



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

---

**HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ**

**INMUNOEXPRESIÓN DE HER2/NEU EN EL CARCINOMA PAPILAR  
UROTELIAL DE VEJIGA SEGÚN SU GRADO HISTOLÓGICO.**

**TESIS**

**“QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA  
PATOLÓGICA PRESENTA:**

**MONTSERRAT REYES MACEDO**

**ASESOR**

**DR. ISAÍAS ESTRADA MOSCOSO**

**MÉDICO ADSCRITO A LA DIVISIÓN DE ANATOMÍA PATOLÓGICA  
DEL HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ**

**MÉXICO D.F. AGOSTO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

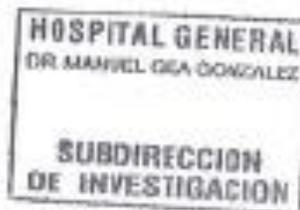
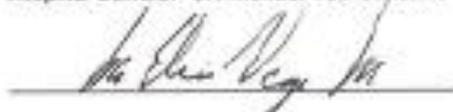
**Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, en la División de Anatomía Patológica bajo la dirección del Dr. Isaías Estrada Moscoso.**

**Este trabajo de Tesis con No. PROT 01-32-2014, presentado por la alumna Montserrat Reyes Macedo se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Isaías Estrada Moscoso, con fecha del 5 de Agosto del 2014 para su impresión final.**

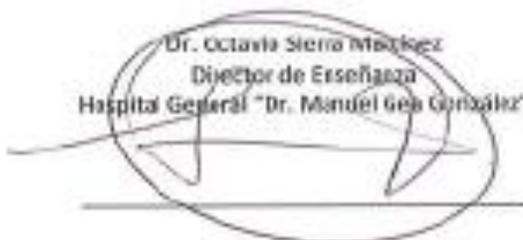
**Tutor principal: Dr. Isaías Estrada Moscoso.**

**AUTORIZACIONES**

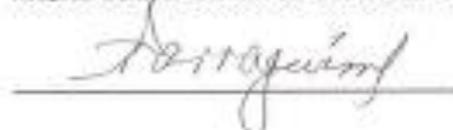
Dra. María Elisa Vega Nemije  
Subdirección de Investigación  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



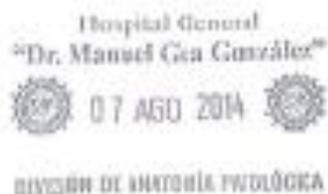
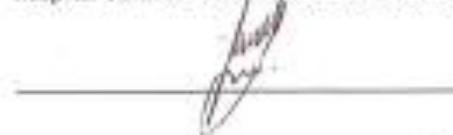
Dr. Octavio Sierra Martínez  
Director de Enseñanza  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dra. Sara Parraguire Martínez  
Jefa de la División de Anatomía Patológica  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dr. Isaias Estrada Moscoso  
Médico adscrito de la División de Anatomía Patológica  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



**INMUNOEXPRESIÓN DE HER2/NEU EN EL CARCINOMA PAPILAR  
UROTelial DE VEJIGA SEGÚN SU GRADO HISTOLÓGICO.**

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| Glosario .....                            | 7  |
| Relación de figuras y tablas .....        | 8  |
| Resumen .....                             | 9  |
| Abstract .....                            | 10 |
| 1. Introducción.....                      | 11 |
| 2. Antecedentes .....                     | 12 |
| 3. Justificación.....                     | 15 |
| 4. Objetivos .....                        | 16 |
| 4.1. Objetivo General                     |    |
| 4.2. Objetivos Particulares               |    |
| 5. Material y Métodos .....               | 17 |
| 5.1. Tipo de estudio                      |    |
| 5.2. Ubicación temporal y espacial        |    |
| 5.3. Criterios de selección de la muestra |    |
| 5.4. Variables                            |    |
| 5.5. Tamaño de la muestra                 |    |
| 5.6. Procedimiento                        |    |
| 5.7. Análisis estadístico                 |    |
| 5.8. Descripción operativa del estudio    |    |
| 6. Resultados .....                       | 21 |
| 7. Discusión.....                         | 25 |
| 8. Conclusiones.....                      | 27 |
| 9. Perspectivas.....                      | 28 |
| 10. Bibliografía .....                    | 29 |
| 11. Anexos .....                          | 30 |

## GLOSARIO

**Carcinoma papilar urotelial de vejiga:** neoplasia maligna de estirpe epitelial de la vejiga urinaria, que se origina del epitelio transicional y en la que la conformación del tumor es papilar.

**Grado histológico:** la gradación de un cáncer se basa en el grado de diferenciación de las células tumorales y en algunos cánceres en el número de mitosis, características arquitecturales, porcentaje de necrosis tumoral, entre otras características.

**Her2/neu:** gen del receptor humano de crecimiento epidérmico-2 (Her 2/ neu, también conocido como ERB2 y HER 2). El gen ERB2 (HER 2) fue llamado originalmente NEU, al identificarse en líneas celulares de glioblastomas de ratas. Coussens y cols lo llamaron HER2 porque su secuencia primaria era similar a la del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o ERBB o ERBB1). Di Fiore y cols indicaron que NEU y HER2 eran lo mismo que ERBB2.

**Inmunohistoquímica:** es un procedimiento en histopatología, que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina.

**Inmunoexpresión de Her2/neu:** los resultados de inmunohistoquímica de Her-2/neu se reportan como 0, 1+, 2+ y 3+; se evalúan dos aspectos en la membrana citoplasmica de las células neoplásicas: la intensidad (ausente, leve, moderada o intensa) y si está completa (circunferencial) o incompleta.

## RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

### **GRÁFICA 1:**

Proporción de casos de carcinoma papilar urotelial según su grado histológico.

### **GRAFICO 2:**

Relación del grado histológico con la invasión al músculo detrusor.

### **GRÁFICO 3:**

Resultados de inmunohistoquímica de Her-2/neu.

### **TABLA 1:**

Resultados generales obtenidos en el estudio.

## RESUMEN

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Inmunoexpresión de Her2/neu en el carcinoma papilar urotelial de vejiga según su grado histológico.

