular				
No	48 (45.3)	42 (45.7)	6 (42.9)	0.539
Si	58 (54.7)	50 (54.3)	8 (57.1)	
Invasión Perineural				
No	52 (49.1)	46 (50.0)	6 (42.9)	0.776
Si	54 (50.9)	46 (50.0)	8 (57.1)	
Tratamiento Adyuvante				
No	46 (43.4)	38 (41.3)	8 (57.1)	0.141
Si	60 (56.6)	54 (58.7)	6 (42.9)	

Figura 25. HER2 y su asociación con los parámetros clinicopatológicos clásicos.

2.3 Relación entre el estatus de HER2 y la supervivencia.

Una vez estudiada la relación entre el estatus de HER2 y diversos parámetros clinicopatológicos, procedimos a analizar el impacto pronóstico de HER2.

En primer lugar observamos que, con una mediana de seguimiento de 54 meses, la mediana de SG en población no seleccionada era de 93.9 meses.

Posteriormente, procedimos al análisis de la SG en función del estatus de HER2, de acuerdo a la metodología utilizada en nuestro estudio. Así, en primer lugar analizamos la SG en función de la expresión de HER2, que clasificaba a los pacientes en positivos, negativos y equívocos; objetivándose una tendencia no significativa a una peor SG, con una mediana de SG de 25.9 meses para los tumores positivos frente a 93.9 meses para los negativos y no alcanzándose la mediana de SG en los equívocos ($p=0.102$); tendencia que se mantenía en el análisis de la SG específica por carcinoma gástrico ($p=0.194$).

Tras esto, analizamos la SG en función del estatus de HER2, en base a los resultados combinados de IHC y DuoCISH de acuerdo a nuestro algoritmo de determinación, mostrándose una mediana de SG de 32.3 meses para la población HER2 positiva frente a 93.9 meses para los HER2 negativos (HR 0.42; IC 95% 0.18 - 0.93 Log Rank $p=0.028$); objetivándose así una asociación significativa entre la positividad de HER2 y una peor supervivencia, que se confirmaba en el análisis de la SG específica por carcinoma gástrico (HR 0.37; IC 95% 0.14-0.93 Log Rank $p=0.029$) (Figura 26).

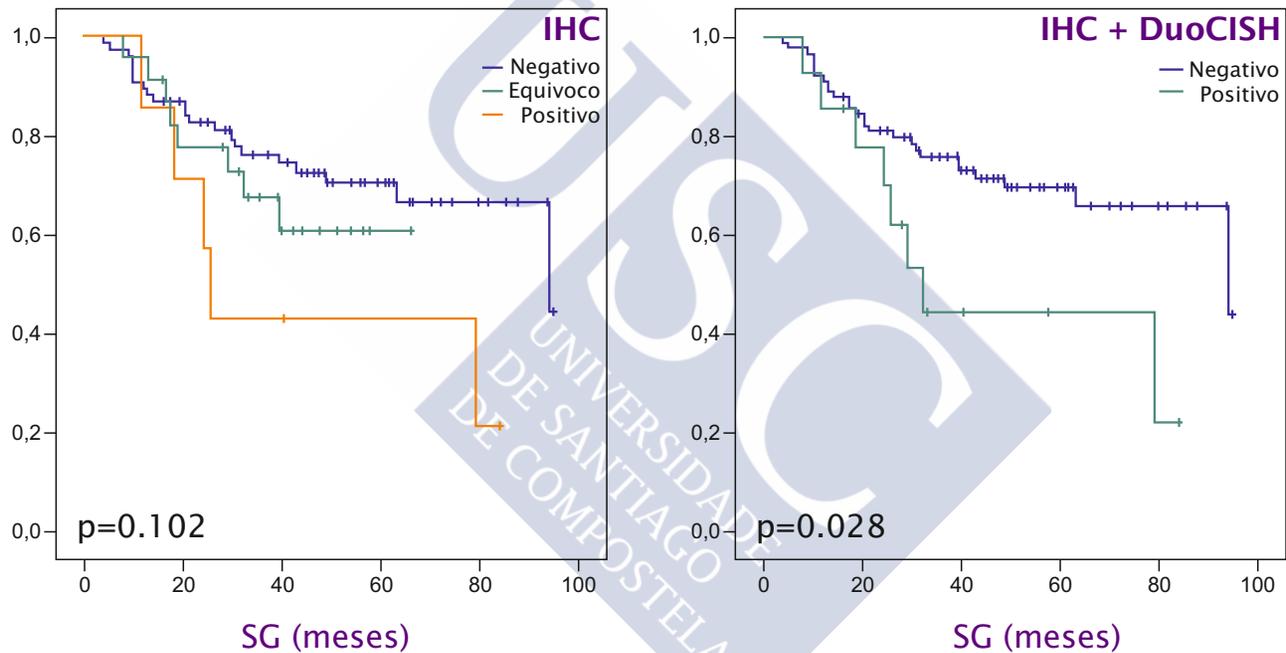


Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier de SG para estimar el impacto pronóstico del estatus de HER2.

A. Impacto pronóstico en función de la expresión de HER2.

B. Impacto pronóstico en función de la expresión y amplificación de HER2.

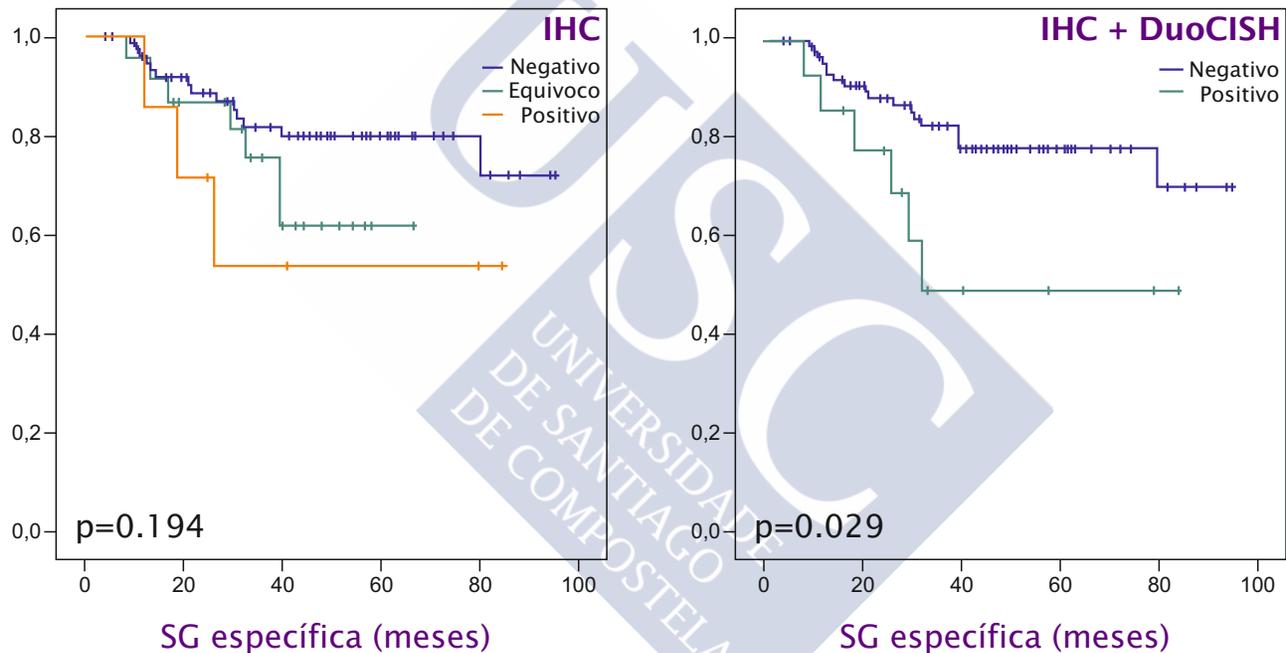


Figura 26 (cont.). Curvas de Kaplan-Meier de SG específica para estimar el impacto pronóstico del estatus de HER2.

C. SG específica por carcinoma gástrico en función de la expresión de HER2.

D. SG específica por carcinoma gástrico en función del estatus de HER2.

Finalmente, procedimos a la realización de análisis de subgrupos con el objetivo de identificar a pacientes con pronóstico diferenciado. Así, por una parte, analizamos los tumores clasificados como HER2 negativos, comparando los tumores con expresión ausente o débil (HER2 0-1+) y los tumores con expresión moderada o equívocos no amplificados (HER2 2+ no amplificados); sin observarse diferencias significativas en SG con una mediana de SG no alcanzada para los pacientes 2+ no amplificados frente a 93.3 meses para los 0-1+ ($p=0.778$). Por otra parte, comparamos a los pacientes etiquetados como HER2 positivos, comparando los tumores con expresión intensa de HER2 (HER2 3+) frente a los con expresión equívoca amplificada (HER2 2+ amplificados); objetivándose una mediana de SG de 25.9 meses para los pacientes 3+ frente a 32.3 meses para los pacientes 2+ amplificados ($p=0.680$), no evidenciándose diferencias significativas entre ambos subgrupos (Figura 27).

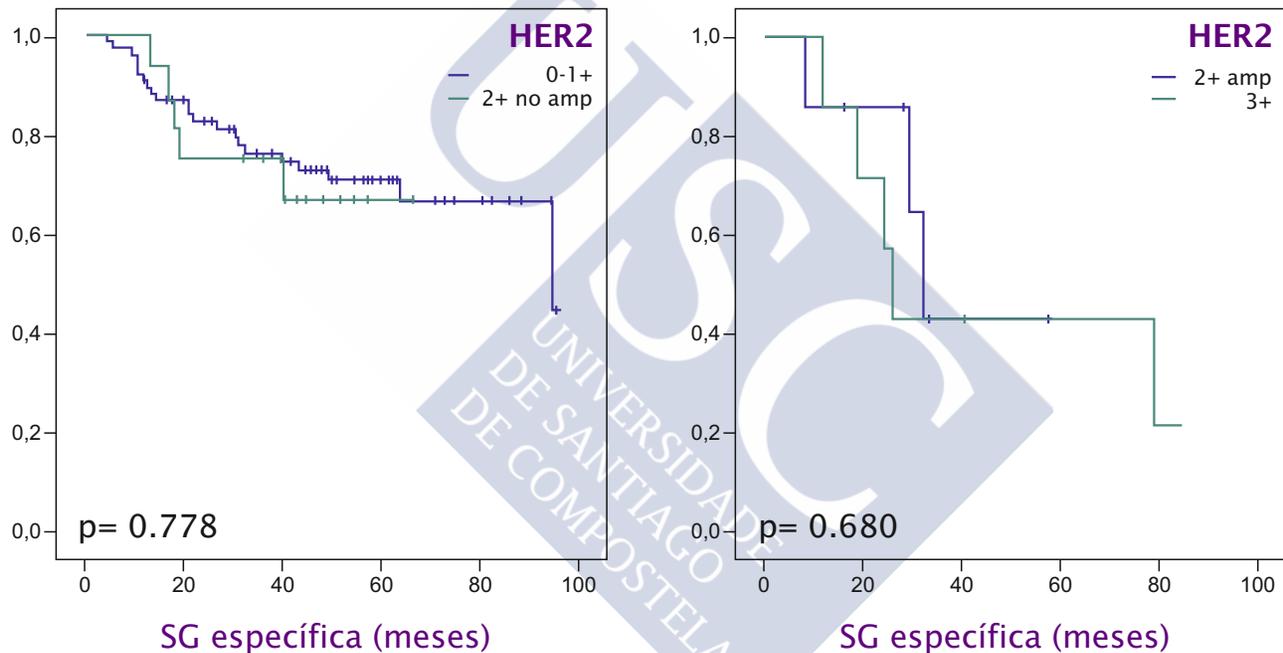


Figura 27. Curvas de Kaplan-Meier de SG para estimar el impacto pronóstico del estatus de HER2. Análisis de subgrupos.
A. Población HER2 negativa (0-1+ vs. 2+ no amplificados).
B. Población HER2 positiva (2+ amplificado vs. 3+).

2.4 Patrón de recurrencias y segundas neoplasias.

Por último, procedimos al análisis de las recurrencias, la localización de las mismas, y su relación con el estatus de HER2. En este sentido, del total de 106 pacientes, 24 (30.2%) presentaron recidiva de la enfermedad: 18 HER2 negativos y 6 positivos, representando un 19.6% de los tumores HER2 negativos frente al 42.8% en el caso de los tumores HER2 positivos ($p=0.052$); lo que nos indicaría una tendencia no significativa entre la positividad de HER2 y la recidiva de la enfermedad. Al analizar el lugar de recurrencia, 2 pacientes, ninguno de ellos HER2 positivo, presentaron recidivas locales; 8 pacientes, 1 de ellos HER2 positivo, presentaron recidivas regionales; y los 14 pacientes restantes, 5 de ellos HER2 positivos, presentaron recidivas a distancia. Cuando analizamos la relación entre el patrón de recurrencia y el estatus de HER2 se encontró un relación estadísticamente significativa entre la positividad de HER2 y la recidiva a distancia ($p=0.048$), sin presencia de recidiva locorregional acompañante (Figura 28).