**INVESTIGADORES:** Dr. Isaías Estrada; Dra. Montserrat Reyes.

**INTRODUCCIÓN:** En México el carcinoma urotelial representa el 2.2% de las neoplasias malignas con 3, 245 casos por cada cien mil habitantes. En el servicio de Anatomía Patológica de esta unidad hospitalaria gran parte de las biopsias y especímenes de resección por cáncer de vejiga, corresponden con este diagnóstico; del año 2009 al 2013 se registraron 67 casos. La sobreexpresión de Her-2 neu en los carcinomas uroteliales papilares de la vejiga urinaria ha mostrado en algunos estudios ser un predictor de recidiva, de un comportamiento invasor y agresivo.

**OBJETIVO GENERAL:** Evaluar la inmunoexpresión de Her2/neu en el carcinoma urotelial según su grado histológico.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** se estudiaron cuarenta y cinco casos del periodo de 1° de Enero del 2009 al 31 de Diciembre del 2013, con diagnóstico de carcinoma papilar urotelial de vejiga de bajo y alto grado, con o sin invasión al músculo detrusor. Se hicieron arreglos de tejido con sacabocado de 3mm e inmunohistoquímica para Her-2 neu con anticuerpo de la marca Dako R.

**RESULTADOS:** treinta y dos casos fueron de alto grado histológico, trece de ellos con invasión al músculo detrusor; hubo trece de bajo grado, ninguno invasor. Del total de casos ninguno fue positivo 3 +, treinta y ocho fueron negativos 0 (84.4 %), tres negativos 1+ (6.6 %) y cuatro indeterminados 2 + (8.88 %).

**CONCLUSIÓN:** Se evaluó la inmunoexpresión de Her2/neu en el carcinoma urotelial según su grado histológico; sin embargo ninguno de los casos fue positivo como en la literatura estudiada. Se conoció el número de casos de carcinoma urotelial que presentaron invasión al músculo detrusor. La realización de Her 2/neu no aportó información útil, que colabore a un mejor tratamiento y seguimiento del paciente; por lo que no se sugiere su uso en nuestra división.

## **ABSTRACT**

**PROJECT TITLE:** Immunoexpression HER2/neu in papillary urothelial bladder carcinoma by histologic grade.

**INVESTIGATORS:** Dr. Isaias Estrada; Dr. Montserrat Reyes.

**INTRODUCTION:** In Mexico urothelial carcinoma represents 2.2% of malignant neoplasms with 3, 245 cases per one hundred thousand inhabitants. The Pathology Service of this hospital unit much of biopsies and resection specimens of bladder cancer, following this diagnosis; 2009 to 2013 67 cases were recorded. Overexpression of Her-2 neu in papillary urothelial carcinomas of the urinary bladder has been shown in some studies to be a predictor of residue, an invasive and aggressive behavior.

**GENERAL OBJECTIVE:** To assess HER2/neu immunoexpression in urothelial carcinoma by histologic grade.

**MATERIAL AND METHODS:** forty-five cases in the period from 1 January 2009 to 31 December 2013 were studied, diagnosed with papillary urothelial bladder carcinoma of low and high grade, with or without invasion of the detrusor muscle. Tissue arrangements were made with 3mm punch and immunohistochemistry for Her-2 neu antibody Dako brand R.

**RESULTS:** thirty-two cases were of high histological grade, thirteen of them invading the detrusor muscle; There were thirteen low-grade invasive none. Of the total cases none were positive 3 +, thirty-eight were negative 0 (84.4%), three negative 1 + (6.6%) and four indeterminate 2 + (8.88%).

**CONCLUSION:** HER2/neu immunoexpression urothelial carcinoma was evaluated by histological grade; however none of the cases studied were positive and the literature studied. The number of cases of urothelial carcinoma presenting detrusor muscle invasion was known. Conducting Her2neu not I contribute useful information to work to better treatment and patient follow-up; therefore use in our division is not suggested.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se realizó un estudio descriptivo, abierto, prospectivo y transversal; cuyo objetivo fue evaluar la inmunoexpresión de Her2/neu en el carcinoma urotelial según su grado histológico; además de conocer el número de casos que presentaban invasión al músculo detrusor.

Del servicio de Anatomía Patológica de esta unidad hospitalaria en el periodo comprendido de enero de 2009 al diciembre de 2013 se registraron sesenta y siete casos con diagnóstico de carcinoma urotelial. Lo anterior nos permitió tener suficiente material para este estudio; aunque sólo cuarenta y cinco casos contaban con laminillas teñidas con hematoxilina/eosina y bloque de parafina con material suficiente para obtener el arreglo de tejido.

La sobreexpresión de Her2/ neu en los carcinomas uroteliales papilares de la vejiga urinaria ha mostrado en algunos estudios ser un predictor de recidiva y de la capacidad del tumor para invadir el músculo detrusor, que es determinante para el tipo de tratamiento que recibirá el paciente. Por ello nos interesó evaluar la expresión de este marcador en los casos del servicio de ser positivos, abre la posibilidad de que sea una herramienta de utilidad.

## 2. ANTECEDENTES

El carcinoma urotelial es el séptimo cáncer más común en el mundo, con 336000 nuevos casos cada año <sup>(1)</sup>, habiendo variaciones significativas en incidencia, morbilidad y mortalidad dependiendo del país y grupos étnicos.

Así mismo se sabe que es de dos a cinco veces más frecuente en hombres que en mujeres; lo anterior relacionado con los factores de riesgo, de los cuales se han descrito muchos, sin embargo es el tabaquismo el que más se asocia al desarrollo de carcinoma, con un riesgo de 3:1 respecto a fumadores y no fumadores; evidentemente también influyen el tiempo y la intensidad de consumo <sup>(2)</sup>. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual los carcinógenos del tabaco lesionan el epitelio urotelial se acepta que la acroleína-4, el bifenil-amino, arilamina y los radicales libres de oxígeno están implicados. Se ha visto que los pacientes con carcinoma urotelial que no interrumpen el hábito tabáquico tienen una peor sobrevida global y mayor recurrencia tumoral <sup>(3)</sup>.

La exposición laboral a tinturas de anilinas y aminas aromáticas como la 2-naftilamina y la bencidina, es el segundo factor de riesgo más importante y en países industrializados más de un 25% de los casos están relacionados con exposición laboral <sup>(4)</sup>.

Clínicamente la hematuria es el signo cardinal en la sospecha del carcinoma urotelial, aproximadamente un 20% de los pacientes con hematuria macroscópica tienen carcinoma urotelial y el 10% en los que es microscópica. También puede haber síntomas irritativos como urgencia urinaria, aumento de la frecuencia y disuria; síntomas que a menudo se confunden con una infección <sup>(5)</sup>.

El abordaje diagnóstico de los pacientes en los que se sospecha de carcinoma urotelial es necesaria la cistoureteroscopia y toma de biopsias del tumor, así como un mapeo vesical para.

Las posibilidades terapéuticas se establecen en base al estadio tumoral y van desde procedimientos conservadores como la resección transuretral del tumor y aplicación de BCG o cistectomía radical <sup>(6)</sup>.

El urólogo para determinar el estadio tumoral requiere varios datos del reporte de patología, tales como el grado histológico, la presencia o ausencia de invasión del tumor al musculo detrusor, el tamaño tumoral y presencia de metástasis ganglionares <sup>(7)</sup>.

Histológicamente el 90% de las neoplasias vesicales tienen diferenciación urotelial y aunque la presencia de otros tipos de epitelio hace posible la aparición de carcinomas epidermoides y adenocarcinomas, estos son infrecuentes. La clasificación de los tumores vesicales que se emplea es la de la Organización Mundial de la Salud del 2004 que gradifica el carcinoma papilar urotelial en bajo y alto.

El carcinoma papilar urotelial de bajo grado muestra papilas delgadas y ramificadas con variaciones en la polaridad nuclear; los núcleos están agrandados, son irregulares, su cromatina es vesicular y el nucléolo a veces es visible. Es frecuente la alteración en la inmunexpresión de CK 20, CD44, p53 y p63. Algunos tumores son diploides pero la regla es la aneuploidia. Las mutaciones de FGFR3 son vistas con la misma frecuencia que en las neoplasias uroteliales papilares no invasoras de bajo potencial maligno. Hasta un 22% de estos pacientes tienen más de dos tumores, la recurrencia es de hasta un 50% y la mortalidad es baja (5%) <sup>(1)</sup>.

Por otro lado el carcinoma urotelial de alto grado se caracteriza por la presencia de papilas con notable variación de su espesor, fusión de papilas y pérdida de la polaridad nuclear; se observa una marcada atipia citológica, núcleos pleomorficos con nucléolo prominente y numerosas mitosis. Es frecuente hallar carcinoma in situ en la mucosa adyacente e igual que en el de bajo grado hay alteración en la expresión de CK20, p53 y p63, así como aneuploidia. Las alteraciones moleculares incluyen sobreexpresión de p53, HER2 o EGRF y pérdida de p21Waf1 o p27kip1 también vistas en los carcinomas invasores.

Se han realizado numerosas investigaciones a fin de identificar y caracterizar el comportamiento biológico de los tumores de vejiga; el interés de predecir cual tumor recurrirá, progresará o dará metástasis ha llevado a una mejor comprensión y conocimiento de los patrones moleculares asociados con el carcinoma vesical. La búsqueda de nuevas formas de predecir la evolución de las neoplasias en fases iniciales ha conducido al desarrollo e incorporación de técnicas que expresan los cambios a niveles bioquímicos y cromosómicos de la célula, tales como la expresión de antígenos hepáticos de superficie, la concentración de ADN nuclear y sobreexpresión o amplificación de oncogenes (Her 2/ neu, ciclina D1), receptor de crecimiento epidérmico, delección de genes supresores o estimulantes de la división celular.

La diversidad clínico-patológica tiene una cierta analogía con los hallazgos cromosómicos, habiéndose detectado gran número de alteraciones genéticas que involucran varias regiones de diferentes cromosomas. En los tumores más agresivos prevalecen las alteraciones en el cromosoma 17, mientras que en los tumores papilares menos agresivos se detectan preferentemente pérdidas del brazo largo del cromosoma 9.

Las mutaciones del gen P53 son distintivas de los carcinomas infiltrantes (40-60%). El gen supresor TP53 localizado en el cromosoma 17q23, codifica una proteína que juega un importante papel en varios procesos celulares tales como regulación del ciclo celular, respuesta al daño del ADN, muerte celular y neovascularización <sup>(8, 9)</sup>.

El gen del receptor humano de crecimiento epidérmico-2 (Her 2/ neu, también conocido como ERB2 y HER 2) ha sido identificado como un predictor independiente de sobrevida en carcinomas papilares uroteliales de alto grado invasores. El gen ERB2 (HER 2) fue llamado originalmente NEU, al identificarse en líneas celulares de

glioblastomas de ratas. Coussens y cols lo llamaron HER2 porque su secuencia primaria era similar a la del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o ERBB o ERBB1). Di Fiore y cols indicaron que NEU y HER2 eran lo mismo que ERBB2. Aunque el principal uso de HER2/neu es en el carcinoma de mama por el enorme beneficio terapéutico que deriva del uso de trastuzumab en los tumores que son positivos, se está estudiando en otros tumores <sup>(10, 11)</sup>.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México el carcinoma urotelial representa 2.2% de las neoplasias malignas con 3245 casos por cada cien mil habitantes, es responsable de 1.5% de las defunciones por cáncer (1166 casos) y la sobrevivida a los cinco años es baja (2.6% de los casos) <sup>(15)</sup>.

En el servicio de Anatomía Patológica de esta unidad hospitalaria gran parte de las biopsias y especímenes de resección por cáncer de vejiga, corresponden a carcinoma papilar urotelial; si bien es cierto que se tienen casos de neoplasias no epiteliales del tracto urinario estos son los menos. Del año 2009 al 2013 se registraron 67 quirúrgicos con diagnóstico de carcinoma urotelial, por lo que es factible el estudio de este cáncer en nuestra unidad.

La sobreexpresión de Her2/ neu en los carcinomas uroteliales papilares de la vejiga urinaria ha mostrado en algunos estudios ser un predictor de recidiva y de la capacidad del tumor para invadir el músculo detrusor; por lo tanto tener un comportamiento biológico agresivo.

La importancia de evaluar la expresión de este marcador en los casos de nuestro servicio es comprobar si los carcinomas papilares uroteliales expresan Her-2/neu; de ser así y en base a los resultados de estudios previos, representaría una herramienta útil en la evaluación del material que recibimos.

Si bien es cierto que a lo largo de los años ningún marcador ha probado ser totalmente efectivo para predecir el comportamiento de los carcinomas uroteliales, este sigue siendo un esfuerzo válido.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la inmunexpresión de Her2/neu en el carcinoma urotelial según su grado histológico.

### **4.2. OBJETIVO PARTICULAR**

Conocer el número de casos de carcinoma urotelial que presenten invasión al músculo detrusor.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1. Tipo de Estudio

Se realizó un estudio descriptivo, abierto, prospectivo y transversal.