HER2	Recidiva local	Recidiva regional	Recidiva a distancia
Negativo	2	7	9
Positivo	0	1	5
Total	2	8	14

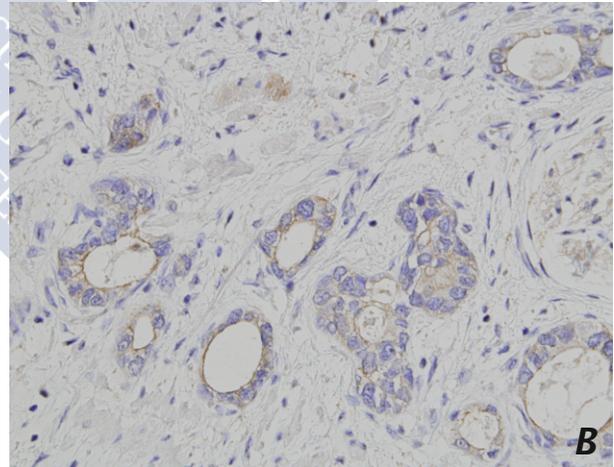
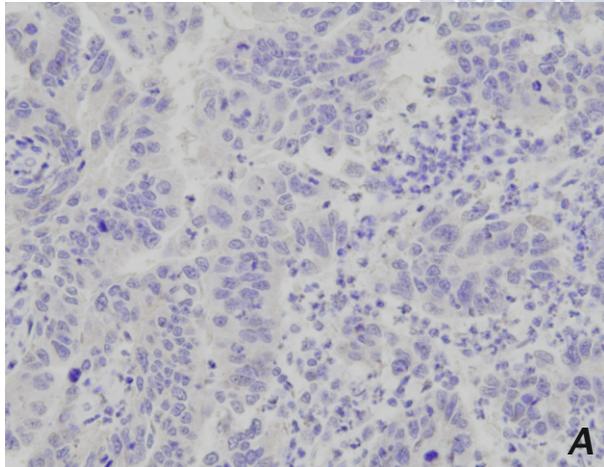
Figura 28. Patrón de recurrencias en función del estatus de HER2.

En último lugar, en lo referente el desarrollo de segundas neoplasias, 7 pacientes, todos ellos HER2 y HER3 negativos, presentaron una segunda neoplasia. Dicha neoplasias fueron: 3 pacientes presentaron un carcinoma epidermoide de pulmón localmente avanzado, 1 de ellos fallecido por dicho motivo; 1 paciente con un adenocarcinoma ductal de páncreas metastásico y 1 paciente con un adenocarcinoma de sigma metastásico, ambos fallecidos a las pocas semanas del diagnóstico; 1 con un carcinoma de mama HER2 negativo y 1 carcinoma de labio, ambos en seguimiento sin evidencia de recidiva.

3. Estatus de HER3.

3.1 Expresión proteica de HER3.

El estatus de HER3 fue determinado mediante el análisis de la expresión de HER3 por técnicas de IHC. Así, de los 106 pacientes incluidos, en 45 pacientes (42.5%) no se observó expresión de HER3 y se clasificaron como SCORE 0 o 0+, 32 (30.2%), presentaron expresión débil y, siguiendo el patrón usado para HER2, se codificaron como SCORE 1 o 1+, 21 pacientes (19.8%) contaban con expresión moderada, SCORE 2 o 2+ y los 8 pacientes restantes (7.5%) expresión intensa, denominada SCORE 3 o 3+. (Figura 29).



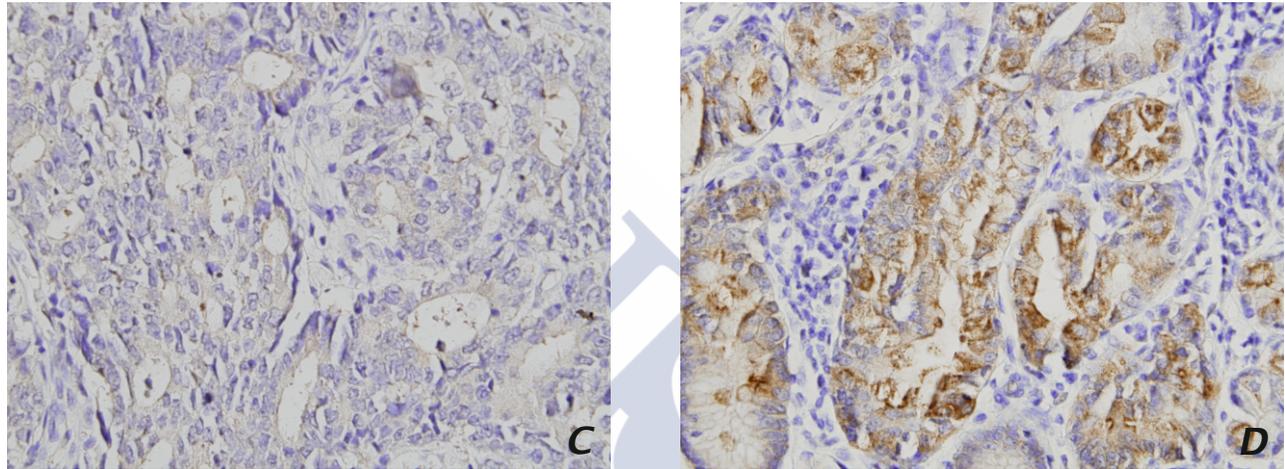


Figura 29. A-D Expresión citoplasmática de HER3 mediante técnicas de Inmunohistoquímica (40x).

*A. Ausencia de expresión (SCORE 0 o 0+). B. Expresión débil (SCORE 1 o 1+).
C. Expresión moderada (SCORE 2 o 2+). D. Expresión intensa, (SCORE 3 o 3+).*

En base a estos resultados, siguiendo nuestra clasificación, 77 pacientes (72.7%) con SCORE 0-1 o 0-1+ fueron etiquetados como negativos, mientras que los otros 29 pacientes (27.3%) con SCORE 2-3 o 2-3+, como positivos (Figura 30).

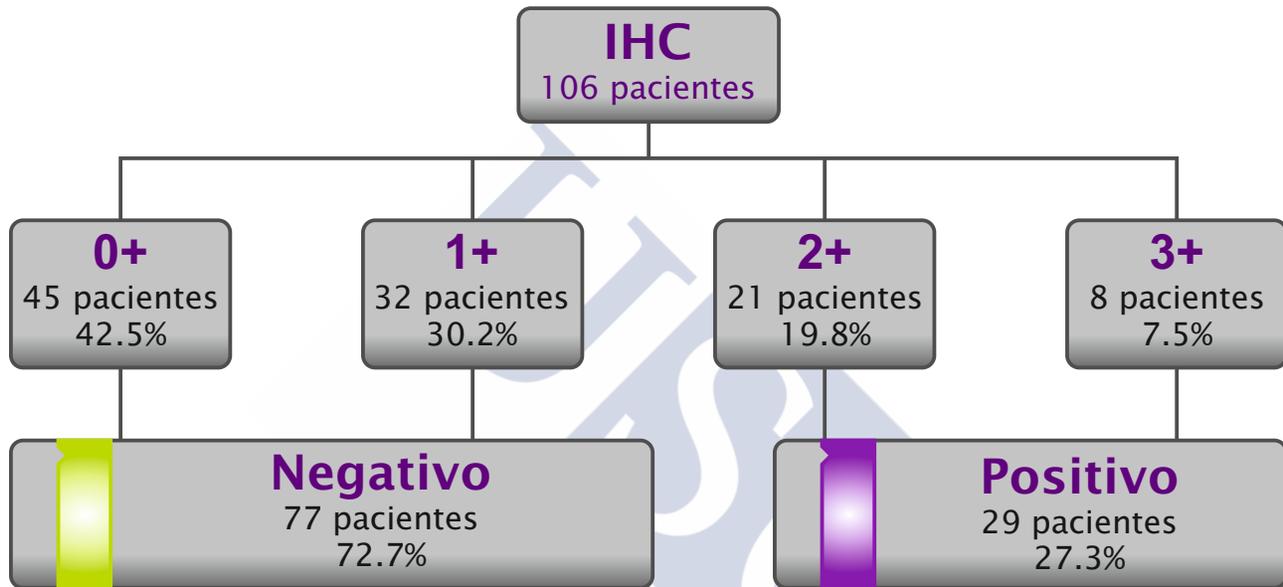


Figura 30. Clasificación de los pacientes en función de la expresión proteica de HER3.

3.2 Asociación parámetros clinicopatológicos.

Tras el análisis de la expresión y, en consecuencia, la determinación del estatus de HER3; procedimos a determinar la relación entre la positividad de HER3 y los parámetros clinicopatológicos clásicos.

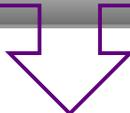
En este sentido, la positividad de HER3 se asoció significativamente con una menor edad al diagnóstico ($p=0.035$); con un 44.8% de pacientes menor de 65 años HER3 positivos frente a un 23.4% HER3 negativos.

Además, también se objetivó una relación significativa entre el estatus de HER3 y el grado de diferenciación ($p=0.049$), con un 75.9% de pacientes grado 1-2 HER3 positivos en comparación con un 54.5% en pacientes con ausencia de sobreexpresión de HER3.

Así mismo, aunque no alcanzó la significación estadística, HER3 se asoció a una mayor afectación ganglionar, con un 69% en pacientes HER3 positivos vs. un 49.4% en tumores HER3 negativos ($p=0.083$).

Sin embargo, HER3 no se asoció con el sexo de los pacientes ($p=0.365$), la localización tumoral ($p=0.253$), el subtipo histológico ($p=0.465$), la invasión tumoral en profundidad ($p=0.659$), la invasión linfovascular ($p=0.667$) o la invasión perineural ($p=0.516$) (Figura 31).

Características	Total 106 (%)	HER3 negativo 77 (72.6%)	HER3 positivo 29 (27.4%)	P
Edad				
≥65 años	75 (70.8)	59 (76.6)	16 (55.2)	0.035
<65 años	31 (29.2)	18 (23.4)	13 (44.8)	
Sexo				
Hombre	68 (64.2)	47 (61.0)	21 (72.4)	0.365
Mujer	38 (35.8)	30 (39.0)	8 (27.6)	



Localización				
Proximal	35 (33.0)	22 (28.6)	13 (44.8)	0.253
Distal	70 (66.0)	54 (70.1)	16 (55.2)	
NA	1 (1.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	
Subtipo Histológico				
Intestinal	77 (72.6)	54 (70.1)	23 (79.3)	0.465
No intestinal	29 (27.4)	23 (29.9)	6 (20.7)	
Grado Diferenciación				
G1-G2	64 (60.4)	42 (54.5)	22 (75.9)	0.049
G3-G4	42 (39.6)	35 (45.5)	7 (24.1)	
Invasión Tumoral				
T1-T2	43 (40.6)	30 (39.0)	13 (44.8)	0.659
T3-T4	63 (59.4)	47 (61.0)	16 (55.2)	
Afectación Ganglionar				
No	48 (45.3)	39 (50.6)	9 (31.0)	0.083
Si	58 (54.7)	38 (49.4)	20 (69.0)	
Invasión Vascular				
No	48 (45.3)	36 (46.7)	12 (41.4)	0.667
Si	58 (54.7)	41 (53.3)	17 (58.6)	
Invasión Perineural				
No	52 (49.1)	36 (46.7)	16 (55.2)	0.516
Si	54 (50.9)	41 (53.3)	13 (44.8)	
Tratamiento Adyuvante				
No	46 (43.4)	35 (45.4)	11 (37.9)	0.294
Si	60 (56.6)	42 (54.5)	18 (62.1)	

Figura 31. Expresión de HER3 y su relación con los parámetros clinicopatológicos clásicos.

3.3 Impacto pronóstico de HER3

Una vez estudiada la expresión de HER3 así como su relación con los parámetros clinicopatológicos clásicos, procedimos a determinar si existía relación entre la positividad de HER3 y la SG, para determinar si HER3 poseía impacto pronóstico.