### 5.2. Ubicación Temporal y Espacial

Libretas de registro de biopsias de la División de Anatomía Patológica durante un periodo de cinco años.

### 5.3. Criterios de Selección de la Muestra

#### Criterios de Inclusión

Los casos debían contar con laminillas teñidas con hematoxilina/eosina y bloque de parafina con material suficiente para obtener arreglo de tejido de tres milímetros de diámetro.

#### Criterios de Eliminación

Se eliminaron del estudio los casos en los que se pierda el material en el proceso de arreglos de tejido.

### 5.4. Variables

| Variable                                       | Definición conceptual  | Escala de medición |
|--|--|--------------------|
| Carcinoma papilar urotelial                    | Bajo grado<br>Alto grado   | Nominal dicotómica |
| Invasión al músculo detrusor (muscular propia) | Ausente<br>Presente  | Nominal dicotómica |
| Inmunoexpresión de Her 2-neu                   | 0: sin expresión.<br>1+: expresión negativa<br>2+: expresión indeterminada<br>3+: sobreexpresión | Ordinal            |

### 5.5. Tamaño de la Muestra

Se evaluaron cuarenta y cinco casos.

## **5.6. Métodos de Laboratorio**

Los arreglos de tejido y la técnica de inmunohistoquímica se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del Manual de instrucciones técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* del laboratorio de patología molecular del Instituto Nacional de Pediatría. A continuación se exponen dichos procedimientos:

### **Procedimiento para la realización del arreglo de tejidos:**

- I. Se selecciona la zona representativa de la lesión o del testigo positivo tomando como referencia el corte histológico teñido con hematoxilina eosina (HE).
- II. Empleando un sacabocado dermatológico de 3 mm de diámetro, se toma el cilindro de tejido seleccionado
- III. Con la ayuda de un Combitps plus R (Eppendor-In touch with life) y agua corriente expulsar el cilindro de parafina del sacabocado dermatológico y la muestra se coloca en un contenedor de plástico.
- IV. El cilindro de parafina se coloca en un plano previamente elaborado para identificar la localización exacta de la muestra cuando se re-incluya con las demás.
- V. Los pasos anteriores (II, III y IV) se repiten con cada uno de los bloques seleccionados de los casos y/o controles positivos/negativos.
- VI. Estos cilindros obtenidos se re-incluyen nuevamente en un solo bloque de parafina en posición inversa horizontal al plano antes mencionado, el bloque puede contener de 5 a 30 muestras dependiendo de la habilidad para colocarlas y del tamaño del sacabocado.
- VII. Con el bloque de la técnica de arreglo de tejidos (TAT-INP) se obtienen cortes histológicos de 2  $\mu$  para las preparaciones histológicas para inmunohistoquímica.

### **Técnica de inmunohistoquímica:**

- I. Las preparaciones histológicas cortadas a 2  $\mu$ , son montadas en portaobjetos electrocargados, poli-l-lisina o silanizados. Los portaobjetos se identifican con el número de biopsia correspondiente y el anticuerpo Her-2 neu.
- II. En la parte superior de la laminilla se coloca la muestra histológica correspondiente a la biopsia que se va a procesar y en la parte inferior se coloca el corte histológico correspondiente a la biopsia (bloque de parafina) que funciona como testigo.
- III. Se procesa una laminilla extra con una muestra histológica correspondiente a cualquiera de las biopsias que se van a procesar en este momento, sin muestra histológica de testigo positivo, la cual va a funcionar como testigo negativo.

- IV. Las laminillas se colocan en una canastilla de acero inoxidable o de polipropileno de alta densidad y se colocan en la estufa a 60°C por un tiempo mínimo de 30 minutos hasta 24 horas, para difundir la parafina.
- V. Hidratación de las muestras histológicas: Una vez terminado el tiempo de fundir la parafina de los cortes histológico, se transfiere inmediatamente la canastilla con las laminillas de la estufa a un vaso de tinción con Xilol o mezcla de detergentes comerciales para eliminar la parafina de los cortes histológicos por 5 minutos. Al término de esta hidratación se transfieren los portaobjetos a unos vasos de coplin de polipropileno de alta densidad que contienen  $\frac{3}{4}$  partes de agua destilada (máximo 12 portaobjetos de manera transversal).
- VI. Recuperación de antígenos: el proceso de recuperación de antígenos tiene como finalidad modificar la estructura de las proteínas en sus diferentes formas (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) para exponer los determinantes antigénicos (epítopes) mediante el uso de soluciones químicas/calor o el empleo de una actividad enzimática, para que de esta manera el anticuerpo lleve a cabo la reacción iónica con el epítope, esta interacción entre más fuerte sea tiene como consecuencia mucho mejor afinidad y estabilidad de la reacción y por lo tanto mejores resultados de inmunotinción.
- VII. El proceso de recuperación de antígenos lo podemos dividir en dos subprocesos dependiendo de la estructura de la proteína que se desea modificar y estos pueden ser por desenmascaramiento de epítopes o digestión enzimática. El primero tiene como finalidad la alteración tridimensional de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas empleando una solución de citrato de sodio o de E.D.T.A., y la aplicación de calor y presión; mientras que la segunda tiene como blanco la modificación de la estructura primaria de las proteínas a través de la eliminación de secuencias repetidas de aminoácidos mediante la actividad enzimática con pepsina, tripsina o proteína K.
- VIII. Inhibición de la peroxidasa endógena con agua destilada decantada, agregando solución de peróxido de hidrógeno al 0.9% e incubación por 5 minutos, reciclando la solución y haciendo tres lavados. Se colocan las muestras por buffer sobre los coverplates (Thermo Shandon), montar estos sobre el bastidor (rack), este paso sirve para verificar que las laminillas fueron montadas correctamente sobre los coverplates, es decir, no hay generación de vacío en el capilar y no se escapa la solución.
- IX. Proceso de inmunotinción por capilaridad con el sistema Biotina-Estreptavidina/Peroxidasa (SBEP) y su detección.
- X. Revelado con 3,3 deaminobencidina (DAB).
- XI. Revelado y monitoreo de la reacción <sup>(16)</sup>.

### **5.7. Análisis Estadístico**

Se empleó estadística descriptiva: porcentajes para las variables de interés.

### **5.8. Descripción Operativa del Estudio**

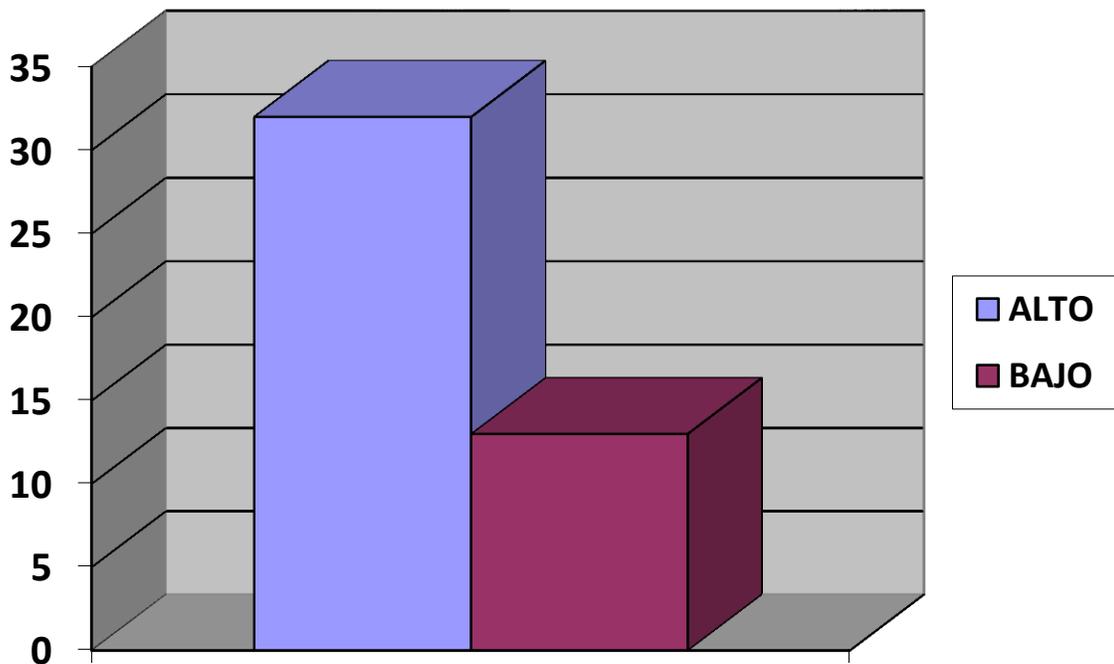
Del registro de la División de Anatomía Patológica del Hospital General Dr. Manuel Gea González se eligieron los reportes con diagnóstico de carcinoma papilar urotelial de vejiga de bajo y alto grado, con o sin invasión al músculo detrusor, en biopsias transuretrales de vejiga y productos de cistectomías parciales o totales del 1° de Enero del 2009 al 31 de Diciembre del 2013.

Posteriormente se evaluaron las laminillas teñidas en HE y se eligieron para el estudio aquellos casos que tuvieron bloque de parafina con material suficiente para el arreglo de tejido con sacabocado de 3mm. A los arreglos de tejido se les realizó inmunohistoquímica de Her-2 neu con anticuerpo de marca Dako r.

## 6. RESULTADOS

Se evaluaron cuarenta y cinco casos con diagnóstico de carcinoma papilar urotelial, de los cuales treinta y dos fueron de alto grado histológico y trece de bajo grado. Del total de casos el 77.7 % (35 casos) fueron en el sexo masculino y el restante 22.2 % (10 casos) en el femenino.

La media global de edad al momento del diagnóstico en hombres fue de 65 años y de 71.5 años en mujeres.

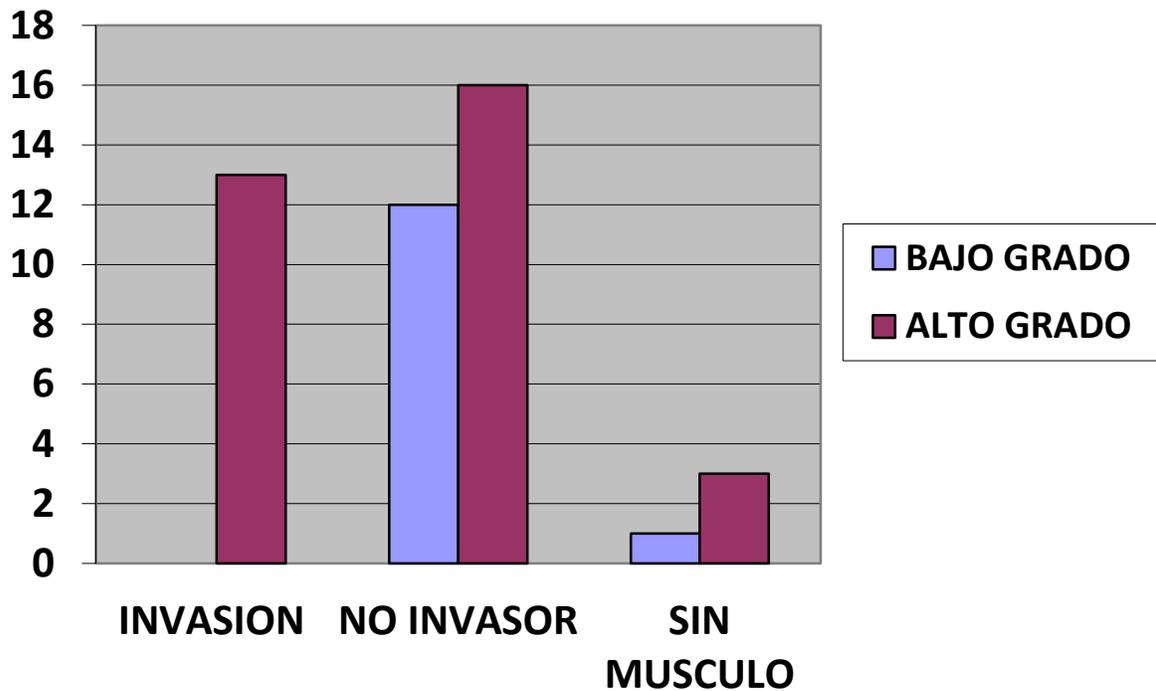


**GRÁFICO 1. Proporción de casos de carcinoma papilar urotelial según su grado histológico.**

De los treinta y dos casos de alto grado histológico, trece tuvieron invasión al músculo detrusor; dieciséis eran no invasivos, sólo se limitaban a la capa mucosa y en tres casos las biopsias no tenían músculo para evaluar este aspecto.