Así, cuando analizamos la SG en función de la positividad de HER3, dividiendo a los pacientes en positivos, con expresión moderada o intensa, o negativos, si presentaban expresión ausente o débil; obtuvimos que, en pacientes HER3 positivos no se había alcanzado la mediana de SG frente a los pacientes HER3 negativos con una mediana de 93.9 meses (HR 1.39; IC 95% 0.61 - 3.21; Log Rank $p=0.441$); objetivándose la ausencia de impacto del estatus de HER3 sobre la SG; hecho que se confirmaba al analizar la SG específica por carcinoma gástrico (HR 0.898; IC 95% 0.37-2.18; Log Rank $p=0.813$). (Figura 32)

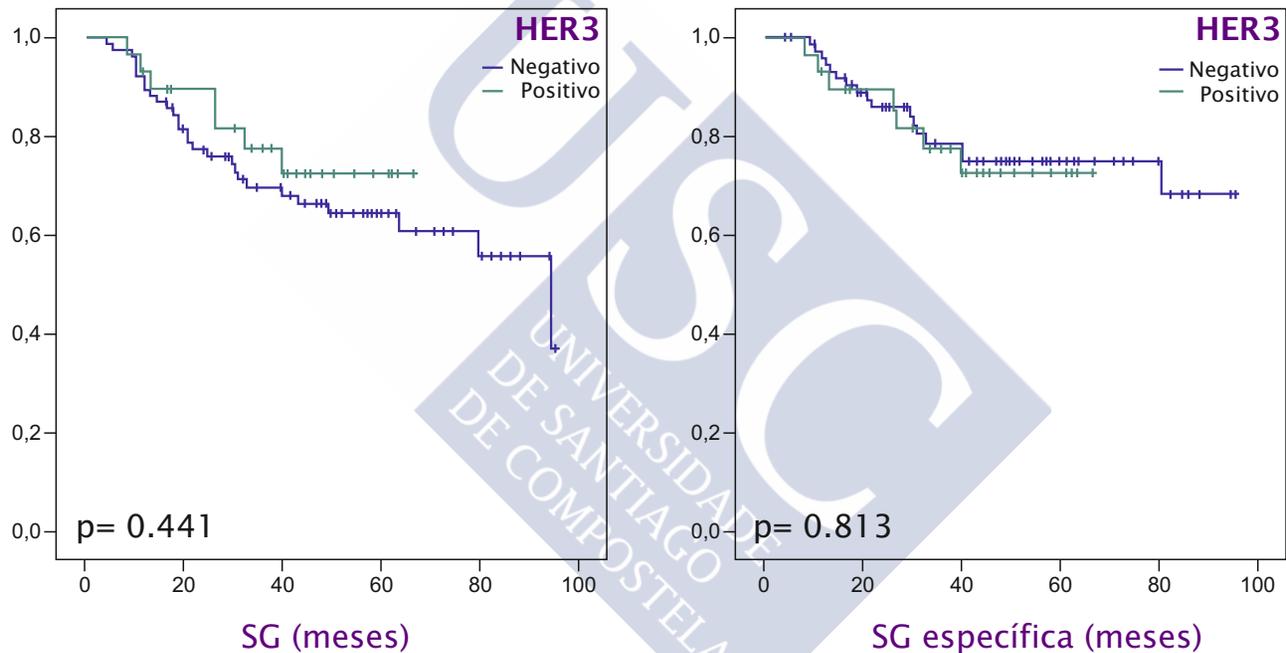


Figura 32. Curvas de Kaplan-Meier de SG para estimar el impacto pronóstico de HER3

A. SG en función del estatus de HER3.

B. SG específica por carcinoma gástrico en función del estatus de HER3.

3.4 Patrón de recurrencia.

Seguidamente, procedimos a determinar la relación entre la tasa y el patrón de recurrencia y el estatus de HER3. Así, cuantificamos que 24 pacientes (22.6%) presentaron recidiva de la enfermedad, 17 pacientes HER3 negativos y 7 HER3 positivos, lo que representaba una tasa de recurrencia del 22.1% y el 24.1%, respectivamente; no encontrando relación entre el estatus de HER3 y el desarrollo de recurrencia ($p=0.800$).

En lo referente al patrón de recurrencia, 2 pacientes (8.3%), ninguno de ellos HER3 positivo, presentaron recidiva a nivel de la anastomosis quirúrgica; 8 pacientes (40.6%), 3 con sobreexpresión de HER3, presentaron recidiva regional; y, la mayor parte, 14 pacientes (58.3%), 4 de ellos HER3 positivos, presentaron recidivas a distancia. No se objetivó relación entre el estatus de HER3 y el patrón de recurrencias ($p=0.838$) (Figura 33).

HER3	Recidiva local	Recidiva regional	Recidiva a distancia
Negativo	2	5	10
Positivo	0	3	4
Total	2	8	14

Figura 33. Expresión de HER3 y patrón de recurrencia.

4. Relación entre HER2 y HER3.

4.1 Coexpresión de HER2 y HER3.

El siguiente paso en nuestro estudio fue profundizar un poco más en el conocimiento del cáncer gástrico y los receptores HER2 y HER3, para lo cual nos planteamos estudiar la relación entre ambos receptores.

Para ello, en primer lugar, estudiamos la relación entre la intensidad de expresión de ambos receptores, estratificando a los pacientes en 3 grupos: ausencia de expresión o expresión débil (0-1+), expresión moderada (2+) y expresión intensa (3+).

Así, primeramente, observamos que ningún paciente presentaba expresión intensa de ambos receptores (HER2 3+-HER3 3+). De los 7 pacientes con expresión intensa de HER2 (HER2 3+), 5 pacientes (71.4%) exhibían expresión de HER3 0-1+, definidos como HER3 negativos, y solo 2 pacientes (28.5%) mostraban expresión moderada. En lo referente a los 8 pacientes con expresión intensa de HER3 (HER3 3+), 7 (87.5%), presentaban expresión de HER2 0-1+ y solo 1 paciente (12.5%) mostraba expresión moderada de HER2 sin amplificación de HER2 acompañante (ratio HER2/CEN-17 1.2). Cuando procedimos al análisis de las 23 muestras con expresión moderada de HER2 (HER2 2+); 1 paciente (4.3%) demostraba expresión intensa de HER3 (HER3 3+), 10 (43.5%), mostraban expresión moderada de HER3

(HER3 2+) y los 12 restantes (52.2%), ausencia o expresión débil de HER3 (HER3 0-1+). Al analizar las 21 muestras con expresión moderada de HER3 (HER3 2+), 10 muestras (47.6%) mostraban expresión moderada concomitante de HER2 (HER2 2+); 9 (42.9%), ausencia o expresión débil de HER2 (HER2 0-1+) y las 2 muestras restantes (9.5%), expresión intensa de HER2 (HER2 3+) con amplificación acompañante. Por último, 60 pacientes (56.6%) presentaban expresión ausente o débil de ambos receptores, definida como HER2 0-1+ - HER3 0-1+. (Figura 34)

Expresión HER2 (IHC)	0-1	Expresión HER3 (IHC)			Total
		0-1	2	3	
	0-1	60	9	7	76
	2	12	10	1	23
	3	5	2	0	7
Total		77	21	8	106

Figura 34. Comparación de la expresión de HER2 y HER3.

Posteriormente, realizamos una comparativa del estatus de HER2 y HER3 teniendo en cuenta los datos combinados de expresión y amplificación en el caso de HER2, y en consecuencia, dividiendo a los pacientes con expresión moderada de HER2 en función de si presentaban amplificación génica.

En base a esta división, de los 23 tumores con expresión moderada de HER2, 16 fueron clasificados como no amplificados y los 7 restantes, como amplificados. De los 16 no amplificados, 9 pacientes (56.2%) presentaban expresión de ausente o débil de HER3, 6 pacientes (37.5%) presentaban expresión moderada de HER3 y 1 paciente (6.2%) expresión intensa de HER3. Por el contrario, de los 7 pacientes amplificados, 3 pacientes (42.9%) presentaban expresión ausente o débil de HER3 y los 4 restantes (57.1%) expresión moderada de HER3. Ninguno de los pacientes presentó amplificación de HER2 y expresión intensa de HER3 de forma concomitante. Al analizar la relación entre el estatus de ambos receptores, objetivamos una asociación significativa entre ellos ($p=0.018$). (Figura 35).

Estatus HER2		Expresión HER3 (IHC)			Total
		0-1	2	3	
HER2	0-1	60	9	7	76
	2 no amp	9	6	1	16
	2 amp	3	4	0	7
	3	5	2	0	7
Total		77	21	8	106

Figura 35. Tabla Comparativa entre el estatus de HER2 y HER3.

Tras el análisis de la relación entre el estatus de HER2 y HER3, decidimos clasificar a los pacientes en función de dicho estatus. Así, dividimos a los pacientes dependiendo de si presentaban positividad para HER2, positividad para HER3, expresión moderada de ambos receptores o negatividad para los mismos. Como ya describimos con anterioridad, 14 pacientes fueron clasificados como HER2 positivos y, los 92 restantes, como HER2 negativos. De los 92 pacientes HER2 negativos, 16 pacientes fueron clasificados como HER3 positivos, 7, como HER2-HER3 expresión moderada, definidos como HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 positivos, y los 69 restantes, como HER2-HER3 negativos.

Posteriormente, tras la génesis de estos 4 subgrupos, analizamos su relación con las características clinicopatológicas clásicas. En primer lugar, objetivamos una asociación significativa entre el subtipo intestinal y los subgrupos con sobreexpresión del receptor HER2 ($p=0.032$), observando que mientras el 100% de los tumores HER2 positivos y el 85.7% de los tumores HER2-HER3 expresión moderada se correspondían con tumores intestinales, sólo el 68.7% de los HER3 positivos y el 66.6% de los HER2-HER3 negativos presentaban dicho subtipo histológico.

Por otra parte, en lo referente al grado de diferenciación, observamos una relación significativa entre un mejor grado de diferenciación y el estatus de los receptores HER ($p=0.015$), mostrándose que, mientras el 92.9% de los tumores HER2 positivos, el 71.4% de los HER2-HER3 expresión moderada y el 68.7% de los HER3 positivos presentaban tumores G1-2, esta diferenciación solo se objetivaba en el 50.7% de los tumores HER2-HER3 negativos.

También se mostró una tendencia no significativa en relación a la invasión tumoral en profundidad ($p=0.076$) y la afectación ganglionar ($p=0.077$).

Sin embargo, no se encontró asociación entre el estatus de los receptores HER y la edad al diagnóstico ($p=0.100$), el sexo ($p=0.150$), la localización tumoral ($p=0.290$), el estadio ($p=0.818$), la invasión linfocascular ($p=0.922$) o perineural ($p=0.668$). (Figura 36).

Características	HER2-HER3 Negativo 69 (65.1%)	HER2 Positivo 14 (13.2%)	HER3 positivo 16 (15.1%)	HER2-HER3 exp. mod. 7 (6.6%)	P
Edad					
≥65 años	51 (73.9)	11 (78.6)	11 (68.7)	2 (28.6)	0.100
<65 años	18 (26.1)	3 (21.4)	5 (31.3)	5 (71.4)	
Sexo					
Hombre	41 (59.4)	11 (78.6)	11 (78.6)	3 (42.9)	0.150
Mujer	28 (40.6)	3 (21.4)	3 (21.4)	4 (57.1)	
Localización					
Proximal	20 (29.0)	6 (42.9)	6 (37.5)	3 (42.9)	0.290
Distal	49 (71.0)	7 (50.0)	10 (62.5)	4 (57.1)	
NA	0 (0.0)	1 (7.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Subtipo Histológico					
Intestinal	46 (66.7)	14 (100.0)	11 (68.7)	6 (85.7)	0.015
No intestinal	23 (33.3)	0 (0.0)	5 (31.3)	1 (14.3)	
Grado Diferenciación					
G1-G2	35 (50.7)	13 (92.9)	11 (68.7)	5 (71.4)	0.076
G3-G4	34 (49.3)	1 (7.1)	5 (31.3)	2 (28.6)	



Invasión Tumoral					
T1-T2	24 (34.8)	10 (71.4)	7 (43.8)	2 (28.6)	0.076
T3-T4	45 (65.2)	4 (28.6)	9 (56.2)	5 (71.4)	
Afectación Ganglionar					
No	36 (52.2)	5 (35.7)	3 (18.7)	4 (57.1)	0.077
Si	33 (47.8)	9 (64.3)	13 (81.3)	3 (42.9)	
Estadio					
IA	4 (5.8)	2 (14.2)	3 (18.7)	1 (14.3)	0.818
IB	18 (26.1)	2 (14.2)	3 (18.7)	1 (14.3)	
IIA	12 (17.4)	5 (14.2)	1 (6.3)	2 (28.6)	
IIB	12 (17.4)	1 (7.1)	2 (12.5)	2 (28.6)	
IIIA	12 (17.4)	2 (14.2)	4 (25.0)	1 (14.3)	
IIIB	9 (13.0)	2 (14.2)	3 (18.7)	0 (0.0)	
IIIC	2 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Invasión Vascular					
No	33 (47.8)	6 (42.9)	6 (37.5)	3 (42.9)	0.922
Si	36 (52.2)	8 (57.1)	10 (62.5)	4 (57.1)	
Invasión Perineural					
No	33 (47.8)	6 (42.9)	8 (50.0)	5 (71.4)	0.668
Si	36 (57.1)	8 (57.1)	8 (50.0)	2 (28.6)	

Figura 36. Características clinicopatológicas y su relación con el estatus de los receptores HER2 y HER3.

Seguidamente, con el objetivo de detertminar el impacto pronóstico de dicha clasificación, analizamos la SG específica por carcinoma gástrico en función de la misma. Así, observamos una asociación significativa entre la positividad de HER2 o HER3 con una peor SG ($p=0.046$), en comparación con la población HER2-HER3 negativa, con un porcentaje de muertes por carcinoma gástrico del 43.2% en población HER2 positiva y del 31.2% en población HER3 positiva, respectivamente; frente a un 18.8% en población HER2-HER3 negativa. En contraposición, en lo referente a la población HER2-HER3 expresión moderada, observamos una asociación con una mejor SG específica, ya que ninguno de los pacientes falleció como consecuencia de la enfermedad (Figura 37).

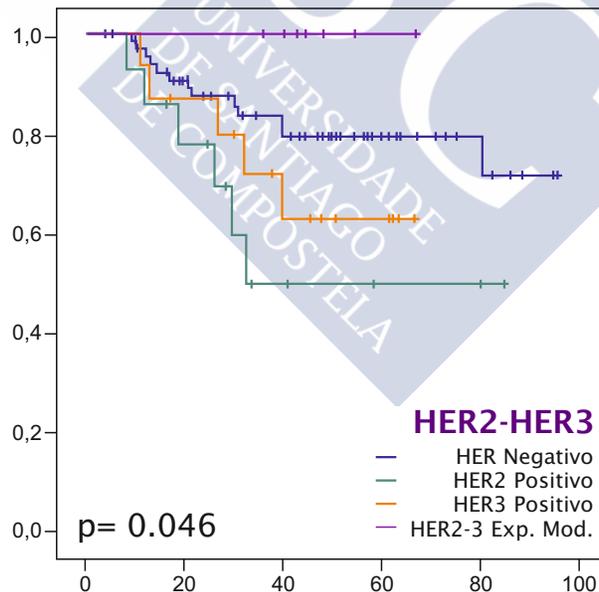


Figura 37. SG específica por carcinoma gástrico en función de HER2 y HER3.

4.2 Análisis de la SG en función de los subgrupos de expresión de receptores HER

Aunque en la clasificación anteriormente descrita parecía intuirse comportamiento diferenciado, asociado con determinadas características clinicopatológicas e impacto pronóstico, dicha clasificación presentaba una serie de limitaciones, como el hecho de que no dividía la población HER2 amplificada en función de si presentaba positividad para HER3 y que incluía a los pacientes con HER2 expresión moderada no amplificados sin coexpresión de HER3 como población HER2-HER3 negativa. En base a estos hallazgos decidimos subdividir nuestra población en seis grupos diferenciados de pacientes. Así, 60 pacientes, que presentaban expresión ausente o débil de HER2 y HER3, se clasificaron HER2-HER3 negativos; 9 pacientes, que presentaban expresión moderada de HER2 sin amplificación acompañante ni expresión de HER3, se denominaron HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 negativos; 16 pacientes, que mostraban expresión ausente o débil de HER2 y expresión moderada o intensa de HER3, se definieron como HER2 negativos-HER3 positivos; 7 pacientes, con expresión moderada de HER2 no amplificados y expresión moderada o intensa de HER3 acompañante, se denominaron HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 positivos; 8, que presentaban amplificación de HER2 sin positividad de HER3 acompañante, se clasificaron como HER2 positivos-HER3 negativos y, los 6 restantes, que presentaban amplificación de HER2 y positividad para HER3, se definieron como HER2-HER3 positivos.

Posteriormente, procedimos a analizar la relación entre los parámetros clinicopatológicos clásicos y dichos subgrupos.

Así, observamos una relación entre el subtipo intestinal de Lauren y aquellos subgrupos que presentaban sobreexpresión de HER2 ($p=0.020$), encontrándose que el 100% de los tumores HER2 positivos-HER3 negativos, HER2-HER3 positivos y HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 negativos y el 85.7% de los pacientes HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 positivos presentaban dicha diferenciación; frente al 68.7% de los pacientes HER2 negativos-HER3 positivos, y el 61.7% de los pacientes HER2-HER3 negativos; confirmándose así los resultados descritos con anterioridad.

En lo referente al grado diferenciación, encontramos una asociación entre el estatus de HER2 y/o HER3 y un mejor grado de diferenciación ($p=0.050$), con un 100% de tumores HER2-HER3 positivos, un 87.5% de tumores HER2 positivos-HER3 negativos, un 71.4% de los tumores HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 positivos, un 68,7% para los tumores HER2 negativos-HER3 positivos y un 66.7% para la población HER2 expresión moderada no amplificada-HER3 negativa con tumores bien o moderadamente diferenciados; mientras que sólo un 48.3% de la población HER2-HER3 negativa presentaban dicho grado de diferenciación.

Sin embargo, no encontramos asociación entre el estatus de los receptores HER y la edad al diagnóstico ($p=0.132$), el sexo ($p=0.284$), la localización tumoral ($p=0.187$), la invasión tumoral en profundidad ($p=0.189$), la afectación ganglionar ($p=0.130$), el estadio ($p=0.441$), la invasión linfocascular ($p=0.902$) o perineural ($p=0.871$). (Figura 38)

Resultados

Características	HER2 Negativo HER3 Negativo 60 (56.6%)	HER2 2+ no amp HER3 Negativo 9 (8.5%)	HER3 Positivo HER2 Negativo 16 (15.1%)	HER2 2+ no amp HER3 Positivo 7 (6.6%)	HER2 Positivo HER3 Negativo 8 (7.5%)	HER2 Positivo HER3 Positivo 6 (5.7%)	P
Edad							
≥65 años	43 (71.7)	8 (88.9)	11 (68.7)	2 (28.6)	8 (100.0)	3 (50.0)	0.132
<65 años	17 (28.3)	1 (11.1)	5 (31.3)	5 (71.4)	0 (0.0)	3 (50.0)	
Sexo							
Hombre	37 (61.7)	4 (44.4)	13 (81.3)	3 (42.9)	6 (75.0)	5 (83.3)	0.284
Mujer	23 (38.3)	5 (55.6)	3 (18.7)	4 (57.1)	2 (25.0)	1 (16.7)	
Localización							
Proximal	19 (31.7)	1 (11.1)	6 (37.5)	3 (42.9)	2 (25.0)	4 (66.7)	0.187
Distal	41 (68.3)	8 (88.9)	10 (62.5)	4 (57.1)	5 (62.5)	2 (33.3)	
NA	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	
Subtipo Histológico							
Intestinal	37 (61.7)	9 (100.0)	11 (68.7)	6 (85.7)	8 (100.0)	6 (100)	0.020
No intestinal	23 (38.3)	0 (0.0)	5 (31.3)	1 (14.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Grado Diferenciación							
G1-G2	29 (48.3)	6 (66.7)	11 (68.7)	5 (71.4)	7 (87.5)	6 (100)	0.050
G3-G4	31 (51.7)	3 (33.3)	5 (31.3)	2 (28.6)	1 (12.5)	0 (0.0)	



Invasión Tumoral							
T1-T2	22 (36.7)	2 (22.2)	7 (43.8)	2 (28.6)	6 (75.0)	4 (66.7)	0.189
T3-T4	38 (63.3)	7 (77.8)	9 (56.2)	5 (71.4)	2 (25.0)	2 (33.3)	
Afectación Ganglionar							
No	33 (55.0)	3 (33.3)	3 (18.7)	4 (57.1)	3 (37.5)	2 (33.3)	0.130
Si	27 (45.0)	6 (66.7)	13 (81.3)	3 (42.9)	5 (62.5)	4 (66.7)	
Estadio							
IA	4 (6.6)	0 (0.0)	3 (18.7)	1 (14.3)	0 (0.0)	2 (33.3)	0.441
IB	16 (26.7)	2 (22.2)	3 (18.7)	1 (14.3)	1 (12.5)	1 (16.7)	
IIA	12 (20.0)	0 (0.0)	1 (6.2)	2 (28.6)	4 (50.0)	1 (16.7)	
IIB	10 (16.7)	2 (22.2)	2 (12.5)	2 (28.6)	1 (12.5)	0 (0.0)	
IIIA	9 (15.0)	3 (33.3)	4 (25.0)	1 (14.3)	2 (25.0)	0 (0.0)	
IIIB	8 (13.3)	1 (11.1)	3 (18.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (33.3)	
IIIC	1 (1.7)	1 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Invasión Vascular							
No	30 (50.0)	3 (33.3)	6 (37.5)	3 (42.9)	3 (37.5)	3 (50.0)	0.902
Si	30 (50.0)	6 (66.7)	10 (62.5)	4 (57.1)	5 (62.5)	3 (50.0)	
Invasión Perineural							
No	29 (48.3)	4 (44.4)	8 (50.0)	5 (71.4)	3 (37.5)	3 (50.0)	0.871
Si	31 (51.7)	5 (55.6)	8 (50.0)	2 (28.6)	5 (62.5)	3 (50.0)	

Figura 38. Tabla comparativa de los subgrupos de expresión de receptores HER y los parámetros clinicopatológicos clásicos.

Tras la génesis de estos 6 subgrupos y el análisis de la relación con los parámetros clinicopatológicos clásicos, procedimos al estudio de la SG específica por carcinoma gástrico, observando, en primer lugar, un porcentaje de muerte por carcinoma gástrico del 22.6% en población no seleccionada. Al desglosar la supervivencia en función de los distintos subgrupos observamos una asociación significativa entre la mortalidad y el estatus de HER2 y HER3 ($p=0.032$). Así, mientras los pacientes HER2-HER3 negativos presentaban un 15% de muertes producidas por el propio carcinoma gástrico, este porcentaje ascendía al 50% y el 44.4% en los pacientes HER2 positivos-HER3 negativos y en aquellos con HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 negativos, respectivamente. Sin embargo, cuando analizábamos la población con expresión de HER3 concomitante, la mortalidad específica por carcinoma gástrico se situaba en un 33.3% para la población HER2 positiva-HER3 positiva y un 31.2% en los pacientes HER2 negativos-HER3 positivos y la ausencia de muertes por carcinoma gástrico en la población HER2 expresión moderada no amplificados-HER3 negativos.

Así, observamos que los mayores porcentajes de recurrencia se correspondían con la población con expresión de HER2, ya fuese con expresión moderada no amplificada o con amplificación del HER2, sin presencia de coexpresión de HER3, con un porcentaje de recurrencia en torno al 50%. Sin embargo, dicho porcentaje de recurrencia disminuía sustancialmente cuando los tumores presentaban expresión de HER3 concomitante, con un porcentaje de recurrencia del 33.3%, el 31.2% y el 0% para población HER2-HER3 positiva, HER2 negativa-HER3 positiva y HER2 expresión moderada no amplificada-HER3 positiva, respectivamente.

Además, con excepción de la población HER2 expresión moderada no amplificada-HER3 positiva, todos los subgrupos presentaban porcentajes de mortalidad específica superiores a la población HER2-HER3 negativa (Figura 39).