Cabe mencionar que once de los casos de carcinoma invasor fueron en hombres y sólo dos en mujeres.

De los trece casos de bajo grado histológico, en doce se documentó ausencia de invasión y en un caso la biopsia no tenía músculo para evaluarla.

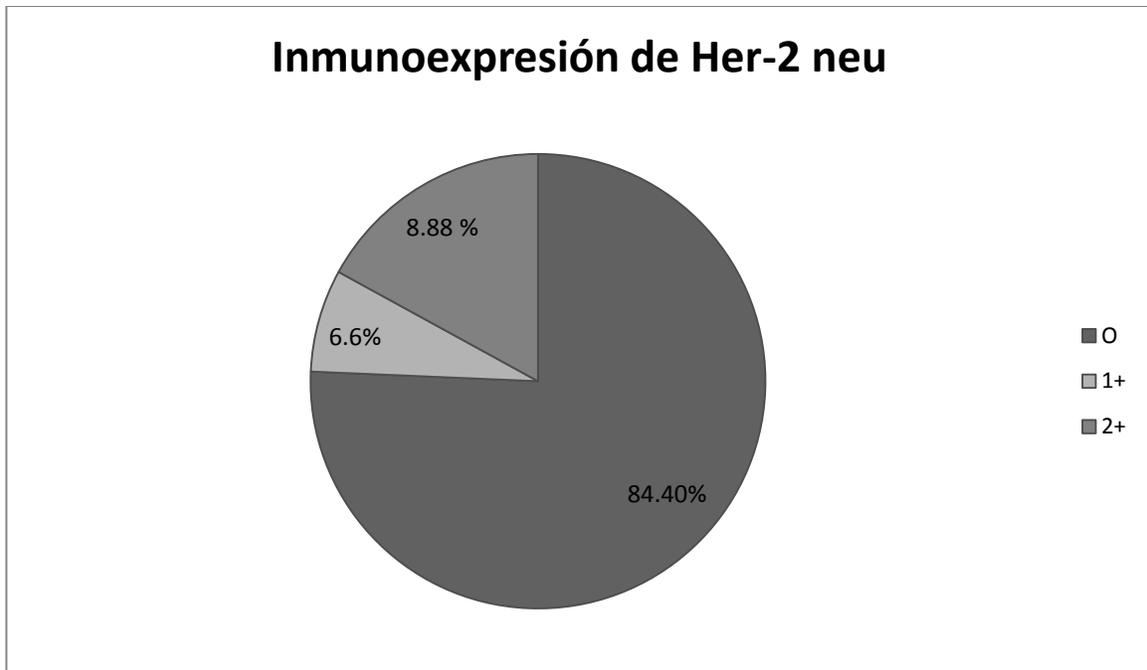


**GRAFICO 2. Relación del grado histológico con la invasión al músculo detrusor.**

De los cuarenta y cinco casos, treinta y ocho fueron negativos 0 (84.4 %), tres negativos 1+ (6.6 %), cuatro indeterminado 2 + (8.88 %) y ningún caso fue positivo (3 +).

Los tres casos negativos 1 + correspondieron a hombres de 59 años y 72 años de edad; todos con carcinomas de alto grado histológico, dos de ellos con invasión al músculo detrusor.

Los cuatro casos indeterminados (2 +) correspondieron a hombres de entre 61 años y 73 años de edad; todos con carcinomas de alto grado histológico, dos de ellos con invasión al músculo detrusor.



**GRÁFICO 3. Resultados de inmunoexpresión de Her-2/neu.**

A continuación se muestra una tabla con los resultados generales obtenidos en el estudio;

| CASO | GRADO HISTOLÓGICO | INVASIÓN | INMUNOEXPRESIÓN DE HER 2/NEU |
|------|-------------------|----------|------------------------------|
| 1    | ALTO              | SI       | 0                            |
| 2    | ALTO              | NO       | 0                            |
| 3    | BAJO              | NO       | 0                            |
| 4    | ALTO              | SI       | 0                            |
| 5    | ALTO              | NO       | 0                            |
| 6    | BAJO              | NO       | 0                            |
| 7    | ALTO              | SI       | 0                            |
| 8    | BAJO              | NO       | 0                            |
| 9    | ALTO              | NO       | 0                            |
| 10   | ALTO              | NO       | 0                            |
| 11   | ALTO              | NO       | 0                            |
| 12   | ALTO              | NO       | 1 +                          |
| 13   | BAJO              | NO       | 0                            |
| 14   | ALTO              | SI       | 2 +                          |
| 15   | BAJO              | NO       | 0                            |
| 16   | BAJO              | NO       | 0                            |

|    |      |             |     |
|----|------|-------------|-----|
| 17 | ALTO | SI          | 0   |
| 18 | ALTO | SI          | 2 + |
| 19 | ALTO | NO          | 0   |
| 20 | ALTO | SI          | 0   |
| 21 | ALTO | NO          | 2 + |
| 22 | ALTO | SIN MUSCULO | 0   |
| 23 | ALTO | SIN MUSCULO | 0   |
| 24 | ALTO | SI          | 0   |
| 25 | ALTO | NO          | 0   |
| 26 | ALTO | SI          | 0   |
| 27 | ALTO | SI          | 1 + |
| 28 | ALTO | NO          | 0   |
| 29 | ALTO | NO          | 0   |
| 30 | ALTO | SI          | 0   |
| 31 | ALTO | SI          | 0   |
| 32 | BAJO | NO          | 0   |
| 33 | ALTO | SI          | 1 + |
| 34 | ALTO | NO          | 0   |
| 35 | ALTO | SIN MUSCULO | 0   |
| 36 | BAJO | NO          | 0   |
| 37 | BAJO | NO          | 0   |
| 38 | ALTO | NO          | 0   |
| 39 | ALTO | NO          | 0   |
| 40 | BAJO | SIN MUSCULO | 0   |
| 41 | BAJO | NO          | 0   |
| 42 | BAJO | NO          | 0   |
| 43 | ALTO | NO          | 2 + |
| 44 | ALTO | NO          | 0   |
| 45 | BAJO | NO          | 0   |

**TABLA 1. Resultados generales obtenidos en el estudio.**

## 8. DISCUSIÓN

Enache y cols en 2013 estudiaron 45 casos de carcinoma papilar urotelial de vejiga; con el objetivo de evaluar la inmunexpresión de Her2/neu y EGFR además de identificar posibles correlaciones con parámetros clínicos y estadísticos, tales como el estadio tumoral y el grado histológico.