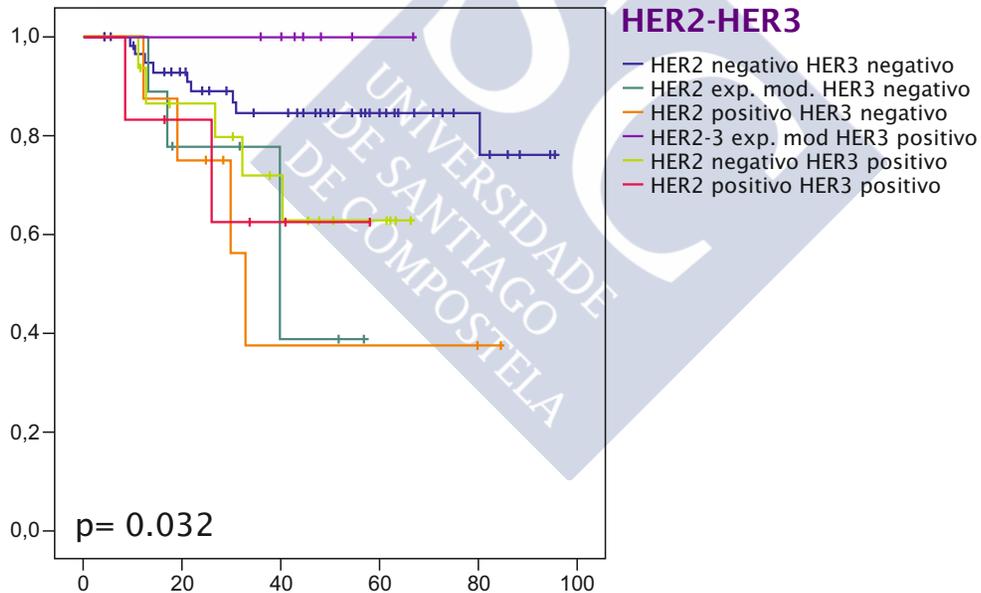


Figura 39. SG específica por carcinoma gástrico en función de los subgrupos de expresión de receptores HER.





Discusión



El uso de trastuzumab en pacientes con cáncer gástrico o de la UGE HER2 positivo avanzado ha sido el primer ejemplo de éxito de la medicina personalizada en el carcinoma gastroesofágico. Sin embargo, los resultados decepcionantes de otros estudios con fármacos dirigidos contra esta vía subrayan la importancia de entender el papel de la vía de HER2 en la tumorigénesis del carcinoma gástrico, empezando por su papel en la enfermedad localizada ^{75,76,133}.

Por dicho motivo, en nuestro estudio hemos analizado el papel del estatus de HER2 y HER3, así como la relación entre ambos receptores, en 106 pacientes sometidos a cirugía con intención radical con el objetivo de determinar si definían un subgrupo con características clinicopatológicas diferenciadas, impacto pronóstico y patrón de diseminación y/o recurrencia diferenciado.

En primer lugar, procedimos al análisis de las características clinicopatológicas de nuestra población, encontrándonos que éstas no diferían de las encontradas en otros estudios previamente publicados.

Así, en relación a la edad al diagnóstico, la mediana de edad de nuestra muestra fue de 69 años, consistente con la epidemiología del carcinoma gástrico, cuyo pico de máxima incidencia se sitúa en la séptima década de la vida. En lo referente a la distribución por sexos, un 64.2% de los pacientes eran varones, lo que aparece en concordancia con el ratio 2:1 que caracteriza dicha patología ¹⁴³.

En lo que respecta a las características anatomopatológicas de los tumores de

nuestro estudio, destacar que el porcentaje obtenido variaba mínimamente al compararlo con el estudio que validaba la metodología para la determinación de HER2, realizado en población europea¹⁰³.

Así, el 10.4% de los pacientes presentaban tumores localizados en la UGE, porcentaje ligeramente inferior al 11.3% de la serie anteriormente descrita¹⁰³.

Además, cuando clasificamos a los pacientes de acuerdo a los subtipos histológicos de Lauren, objetivamos que el subtipo intestinal es el subtipo histológico más frecuente, estando presente en el 72.6% de nuestros tumores, porcentaje muy similar al 71.5% obtenido en la serie de Hofmann y cols¹⁰³.

Por otra parte, al observar el grado de diferenciación, se evidenciaron ligeras diferencias con nuestra población de referencia. Así, el 16% de tumores se etiquetaron como bien diferenciados, frente al 3% de la serie de Hofmann; el 44.3%, como moderadamente diferenciados, en comparación con el 55% previo; el 36.8%, como pobremente diferenciados, en comparación con el 41.1%, y el 3% restante, vs 0.5% de Hofmann y cols, como tumores indiferenciados. Sin embargo, al clasificar a los pacientes como bien y moderadamente diferenciados frente a pobremente diferenciados e indiferenciados, nos encontramos con frecuencias muy similares a las referidas con anterioridad, con el 60.3% frente al 58%, para los tumores mejor diferenciados; y el 39.6% vs. 41.6%, para los tumores con peor grado de diferenciación; lo que nos indica la similitud entre nuestra serie y la de Hofmann y cols¹⁰³.

En lo referente al tipo de cirugía realizada, procedimos al análisis de la técnica quirúrgica llevada a cabo con el objetivo de determinar si los pacientes se habían sometido a cirugías con intención curativa, y si dicha cirugía cumplía los estándares definidos para la cirugía gástrica, ya que la realización de una cirugía subóptima podría sesgar los resultados de nuestro estudio.

En primer lugar, destacar que todos los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron sometidos a cirugía con intención curativa, definida por la presencia de márgenes libres. En relación a la resección ganglionar, se realizó la exéresis de al menos 15 adenopatías en el 83% de los pacientes, umbral definido por su impacto pronóstico; y el 58.5% de los pacientes fueron sometidos a una linfadenectomía D2 modificada, considerada cada vez más, a pesar de los resultados contradictorios de varios ensayos randomizados, como la técnica quirúrgica de elección en población occidental ³⁹.

El hecho de que la mayor parte de los pacientes hayan sido sometidos a una gastrectomía con márgenes adecuados, acompañada de un linfadenectomía extensa y minuciosa, refleja la tendencia observada en los últimos años en la que los cirujanos europeos optan por la realización de cirugías más amplias, emulando las cirugías llevadas a cabo en población asiática. Dichos datos no han sido recogidos en los estudios previos realizados sobre el impacto de la familia HER en carcinoma gástrico o de la UGE resecaado, aportando solidez a nuestro estudio y dándonos una idea de la calidad de la cirugía a la que fueron sometidos nuestros pacientes ^{35-40,46-49}.

En lo referente al estadiaje patológico, de acuerdo a la clasificación AJCC TNM 7ª edición, nos encontramos con que en nuestro estudio se incluyeron un 9.4% de pacientes con tumores limitados a la mucosa sin afectación ganglionar, definidos como T1N0 o estadio IA. Esta población, caracterizada por su excelente pronóstico, no había sido incluida en los estudios de biomarcadores realizados con anterioridad ni en aquellos que testaban el papel del tratamiento complementario. Entre las causas de que dicha población no haya sido incluida nos encontramos el hecho de que la técnicas endoscópicas se hayan consolidado como técnica de elección en dicho estadio, condicionando que contemos con una menor muestra tumoral para la realización de estudios anatomopatológicos, incluyendo los de biomarcadores^{50,55,58,103}.

Por otra parte, en relación al estadiaje de la población global de estudio, destacar que más de la mitad de los pacientes presentaban tumores localmente avanzados, definidos por una invasión tumoral que sobrepasaba la capa muscular y/o la presencia de afectación ganglionar, lo que nos indica que nos encontramos frente a una población de alto riesgo de recurrencia; hecho que se confirma por la presencia de invasión linfovascular y/o perineural en, aproximadamente, la mitad de los mismos. Al intentar realizar un análisis comparativo con los estudios previos realizados en población occidental, nos encontramos con que dichos estudios carecen de datos sobre el estadiaje tumoral, hecho que da más peso a nuestra serie en la que tenemos una relación detallada de las características de la población¹⁰³.

1. Estatus de HER2.

Tras analizar las características clinicopatológicas de nuestra población, así como su concordancia con los estudios previamente publicados, procedimos al análisis del estatus de HER2, así como sus posibles implicaciones.

En nuestro estudio hemos detectado positividad para HER2 en 14 de los 106 pacientes incluidos (13.2%). Dicho porcentaje se encuentra en consonancia con los estudios previamente publicados, realizados en población occidental, con enfermedad avanzada, y que combinaban técnicas de expresión proteica y amplificación génica; cuyo porcentaje de positividad oscilaba entre el 10% y el 20%^{14,102-104}.

En relación a la metodología utilizada para la determinación de HER2, uno de los puntos fuertes de nuestro estudio es que hemos empleado técnicas de determinación aprobadas por la FDA, como la IHC, para determinar la expresión proteica, y el DuoCISH, para la amplificación génica. Además, las muestras han sido evaluadas de acuerdo a las principales guías de consenso para la determinación e interpretación de HER2 en carcinoma gástrico avanzado, con la única salvedad de que las técnicas de hibridación han sido realizadas en todos los pacientes, y no solo en aquellos con expresión moderada o equívoca; con el objetivo de identificar casos discordantes, como la presencia de tumores negativos amplificados o viceversa, para así validar la utilidad del algoritmo de interpretación de HER2 en enfermedad avanzada para su aplicación en enfermedad localizada^{141,142}.

En nuestra población, todos los pacientes con expresión intensa, clasificados como positivos mediante IHC, y ninguno con expresión ausente o débil, definidos como negativos, presentaron amplificación génica, mostrándonos una concordancia del 100% en estas subpoblaciones para las dos técnicas de determinación. Sin embargo, en los pacientes con expresión moderada, denominados equívocos, donde, según los principales guías de consenso, la realización de técnicas de hibridación es mandatoria, se ha objetivado amplificación en el 30.4% de los pacientes, en la línea con los estudios previos en enfermedad avanzada que observaron amplificación génica en, aproximadamente, un tercio de los tumores con expresión moderada^{103,140,141}.

En base a esto, confirmamos la validez del algoritmo de HER2 en enfermedad avanzada para su uso en población localizada, en el que las técnicas de IHC son de primera elección en todos los pacientes y las técnicas de hibridación se reservan para los pacientes con expresión moderada o equívocos, minimizando los costes y el tiempo para la determinación.

Por otra parte, hemos analizado el impacto del ratio de amplificación génica en función de la intensidad proteica así como su importancia pronóstica. Así, en lo referente a la población HER2 negativa, definida como aquella con ausencia de expresión, expresión débil o expresión moderada no amplificada, hemos hallado un ratio de amplificación HER2/CEN-17 1.1 (0.8-1.6), sin observarse diferencias en dicho ratio entre los distintos subgrupos ni impacto de los mismos en la SG ($p=0.778$). Por otra parte, cuando analizamos la población HER2 positiva, que incluía

los tumores con expresión intensa o expresión moderada no amplificados, observamos resultados más heterogéneos, ya que mientras el subgrupos con expresión moderada amplificado presentaba un ratio de 4.2 (rango 2.3–6.1), el grupo de expresión intensa poseía un ratio de 8.1 (rango 5.4-13.3). Al estudiar el impacto pronóstico de dichos subgrupos, aunque observamos diferencias en términos absolutos de SG, con una mediana 25.9 meses para la población con expresión intensa frente a 32.3 meses en aquellos con expresión moderada amplificada, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0.680$), probablemente debido al escaso número de pacientes de estas subpoblaciones. En esta misma línea, en enfermedad avanzada fue llevado a cabo un análisis retrospectivo de pacientes incluidos en el TOGA, objetivándose una relación entre el ratio de amplificación de HER2 y la respuesta tumoral y estableciendo un nuevo punto de corte que discriminaba mejor a los pacientes respondedores y los no respondedores¹⁴⁵.

En base a estos resultados, sería interesante la realización de un estudio prospectivo multicéntrico con un tamaño muestral que nos permitiese determinar si el número de copias de HER2 podría tener impacto pronóstico o predictivo de respuesta.

Otro aspecto a destacar es el hecho de que hemos observado, por primera vez en población occidental europea reseca, la asociación entre la positividad de HER2 y parámetros clinicopatológicos clásicos como el subtipo intestinal de la clasificación de Lauren y la localización proximal, ya identificados previamente en

enfermedad avanzada; así como el mejor grado de diferenciación, observado con anterioridad en el metaanálisis de población fundamentalmente asiática sobre el impacto de HER2^{102,104,107}.

Además, en esta misma línea, hemos identificado un distinto patrón de relación entre la invasión tumoral en profundidad (T) y la afectación ganglionar (N) en función del estatus de HER2; documentando, por primera vez en el carcinoma gástrico o de la UGE HER2 positivo, un fenómeno de diseminación ganglionar precoz caracterizado por la afectación ganglionar en tumores confinados a la capa muscular, hecho no presente en la población HER2 negativa. Por otra parte, también hemos documentado un patrón de recurrencia característico en la población HER2 positiva, consistente en la presencia de metástasis, a nivel intrahepático o más allá de la cavidad peritoneal, sin la presencia de recidiva local o en forma de carcinomatosis peritoneal.

El hecho de que la positividad de HER2 defina un subgrupo de pacientes con un patrón de diseminación y recurrencia diferenciado nos orienta a que, probablemente, HER2 y sus vías de señalización tengan influencia en la evolución de la enfermedad, lo cual no había sido documentado previamente en el carcinoma gástrico o de la UGE y podría tener diversas implicaciones, al igual que ocurre en el carcinoma de mama HER2 positivo, donde algunos autores proponen que, debido a su patrón de recurrencia característico, se tenga en cuenta la determinación de HER2 en el seguimiento del paciente con enfermedad resecable⁹⁹.

Otro aspecto destacable de nuestra serie es que, además de haber documentado la asociación de HER2 con determinados parámetros clinicopatológicos, e identificado un patrón de diseminación precoz y de recurrencias diferenciado; también hemos objetivado el impacto pronóstico de HER2 en población occidental europea reseca, condicionado una SG significativamente inferior, así como su asociación con un mayor porcentaje de recurrencias^{26,145}.

Todos estos hallazgos nos dan una idea de la agresividad de este subtipo tumoral, y se encuentran en la línea con los estudios realizados previamente en cáncer de mama, en la que los tumores HER2 positivos habían sido relacionados con un peor pronóstico y una mayor tasa de recurrencias, predominantemente a nivel visceral, frente a los subtipos luminales caracterizados por una mejor supervivencia y asociados con la recurrencia a nivel óseo^{96-98,99}.

El hecho que HER2 perfile un subgrupo con características diferenciadas, sobre todo en lo referente a pronóstico, porcentaje y patrón de recurrencias, podría tener no sólo implicaciones pronósticas sino también terapéuticas. Así, en lo referente a las estrategias de tratamiento complementario clásicas, como la radioquimioterapia adyuvante, que ha demostrado beneficio en la tasa de recurrencias, esencialmente disminuyendo las recurrencias locorregionales pero sin impacto en las a distancia, esta estrategia podría carecer de utilidad en población HER2 positiva, tal y ha sido observado en el análisis retrospectivo no planificado del estudio INT0116 en función del estatus de HER, donde el beneficio aparecía limitado a la población HER2 negativa. Además, actualmente se encuentran en marcha dos

estudios randomizados que evalúan el papel de la terapia antiHER2 en combinación con quimioterapia perioperatoria en carcinoma gástrico o de la UGE localmente avanzado, y cuyos resultados nos darán una idea del valor predictivo de HER2 en población resecable así como de su impacto en las tasas de resección y supervivencia de estos pacientes^{50,56,105,138,139}.



2. Estatus de HER3

Con anterioridad a nuestro estudio, disponíamos de pocos datos sobre el estatus de HER3, procedentes de 5 estudios en población asiática y 1 en brasileña, con una mediana de sobreexpresión del 35.5%, y un rango entre el 13 y el 64%¹¹⁷⁻¹²³.

En nuestro estudio, el primero llevado a cabo en población occidental europea reseca, realizado con técnicas de IHC, hemos identificado sobreexpresión citoplasmática de HER3 en el 27.3% de los pacientes, en la línea de lo reportado previamente de manera global. Sin embargo, un hecho que llama la atención es la gran variabilidad en la sobreexpresión citoplasmática de HER3 en los diferentes estudios, con un rango que oscila entre el 13.7 y 62%. Dicha variabilidad, que también había sido observada en los primeros estudios en los que se testaba la sobreexpresión de HER2, podría atribuirse a diversos factores como la ausencia de kits validados para su determinación o de guías de consenso para su interpretación. Para intentar afrontar esta limitación, hemos optado por un anticuerpo monoclonal que había sido utilizado previamente en estudios en cáncer de mama, hemos incluido controles positivos y negativos de forma interna para testar la fiabilidad de la técnica, hemos implementado una estrategia estandarizada de interpretación y ésta ha sido llevada a cabo por dos observadores de manera independiente¹¹⁷⁻¹²².

Una posible limitación a la hora de comparar los resultados de nuestra serie con los previamente mencionados, es el hecho de que dichos estudios han sido realizados en población fundamentalmente asiática, dado que como ya conocemos

el comportamiento del carcinoma gástrico o de la UGE difiere en población asiática y occidental¹²².

Una crítica a nuestra serie podría ser el hecho de que hayamos determinado el estatus de HER3 utilizando una sola técnica de determinación, la IHC. Cuando planteamos nuestro estudio, aunque ya conocíamos que la sobreexpresión de HER3 poseía impacto pronóstico, al menos en población asiática, desconocíamos el papel de la amplificación de HER3, dado que solo disponíamos de los datos de 1 serie brasileña en la que no se había identificado ningún paciente con amplificación de HER3. Más recientemente, el TCGA ha publicado los datos de amplificación de HER3 mediante técnicas de secuenciación, observándose la presencia de amplificación en el 1-2% de los pacientes; así como su ausencia de relación con la expresión de HER3 y el pronóstico, por lo que hemos desestimamos la realización de técnicas de hibridación para la amplificación de HER3, dado su coste y rentabilidad^{14,117-123}.

En base a lo anteriormente descrito, aunque hemos identificado la presencia de sobreexpresión de HER3 en carcinoma gástrico o de la UGE en población occidental europea resecada, utilizando técnicas de IHC con una metodología de interpretación estandarizada, adaptada de la utilizada para HER2, creemos que debería plantearse un estudio prospectivo validación con el objetivo de confirmar el porcentaje de positividad de HER3 descrito en nuestro trabajo¹¹⁷⁻¹²³.

Además de la determinación de HER3, hemos identificado su asociación con parámetros clinicopatológicos como el mejor grado de diferenciación.

Así, en nuestra serie hemos identificado la presencia de tumores bien-moderadamente diferenciados en el 75% de los tumores HER3 positivos. Dicha asociación, ya había sido identificada previamente en un estudio en población reseca, llevado a cabo en población brasileña, y además se encuentra en la línea con los datos previos referentes a HER2¹¹⁷⁻¹²³.

En lo referente al impacto pronóstico de HER3, en nuestro estudio no hemos objetivado relación entre el estatus de HER3 y la SG, lo que contrasta con la mayor parte de los estudios realizados en población asiática, en los que HER3 definía una SG significativamente inferior. Por otra parte, tampoco se ha identificado, a diferencia del estatus de HER2, impacto de HER3 en el porcentaje o patrón de recurrencias. Es importante recordar que, debido a variaciones genéticas y en la exposición a factores de riesgo, existen diferencias considerables entre la población occidental y la asiática que afectan, incluso, a la reproducibilidad de la clasificación molecular del TCGA. Es muy posible que el peor pronóstico de los pacientes HER3 positivos se vea compensado por otros factores que no se han explorado en este estudio. Por ejemplo, la mayor parte de casos con alteraciones en la vía de HER2 y HER3 en pacientes occidentales se producen en el subgrupo CIN, un subgrupo que no tiene correspondencia directa en pacientes asiáticos, y son raras en el subgrupo MSI, mucho más frecuente en pacientes asiáticos y de mejor pronóstico^{117-123,147}.

Así, aunque hayamos identificado sobreexpresión de HER3 y su relación con características clinicopatológicas clásicas como el grado de diferenciación, su ausencia de impacto pronóstico y en el porcentaje y patrón de recurrencia, nos

orienta a que probablemente HER3 no defina la evolución de estos tumores, a diferencia de lo previamente identificado con HER2. Este fenómeno podría explicarse en base a la estructura de los receptores HER, ya que HER3, como expusimos con anterioridad, carece de actividad tirosina quinasa propia, lo que le obliga a la heterodimerización con otros miembros de la familia, especialmente con HER2, dada su facilidad para la heterodimerización en base a su conformación permanentemente abierta y, en consecuencia, activando las principales vías de señalización, principalmente del receptor HER2⁸⁶⁻⁹⁰.

En base a lo anteriormente descrito, una vez demostrado el impacto pronóstico de HER2, su relación con características clinicopatológicas como el subtipo intestinal de Lauren o un mejor grado de diferenciación, así como una historia natural caracterizada por la afectación ganglionar precoz y la metastatización a distancia; y la presencia de sobreexpresión de HER3 y su asociación con características como el mejor grado de diferenciación, pero sin impacto en el pronóstico o en el patrón de diseminación y/o metastatización; procedimos a analizar la relación entre ambos receptores así como sus posibles implicaciones.

3. Relación entre HER2 y HER3.

Aunque el estatus de HER2 y HER3 había sido estudiado de manera independiente en diversos estudios en el carcinoma gástrico o de la UGE, ninguno ha analizado de forma detallada la relación entre ambos.

Por dicho motivo, en nuestro estudio hemos analizado de forma detallada la relación entre el estatus de ambos receptores, así como sus implicaciones pronósticas.

Hemos observamos que, mientras la expresión intensa de HER3 o la amplificación de HER2 se acompañan de expresión ausente o débil del otro receptor, los fenómenos de coexpresión aparecían fundamentalmente en los pacientes con expresión moderada de ambos receptores. Así, objetivamos una asociación significativa entre el estatus de HER2 y HER3, no documentada previamente en la literatura, probablemente a través de los fenómenos de heterodimerización que hemos descrito con anterioridad.

Para intentar confirmar nuestros resultados, hemos analizado la relación del estatus de HER2 y HER3 utilizando los datos procedentes del TCGA, en los que hemos observado que ninguno de los pacientes presenta sobreexpresión de HER3 y amplificación de HER2 concomitante y, por el contrario, hemos identificado que la presencia de coexpresión HER2-HER3 aparece en los pacientes con expresión moderada; lo que viene a confirmar los datos de nuestro estudio .

Posteriormente, con el objetivo de analizar las posibles implicaciones de la relación entre el estatus de HER2 y HER3, hemos elaborado dos clasificaciones para estudiar las relaciones entre dichos receptores.

Como ya expusimos con anterioridad, inicialmente, creamos una clasificación de 4 categorías, dividiendo a la población en HER2 positiva y HER2 negativa y, posteriormente, dividiendo a la población HER2 negativa en función de si presentaba positividad para HER3, expresión moderada de ambos receptores o negatividad para los mismos. Sin embargo, dicha clasificación presentaba 2 limitaciones fundamentales, por una parte el hecho de que no dividía a la población HER2 positiva en función de si presentaba expresión de HER3 concomitante y, por otra, que clasificaba a la población HER2 expresión moderada no amplificada sin expresión de HER3 como población HER2-HER3 negativa.

Por dicho motivo, para poder analizar de manera más detallada el impacto del estatus de HER2 y HER3, procedimos a la creación de una segunda clasificación con 6 categorías en función del estatus de dichos receptores: HER2-HER3 negativo, HER2 expresión moderada-HER3 negativo, HER2 negativo-HER3 positivo, HER2 expresión moderada-HER3 positivo, HER2 positivo-HER3 negativo y HER2 positivo-HER3 positivo; solventando así las limitaciones descritas con anterioridad.

Tras la definición de estas clasificaciones, así como de los diversos subgrupos que las integran, analizamos su relación con los parámetros clinicopatológicos clásicos, objetivando una asociación significativa entre la sobreexpresión de HER2 y el subtipo histológico intestinal de Lauren; y una relación significativa entre la positividad de HER2 y/o HER3 y el mejor grado de diferenciación.

En relación al subtipo histológico de Lauren, hemos identificado una asociación significativa entre el subtipo intestinal y la positividad de HER2, común a las 2 clasificaciones. Así, en la primera clasificación, el subtipo intestinal se ha asociado con los subgrupos HER2 positivo y HER2-HER3 expresión moderada; mientras que en la segunda clasificación, se ha relacionado con los subgrupos que contenían sobreexpresión de HER2: HER2 expresión moderada-HER3 negativo, HER2 expresión moderada-HER3 positivo, HER2 positivo-HER3 negativo y HER2 positivo-HER3 positivo. Estos resultados confirmarían la asociación previamente descrita entre el estatus de HER2 y el subtipo intestinal de Lauren, con la salvedad de que, según estos nuevos datos, no tendrían que tenerse en cuenta solo en los pacientes con criterios de positividad para HER2, sino también aquellos con expresión moderada que no presenten amplificación génica.

Por otra parte, en lo referente al grado de diferenciación, el estatus de HER2 y/o HER3, en comparación con la población HER negativa, se ha asociado con tumores con mejor grado de diferenciación en ambas clasificaciones, confirmando la relación de HER2 y HER3, ya documentada individualmente con anterioridad, y un mejor grado de diferenciación.

Finalmente, tras el análisis de la relación entre HER2 y HER3, la creación de 2 clasificaciones en función del estatus de dichos receptores, así como su relación con parámetros clinicopatológicos como el subtipo histológico intestinal de Lauren o el mejor grado de diferenciación; hemos analizado el impacto pronóstico de los distintos subgrupos definidos por el estatus de HER2 y HER3.