Realizaron inmunohistoquímica de Her-2/neu tomando como positividad la tinción en membrana citoplasmica, la intensidad de la reacción y el número de células marcadas. Ellos encontraron positividad para Her2/neu en 42.2% de los casos; todos siendo de alto grado o poco diferenciados; independientemente del estadio tumoral en el que se encontraran.

En este estudio los marcadores probaron ser útiles para analizar los carcinomas papilares uroteliales de alto grado histológico y aquellos que se encontraban en estadios avanzados <sup>(12)</sup>.

Nuestros resultados distan mucho de los de estos autores, a pesar de que analizamos el mismo número de casos y 32 de ellos tenía histología de alto grado, ninguno de ellos fue positivo para Her-2 neu.

Janane y cols en el 2011 estudiaron 84 casos de carcinomas papilares uroteliales con el objetivo de evaluar el valor pronóstico de la expresión de Her2/neu en aquellos que no invaden el musculo detrusor (no invasores), haciendo énfasis en los de alto grado histológico. Además relacionaron la expresión de Her2/neu con la supervivencia libre de recidiva y recaída en el seguimiento de los pacientes.

Realizaron arreglos de tejidos de 84 especímenes de resecciones transuretrales de vejiga e hicieron inmunohistoquímica para Her2/neu, consideraron el valor 3+ como sobreexpresión de la HER2, siendo esto una tinción completa e intensa del 30% o más de las células tumorales.

Detectaron sobreexpresión en 56 casos (66.6%) de los casos, todos eran de alto grado histológico y no invadían el musculo detrusor (estadio patológico PT1GII); la mayoría eran tumores unifocales y sin angiogénesis.

Los autores concluyeron entre otras cosas que la expresión de la Her 2/neu puede ser de utilidad en la predicción de recaídas en el carcinoma no invasivo; sin embargo refieren que la aplicación de su estudio debe confirmarse de forma prospectiva en ensayos multicéntricos <sup>(13)</sup>.

Llama la atención en este estudio que el porcentaje de positividad de Her 2-neu fue muy alto (66.6 %) y que nuestra positividad fue nula, pero es confiable ya que todos los testigos fueron positivos y correspondieron a tejido de carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico.

Recientemente Chen y cols en 2013 evaluaron la sobreexpresión de Her2/neu en carcinomas uroteliales de vejiga no invasores (Ta/T1) y correlacionaron los hallazgos con la recurrencia y la progresión, además de comparar el estatus de Her2/neu entre los tumores primarios y los progresivos.

Realizaron arreglos de tejidos y posteriormente inmunohistoquímica e hibridación in situ (FISH) a 36 neoplasias uroteliales papilares de bajo potencial maligno, 190 carcinomas uroteliales de bajo grado y 178 carcinomas uroteliales de alto grado. Incluyeron para análisis comparativo 32 casos con ambos tumores, primario y progresivo (Ta/T1 a T2-4).

Tuvieron 16 casos con carcinoma urotelial de alto grado con amplificación de Her2/neu; sin embargo ninguno de los casos de bajo grado y neoplasias papilares de bajo potencial maligno tuvo sobreexpresión de Her 2/neu.

Concluyeron que el diagnóstico de expresión de Her2 es valioso para distinguir aquellos pacientes que necesitan una vigilancia minuciosa y que se beneficiarían potencialmente de las terapias anti Her 2/ neu (14). Concluyeron que el diagnóstico de expresión de Her2 es valioso para distinguir aquellos pacientes que necesitan una vigilancia minuciosa y que se beneficiarían potencialmente de las terapias anti Her 2/ neu <sup>(14)</sup>.

En este trabajo de los 178 casos a los que les realizaron inmunohistoquímica para Her 2/neu un 20 % (16 casos) fueron positivos con una concordancia del 100 % con la prueba de hibridación in situ. Es interesante que todos mostraban histología de alto grado.

En nuestro estudio los casos indeterminados (2 +) también son de alto grado por lo que cabe la posibilidad de que si se hubiesen realizado pruebas de hibridación in situ, alguno resultase positivo; sin embargo no lo contemplamos en nuestros objetivos.

## 8. CONCLUSIONES

Se evaluó la inmunoexpresión de Her2/neu en el carcinoma urotelial según su grado histológico; sin embargo ninguno de los casos estudiados fue positivo como en la literatura antes citada.

Se conoció el número de casos de carcinoma urotelial que presentaron invasión al músculo detrusor; en el periodo estudiado.

En el estudio de Janane y cols en el 2011 el porcentaje de positividad fue mayor del cincuenta por ciento; muy por encima de estudios similares como el de Enache y cols y Chen y cols.

Nosotros concluimos que la realización de rutina de Her 2/neu en los casos de carcinoma urotelial que se estudiaron no aportó información útil, que colabore a un mejor tratamiento y seguimiento del paciente.

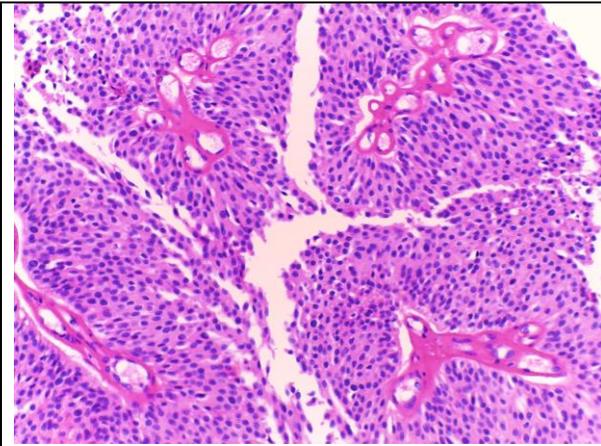
## **9.- PERSPECTIVAS**

Se propone que se haga análisis molecular de los casos cuyos resultados fueron indeterminado (2+) con el fin de saber de manera contundente si son positivos o negativos.