Así, al analizar la población de acuerdo a la primera clasificación, hemos objetivado la asociación de la positividad HER2 o HER3 con un peor pronóstico en comparación con la población HER negativa; confirmando así el impacto pronóstico de la población HER2 positiva descrita con anterioridad, siendo esta población la de peor pronóstico con un 43.2% de muertes por cáncer. En lo referente al estatus de HER3, que carecía per se de impacto pronóstico, la población HER3 positiva presentó una peor SG, con una tasa de muertes del 31.2%, intermedia entre la HER2 positiva descrita con anterioridad y la población HER negativa con un tasa de muertes por cáncer del 18.8%. Sin embargo, un hecho llamativo es la población HER2-HER3 expresión moderada con un porcentaje de muertes por cáncer del 0%, pese a no haberse evidenciado diferencias en factores de mal pronóstico como el estadiaje o la invasión linfovascular o perineural.

Tras el análisis de la SG de esta primera clasificación y, con el objetivo de confirmar los hallazgos obtenidos, procedimos al análisis de la SG en función de los 6 subgrupos de la segunda clasificación. Identificamos que la positividad de HER2 y/o HER3 se asoció con un mayor porcentaje de SG en comparación con la población

HER negativa, a excepción del subgrupo HER2 expresión moderada-HER3 positivo que, como ya describimos en la primera clasificación, no presentó ninguna muerte por carcinoma gástrico o de la UGE. Así, los subgrupos con sobreexpresión de HER2 aislada, ya fuese HER2 expresión moderada no amplificada o amplificación de HER2, sin coexpresión de HER3 presentaron las mayores tasas de muerte por cáncer, en torno al 44-50%; mientras que aquellos con coexpresión de ambos receptores, ya fuesen HER2-HER3 positivos o HER2 negativos-HER3 positivos, presentaban unos porcentajes intermedios, situados en torno al 30-33% de los pacientes; frente al 15% de los pacientes HER negativos.

Estos resultados confirmarían el impacto pronóstico del estatus de HER2 y HER3, así como de la relación entre ambos receptores. Así, mientras que en lo referente a HER2, dichos resultados vienen a ratificar su impacto en SG; en relación a HER3, observamos resultados muy interesantes, ya que, a diferencia de cuando analizamos el impacto de HER3 per se, el cual carece de asociación con la SG, el estatus de HER3 en función de su relación con HER2 si posee importancia en el pronóstico de dichos pacientes, ya que según los resultados de nuestra serie HER3 modularía el impacto pronóstico de HER2.

Otro hecho interesante, es el subgrupo de pacientes con expresión moderada pero sin criterios de positividad de HER2 que, según el algoritmo clásico para determinación de HER2 deberían clasificarse como HER2 negativos, pero que según nuestra serie poseen un pronóstico similar a la población HER2 positiva.

En base a los hallazgos de nuestro estudio, creemos que debería crearse un nuevo algoritmo de determinación, que incluyese el estatus de los receptores HER2 y HER3, y que los clasificase en las 6 categorías anteriormente descritas. Además dicha clasificación, así como sus implicaciones, ya sean pronósticas o predictivas, deberían ser validadas en estudios prospectivos.

Así, en lo referente al impacto pronóstico, dicha clasificación podría ayudarnos a estratificar a los pacientes en 3 categorías en función del riesgo de recurrencia; de alto riesgo, si presentaba sobreexpresión de HER2 aislada; de riesgo intermedio si presentaba coexpresión de HER2 y HER3; y bajo riesgo si se trataba de la población HER negativa. En lo referente a HER2-HER3 expresión moderada creemos que su impacto pronóstico debería ser validado en una nueva serie prospectiva.

Por otra parte, en lo referente al impacto predictivo de dicha clasificación, esta nos ayudaría a orientar la mejor estrategia de tratamiento para nuestros pacientes. Así, en población con sobreexpresión de HER2 aislada, el tratamiento de elección podría ser una combinación de quimioterapia y fármacos antiHER2. Sin embargo, en los pacientes con coexpresión HER2-HER3, dado que poseemos fármacos que presentan no solo actividad frente a HER2 sino también frente a la dimerización HER2-HER3, como Pertuzumab, la combinación de terapia antiHER2 y con actividad frente a la dimerización HER2-HER3 con quimioterapia podría ser la estrategia de elección. Sin embargo, dichas estrategias de tratamiento carecerían de utilidad en la población HER negativa, donde deberían buscarse nuevas dianas moleculares.

Para poder confirmar dicha hipótesis, deberían llevarse a cabo estudios para conocer el estatus de HER3, tanto en lo referente al análisis de estudios retrospectivos en enfermedad avanzada, como el TOGA, como en enfermedad localizada, en los estudios ya comunicados como NEOHX o HER-FLOT; así como en los estudios en marcha como INNOVATION o PETRARCA, ya que podrían ser de utilidad a la hora de determinar la importancia predictiva de dicho receptor.

Así mismo, en lo referente a la población con expresión moderada sin criterios de positividad de HER2, con o sin presencia de HER3 concomitante, considerada clásicamente como HER2 negativa, sería interesante testar el papel de la terapia antiHER2 y con actividad contra la dimerización HER2-HER3, en base al comportamiento diferenciado identificado en nuestro estudio en comparación con la población HER negativa¹³⁶⁻¹³⁹.



Conclusiones



Conclusión 1: Hemos observado la presencia de sobreexpresión y amplificación de HER2 en población occidental europea resecada. Además ha sido identificada una asociación significativa entre la expresión proteica y la amplificación génica, con una concordancia del 100% en población con expresión positiva o negativa y de un 33% en población equívoca.

Conclusión 2: Se confirma la validez del algoritmo de determinación de HER2 en enfermedad avanzada para su aplicación en enfermedad resecada, en el que las técnicas de IHC son de primera elección y se reservan las técnicas de hibridación, como el DuoCISH, para los pacientes con expresión moderada o equivocada por IHC, minimizando los costes y el tiempo para la determinación.

Conclusión 3: Hemos identificado la asociación entre la positividad de HER2 y determinados parámetros clinicopatológicos clásicos, observándose que todos los pacientes se corresponden con el subtipo intestinal de Lauren y más de un 90% presentan tumores bien o moderadamente diferenciados.

Conclusión 4: Hemos demostrado que la positividad de HER2 se asocia con un peor pronóstico en el adenocarcinoma gástrico o de la UGE resecado en población occidental europea.

Conclusión 5: La positividad de HER2 define la evolución de un subgrupo de tumores gástricos o de la UGE, no previamente identificados, caracterizados por la

diseminación ganglionar precoz, en tumores confinados a la capa muscular, y la metastatización a distancia, sin presencia de recidiva locorregional concomitante.

Conclusión 6: Hemos identificado la presencia de sobreexpresión de HER3 en carcinomas gástricos o de la UGE en población occidental reseca.

Conclusión 7: Hemos hallado una relación entre el grado de diferenciación y el estatus de HER3, observándose que el 75% de los pacientes HER3 positivos presentan tumores bien o moderadamente diferenciados.

Conclusión 8: HER3 no ha mostrado impacto pronóstico ni influencia en la tasa o el patrón de recurrencia de la enfermedad.

Conclusión 9: Hemos definido un nuevo algoritmo para estratificar a los pacientes en 6 categorías en función del estatus de HER2 y HER3, con implicaciones pronósticas.

Conclusión 10: La presencia de sobreexpresión de HER2 aislada, se asocia con una mayor tasa de mortalidad, mientras que los pacientes con sobreexpresión de HER3, ya sea aislada o concomitante con HER2, presentan una mortalidad intermedia entre la población HER2 y la población HER negativa.

Conclusión 11: La sobreexpresión de HER3 modula el impacto pronóstico de HER2 en el carcinoma gástrico o de la UGE.





Bibliografía



1. IARC. IA for R on CWHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *Globocan*. 2012. doi:10.1002/ijc.27711.
2. Kampschöer GH, et al. Changing patterns in gastric adenocarcinoma. *Br J Surg*. 1989;76(9):914-916.
3. Powell J, et al. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *Br J Cancer*. 1990;62(3):440-443.
4. Coggon D, et al. Stomach cancer and food storage. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81(15):1178-1182.
5. La Vecchia C, et al. Electric refrigerator use and gastric cancer risk. *Br J Cancer*. 1990;62(1):136-137.
6. Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015. doi:10.1002/ijc.29210.
7. Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
8. Ferlay J, et al. Las Cifras del Cáncer en España 2014. *Soc Española Oncol Médica*. 2014.

9. Van der Post RS, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet.* 2015;52(6):361-374.

10. Fitzgerald RC, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet.* 2010;47(7):436-444.

11. Guilford P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* 1998;392(6674):402-405.

12. Bornschein J, et al. H. pylori Infection Is a Key Risk Factor for Proximal Gastric Cancer. *Dig Dis Sci.* 2010;55(11):3124-3131.

13. Wang F, et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 2014;345(2):196-202.

14. Bass AJ, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517).

15. Kono S, et al. Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes Control.* 1996;7(1):41-55.

16. Joossens J V, et al. Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol*. 1996;25(3):494-504.

17. Shikata K, et al. A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J cancer*. 2006;119(1):196-201.

18. Peleteiro B, et al. Salt intake and gastric cancer risk according to *Helicobacter pylori* infection, smoking, tumour site and histological type. *Br J Cancer*. 2011;104(1):198-207.

19. Park B, et al. Ecological study for refrigerator use, salt, vegetable, and fruit intakes, and gastric cancer. *Cancer Causes Control*. 2011;22(11):1497-1502.

20. Larsson SC, et al. Processed meat consumption and stomach cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(15):1078-1087.

21. Wang Q, et al. Consumption of fruit, but not vegetables, may reduce risk of gastric cancer: results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer*. 2014;50(8):1498-1509.

22. González CA, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2003;107(4):629-634.

23. Barstad B, et al. Intake of wine, beer and spirits and risk of gastric cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2005;14(3):239-243.

24. Rüdiger Siewert J, et al. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: results of surgical therapy based on anatomical/topographic classification in 1,002 consecutive patients. *Ann Surg*. 2000;232(3):353-361.

25. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(12):3077-3079.

26. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.

27. Bosman FT, et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition. In: *International Agency for Research on Cancer*. Vol 3. ; 2010:417.

28. Mocellin S, et al. Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasonography (EUS) for the preoperative locoregional staging of primary gastric cancer. *Cochrane database Syst Rev*. 2015;(2):CD009944.

29. Altini C, et al. 18F-FDG PET/CT role in staging of gastric carcinomas: comparison with conventional contrast enhancement computed tomography. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(20):e864.

30. Stahl A, et al. FDG PET imaging of locally advanced gastric carcinomas: correlation with endoscopic and histopathological findings. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30(2):288-295.

31. Mezhir JJ, et al. Positive peritoneal cytology in patients with gastric cancer: natural history and outcome of 291 patients. *Indian J Surg Oncol*. 2011;2(1):16-23.

32. Kattan MW, et al. Postoperative Nomogram for Disease-Specific Survival After an R0 Resection for Gastric Carcinoma. *J Clin Oncol*. 21:3647-3650.

33. Novotny AR, et al. Predicting individual survival after gastric cancer resection: validation of a U.S.-derived nomogram at a single high-volume center in Europe. *Ann Surg*. 2006;243(1):74-81.

34. Peeters KCMJ, et al. Validation of a nomogram for predicting disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. *Cancer*. 2005;103(4):702-707.

35. Bozzetti F, et al. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg.* 1999;230(2):170-178.

36. Ito H, et al. Adenocarcinoma of the gastric cardia: What is the optimal surgical approach? *J Am Coll Surg.* 2004;199(6):880-886.

37. Yu W, et al. Randomized clinical trial of splenectomy versus splenic preservation in patients with proximal gastric cancer. *Br J Surg.* 2006;93(5):559-563.

38. Soetikno R, et al. Endoscopic Mucosal Resection for Early Cancers of the Upper Gastrointestinal Tract. *J Clin Oncol.* 2005;23(20):4490-4498.

39. Schwarz RE, et al. Clinical impact of lymphadenectomy extent in resectable gastric cancer of advanced stage. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(2):317-328.

40. Biondi A, et al. Does a minimum number of 16 retrieved nodes affect survival in curatively resected gastric cancer? *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(6):779-786.

41. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition -. *Gastric Cancer.* 1998;1(1):10-24.

42. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*. 2011;14(2):101-112.

43. Hartgrink HH, et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(11):2069-2077.42. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*. 2011;14(2):101-112.

44. Songun I, et al. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(5):439-449.

45. Cuschieri A, et al. Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group. *Br J Cancer*. 1999;79(9-10):1522-1530.

46. Sierra A, et al. Role of the extended lymphadenectomy in gastric cancer surgery: experience in a single institution. *Ann Surg Oncol*. 2003;10(3):219-226.