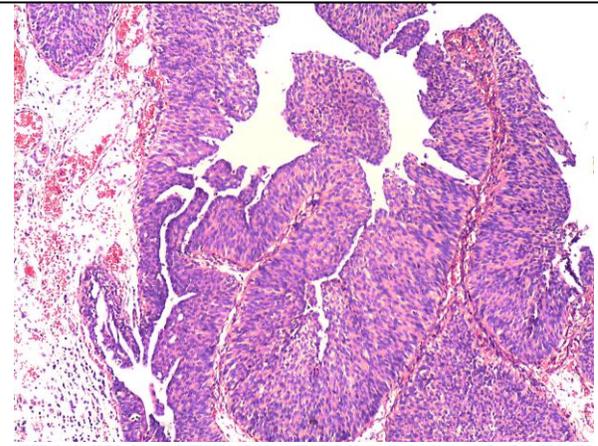
## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, et al. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARC Press, 2004.
2. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; 66: 4-34.
3. Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, et al. the association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World Urol* 2004; 21: 392-401.
4. Droller MJ. Bladder cancer. *J Urol* 1997; 157: 1266-1267.
5. Esring D, Freeman JA, Stein JP, et al. Early cystectomy for clinical stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Semin Urol Oncol* 1997; 15:154-160.
6. Babjuk Marko, Oosterlinck Willem, et al. *Actas Urológicas Españolas* 2009; 33 (49:361-371).
7. CAP Urinary Bladder Protocol Revision. [www.cap.org/cancer](http://www.cap.org/cancer).
8. Bostwick D, Eble J. *Urologic Surgical Pathology*. St Louis, Edit. Mosby, 2008.
9. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendation to users. *Hum Mutat* 19: 607-610.
10. Laé M, Couturier J, Oudard S, et al. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol*. 2010; 21: 815-819.
11. Dabbs I, David J. *Diagnostic immunohistochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier. 2010: 792-799.
12. Enache M, Simionescu Cristina, Stepan A. Inmunoexpresión de EGFR y Her2/neu en el carcinoma papilar urotelial de vejiga. *J Morphol Embryol* 2013, 54 (1): 137-141.
13. Janane A., Hajji F., et al. Evaluación de la sobreexpresión de proteína Her2 en cáncer vesical no músculo invasivo con énfasis en el grado tumoral y en la recurrencia. *Actas Urológicas Españolas* 2011; 35 (4):189-194
14. Chen PC, Yu HJ, Chang YH, Pan CC. Her2 amplification distinguishes a subset of non-muscle-invasive bladder cancers with a high risk of progression. *J Clin Pathol*. 2013 Feb; 66(2):113-9.
15. Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. *GLOBOCAN 2012: Cancer incidence mortality and prevalence worldwide*. Lyon, France: IARC Press, 2001.
16. García Vázquez Francisco Javier. Instituto Nacional de Pediatría: Departamento de Anatomía Patológica. Manual de instrucciones técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Laboratorio de patología molecular. M. en C. 2011: 53-56.

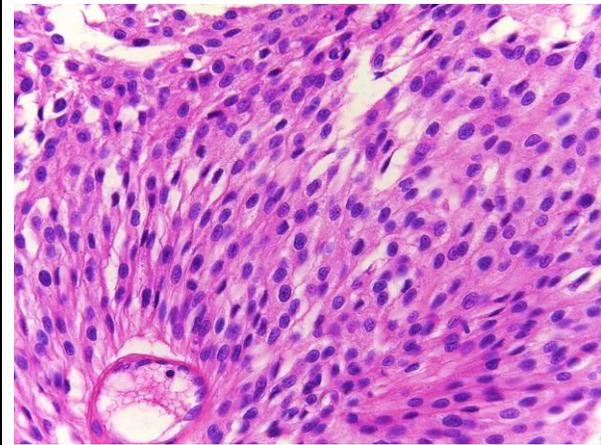
## 11. ANEXOS



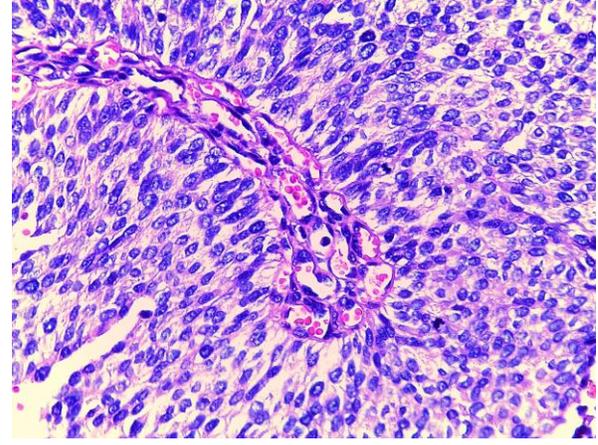
1. Carcinoma papilar urotelial de bajo grado histológico.



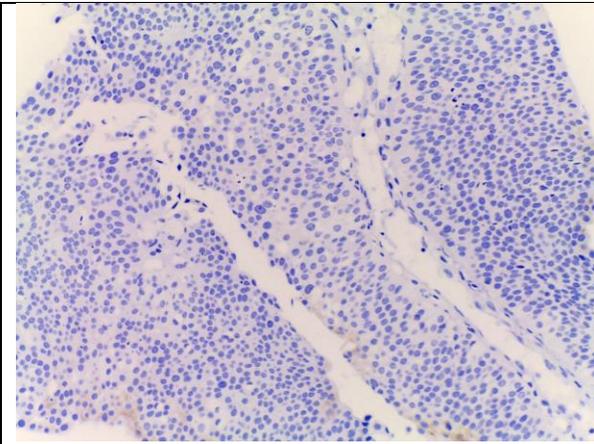
2. Carcinoma papilar urotelial de alto grado histológico.



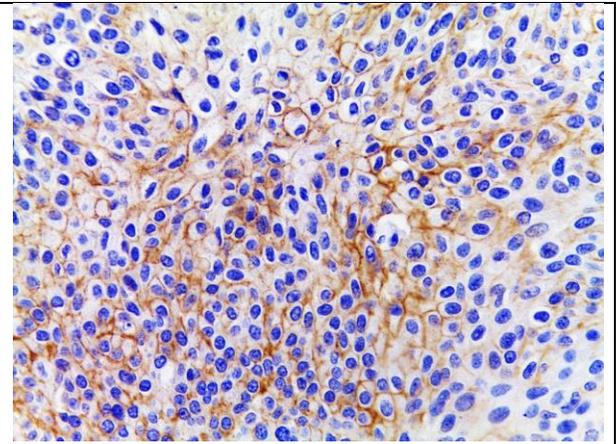
3. Músculo detrusor sin tumor.



4. Testigo de Her 2/ neu.



**4. Negativo 0 de Her 2/neu**



**5. Indeterminado de Her 2/neu**