47. Degiuli M, et al. Morbidity and mortality in the Italian Gastric Cancer Study Group randomized clinical trial of D1 versus D2 resection for gastric cancer. *Br J Surg*. 2010;97(5):643-649.

48. Degiuli M, et al. Randomized clinical trial comparing survival after D1 or D2 gastrectomy for gastric cancer. *Br J Surg*. 2014;101(2):23-31.

49. Seevaratnam R, et al. A meta-analysis of D1 versus D2 lymph node dissection. *Gastric Cancer*. 2012;15(S1):60-69.

50. Macdonald JS, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med*. 2001;345(10):725-730.

51. Lee J, et al. Phase III trial comparing capecitabine plus cisplatin versus capecitabine plus cisplatin with concurrent capecitabine radiotherapy in completely resected gastric cancer with D2 lymph node dissection: the ARTIST trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):268-273.

52. Dikken JL, et al. Neo-adjuvant chemotherapy followed by surgery and chemotherapy or by surgery and chemoradiotherapy for patients with resectable gastric cancer (CRITICS). *BMC Cancer*. 2011;11:329.

53. Sakuramoto S, et al. Adjuvant Chemotherapy for Gastric Cancer with S-1, an Oral Fluoropyrimidine. *N Engl J Med*. 2007;357(18):1810-1820.

54. Ychou M, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(13):1715-1721.

55. Noh SH, et al. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):1389-1396.

56. Smalley SR, et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol*. 2012;30(19):2327-2333.

57. Martínez-Lago N, et al. Adjuvant treatment with infusional 5-fluorouracil in high risk adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(11):856-861.

58. Cunningham D, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(1):11-20.

59. Sasako M, et al. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4387-4393.

60. Wagner AD, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. In: Wagner AD, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2010:CD004064.

61. Glimelius B, et al. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 1997;8:163-168.

62. MacDonald JS, et al. 5-Fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin (FAM) combination chemotherapy for advanced gastric cancer. *Ann Intern Med*. 1980;93(4):533-536.

63. Cullinan SA, et al. A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin. *JAMA*. 1985;253(14):2061-2067.

64. Wils JA, et al. Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin--a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 1991;9(5):827-831.

65. Webb A, et al. Randomized trial comparing epirubicin, cisplatin, and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol.* 1997;15(1):261-267.

66. GASTRIC (Global Advanced/Adjuvant Stomach Tumor Research International Collaboration) Group, et al. Role of chemotherapy for advanced/recurrent gastric cancer: An individual-patient-data meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013;49(7):1565-1577.

67. Al-Batran S-E, et al. Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol.* 2008;26(9):1435-1442.

68. Cunningham D, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(1):36-46.

69. Ryu M-H, et al. ML17032 trial: capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in advanced gastric cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(12):1745-1751.

70. Van Cutsem E, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(31):4991-4997.

71. Dank M, et al. Randomized phase III study comparing irinotecan combined with 5-fluorouracil and folinic acid to cisplatin combined with 5-fluorouracil in chemotherapy naive patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Ann Oncol.* 2008;19(8):1450-1457.

72. Guimbaud R, et al. Prospective, Randomized, Multicenter, Phase III Study of Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Versus Epirubicin, Cisplatin, and Capecitabine in Advanced Gastric Adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3520-3526.

73. Lordick F, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):490-499.

74. Waddell T, et al. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):481-489.

75. Bang Y-J, 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(9742):687-697.

76. Hecht JR, et al. Lapatinib in Combination With Capecitabine Plus Oxaliplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Advanced or Metastatic Gastric, Esophageal, or Gastroesophageal Adenocarcinoma: TRIO-013/LOGiC--A Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(5):443-451.

77. Van Cutsem E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2119-2127.

78. Shah MA, et al. METGastric: A phase III study of onartuzumab plus mFOLFOX6 in patients with metastatic HER2-negative (HER2-) and MET-positive (MET+) adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction (GEC). *ASCO Meet Abstr*. 2015;33(15_suppl):4012.

79. Iveson T, et al. 6504 ORAL Safety and Efficacy of Epirubicin, Cisplatin, and Capecitabine (ECX) Plus Rilotumumab (R) as First-line Treatment for Unresectable Locally Advanced (LA) or Metastatic (M) Gastric or Esophagogastric Junction (EGJ) Adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2011;47:S443.

80. Thuss-Patience PC, et al. Survival advantage for irinotecan versus best supportive care as second-line chemotherapy in gastric cancer--a randomised phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Eur J Cancer*. 2011;47(15):2306-2314.

81. Ford HER, et al. Docetaxel versus active symptom control for refractory oesophagogastric adenocarcinoma (COUGAR-02): an open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):78-86.

82. Kang JH, et al. Salvage Chemotherapy for Pretreated Gastric Cancer: A Randomized Phase III Trial Comparing Chemotherapy Plus Best Supportive Care With Best Supportive Care Alone. *J Clin Oncol.* 2012;30(13):1513-1518.

83. Wilke H, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1224-1235.

84. Fuchs CS, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2014;383(9911):31-39.

85. Riese DJ, et al. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays.* 1998;20(1):41-48.

86. Guy PM, et al. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(17):8132-8136.

87. Olayioye MA, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000;19(13):3159-3167.
88. Yarden Y, et al. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127-137.
89. Burgess AW, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003;12(3):541-552.
90. Hynes NE, et al. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):341-354.
91. Prenzel N, et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(1):11-31.
92. Salomon DS, et al. The erbB family of receptors and their ligands: multiple targets for therapy. 2001. <https://kar.kent.ac.uk/22657/>.
93. Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. *Oncologist.* 2003;8 Suppl 3:5-17.

94. Shepard HM, et al. Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3574-3581.

95. Fornaro L, et al. Anti-HER agents in gastric cancer: from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(7):369-383.

96. Dawood S, et al. Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):92-98.

97. Harris CA, et al. The efficacy of HER2-targeted agents in metastatic breast cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol.* 2011;22(6):1308-1317.

98. Park D II, et al. HER-2/neu Amplification Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer. *Dig Dis Sci.* 2006;51(8):1371-1379.

99. Kennecke H, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3271-3277.

100. Spears M, et al. In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein-protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2):463-470.

101. Fukushige S, et al. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol.* 1986;6(3):955-958.

102. Grávalos C, et al. Phase II study of trastuzumab and cisplatin as first-line therapy in patients with HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(3):179-184.

103. Hofmann M, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology.* 2008;52(7):797-805.

104. Bang Y-J, 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(9742):687-697.

105. Gordon M, et al. Assessment of HER2 gene amplification in adenocarcinomas of the stomach or gastroesophageal junction in the INT-0116/SWOG9008 clinical trial. *Ann Oncol.* 2013;24(7):1754-1761.

106. Okines AFC, et al. Effect of HER2 on prognosis and benefit from peri-operative chemotherapy in early oesophago-gastric adenocarcinoma in the MAGIC trial. *Ann Oncol.* 2013;24(5):1253-1261.

107. Liang JW, et al. Clinicopathological and prognostic significance of HER2 overexpression in gastric cancer: A meta-analysis of the literature. *Tumor Biol.* 2014;35(5):4849-4858.

108. Gravalos C, et al. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.* 2008;19(9):1523-1529.

109. Lordick F, et al. 3541 POSTER HER2-positive advanced gastric cancer: similar HER2-positivity levels to breast cancer. *Eur J Cancer Suppl.* 2007;5(4):272.

110. Tateishi M, et al. Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol.* 1992;49(4):209-212.

111. Sasano H, et al. Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol.* 1993;24(6):584-589.

112. Uchino S, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer.* 1993;72(11):3179-3184.

113. Mizutani T, et al. Relationship of C-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer.* 1993;72(7):2083-2088.

114. Nakajima M, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 1999;85(9):1894-1902.

115. Tanner M, 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(2):273-278.

116. Grabsch H, et al. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol*. 2010;32(1-2):57-65.

117. Hayashi M, et al. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7843-7849.

118. Zhang XL, et al. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg*. 2009;33(10):2112-2118.

119. Wu X, et al. Her3 is associated with poor survival of gastric adenocarcinoma: Her3 promotes proliferation, survival and migration of human gastric cancer mediated by PI3K/AKT signaling pathway. *Med Oncol*. 2014;31(4):903.

120. Tang D, et al. Assessment and prognostic analysis of EGFR, HER2, and HER3 protein expression in surgically resected gastric adenocarcinomas. *Oncotargets Ther.* 2015;8:7-14.

121. He XX, et al. Protein expression of HER2, 3, 4 in gastric cancer: correlation with clinical features and survival. *J Clin Pathol.* 2015;68(5):374-380.

122. Cao G, et al. HER3, but Not HER4, Plays an Essential Role in the Clinicopathology and Prognosis of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161219.

123. Begnami MD, et al. Prognostic Implications of Altered Human Epidermal Growth Factor Receptors (HERs) in Gastric Carcinomas: HER2 and HER3 Are Predictors of Poor Outcome. *J Clin Oncol.* 2011;29(22):3030-3036.

124. Kute T, et al. Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry.* 2004;57A(2):86-93.

125. Wainberg ZA, 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(5):1509-1519.

126. Franklin MC, et al. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell.* 2004;5(4):317-328.

127. Scheuer W, et al. Strongly Enhanced Antitumor Activity of Trastuzumab and Pertuzumab Combination Treatment on HER2-Positive Human Xenograft Tumor Models. *Cancer Res.* 2009;69(24):9330-9336.

128. Lewis Phillips GD, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 2008;68(22):9280-9290.

129. Junttila TT, et al. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):347-356.

130. Kalous O, et al. Dacomitinib (PF-00299804), an Irreversible Pan-HER Inhibitor, Inhibits Proliferation of HER2-Amplified Breast Cancer Cell Lines Resistant to Trastuzumab and Lapatinib. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(9):1978-1987.

131. Cortes-Funes H, et al. Phase II of trastuzumab and cisplatin in patients (pts) with advanced gastric cancer (AGC) with HER2/neu overexpression/amplification. *ASCO Meet Abstr.* 2007;25(18_suppl):4613.

132. Tabernero J, et al. Pertuzumab (P) with trastuzumab (T) and chemotherapy (CTX) in patients (pts) with HER2-positive metastatic gastric or gastroesophageal junction (GEJ) cancer: An international phase III study (JACOB). *ASCO Meet Abstr.* 2013;31(15_suppl):TPS4150.

133. Fuchs CS, et al. Biomarker analyses in REGARD gastric/GEJ carcinoma patients treated with VEGFR2-targeted antibody ramucirumab. *Br J Cancer*. 2016;115(8):974-982.

134. Satoh T, et al. Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations: TyTAN - A randomized, phase III study. *J Clin Oncol*. 2014;32(19):2039-2049.

135. Al-Shamsi HO, et al. Continuation of trastuzumab beyond disease progression in HER2-positive metastatic gastric cancer: the MD Anderson experience. *J Gastrointest Oncol*. 2016;7(4):499-505.

136. Rivera F, et al. NEOHX study: Perioperative treatment with trastuzumab in combination with capecitabine and oxaliplatin (XELOX-T) in patients with HER-2 resectable stomach or esophagogastric junction (EGJ) adenocarcinoma—18 m DFS analysis. *In: J Clin Oncol*. 2015;33:abstr 107.

137. Hofheinz R, et al. HERFLOT: Trastuzumab in combination with FLOT as perioperative treatment for patients with HER2positive locally advanced esophagogastric adenocarcinoma: A phase II trial of the AIO Gastric Cancer Study Group. *In: J Clin Oncol*. 2014;32:abstr4073.

138. Wagner AD, et al. EORTC-1203: Integration of trastuzumab (T), with or without pertuzumab (P), into perioperative chemotherapy (CT) of HER-2 positive stomach cancer—INNOVATION trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(15): suppl.TPS4133.

139. Hofheinz R, et al. Perioperative trastuzumab and pertuzumab in combination with FLOT versus FLOT alone for HER2 positive resectable esophagogastric adenocarcinoma: Petrarca—A phase II trial of the German AIO. *J Clin Oncol.* 2017;35(15):suppl.TPS4133

140. Rüschoff J, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol.* 2012;25(5):637-650.

141. López-Ríos F, et al. Consenso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) sobre la determinación de HER2 en el carcinoma gástrico. *Rev Esp Patol.* 2011;44(1):32-48.

142. Bartley AN, et al. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2017;35(4):446-464

143. García-Caballero T, et al. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: A European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology*. 2010;56(4):472-480.

144. Karimi P, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(5):700-713.

145. Gomez-Martin C, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4445-4452.

146. Kennecke H, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3271-3277.

147. Chen T, et al. Emerging molecular classifications and therapeutic implications for gastric cancer. *Chin J Cancer*. 2016;35(1):49.





