

## EDITORIAL

## Cómo manejar las muestras anátomo-patológicas para obtener buenos resultados (histológicos, inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos)

Las determinaciones inmunohistoquímicas y moleculares en las muestras anátomo-patológicas (tisulares) son métodos utilizados para establecer factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama.

Para realizarlas, es necesario un correcto manejo de los especímenes en todas sus etapas: pre-analítica, analítica y post-analítica.

La precisión en todos estos pasos nos llevará a un resultado óptimo, necesario para la terapéutica de los pacientes.

Las muestras tisulares tienen que ser remitidas al Laboratorio de Anatomía Patológica en condiciones óptimas.

Actualmente es posible determinar en una muestra una serie de biomarcadores que representan factores pronósticos y predictivos que contribuirán al manejo terapéutico. Los marcadores o biomarcadores se determinan en tejidos incluidos en parafina (*Formalin Fixed Paraffin Embedded -FFPE-*). Además, se realizan determinaciones para definir terapias blanco moleculares, esenciales para la medicina de precisión.

Así, con la muestra obtenida, se llevan a cabo técnicas de inmunohistoquímica, determinaciones moleculares y tests genéticos. También pueden almacenarse muestras tumorales en biobancos.

Es por ello que las muestras deben procesarse siguiendo estándares óptimos y desarrollarse en las mejores condiciones con el objeto de preservar los hallazgos morfológicos y las características biológicas.

Para la preservación tisular son necesarios:

- fijador adecuado, que preserve la antigenicidad;
- tiempo de fijación óptimo;
- control del tiempo de isquemia, imprescindible para preservar el material genético.

Los biomarcadores a estudiar son:

1. Proteínas. Son el biomarcador más utilizado, pues pueden determinarse mediante inmunohistoquímica. No obstante, su examen puede verse alterado por las variables pre-analíticas. Su determinación se realiza en tacos incluidos en parafina.
2. ADN. Es un biomarcador resistente al manejo rutinario de las muestras. Su determinación puede ser influida por la acción del formol.
2. ARNm. Es la molécula más lábil y es la que utilizan muchas firmas genéticas. Su determinación se ve influida por el tiempo de isquemia caliente e isquemia fría.

Existen varias marcas comerciales que ofrecen tests genéticos, ya sea con carácter clasificador (clasifican el tumor mamario en un subtipo molecular) o pronóstico/predictivo (ofrecen información acorde al comportamiento del tumor: riesgo de recidiva, de metástasis, etc., y la respuesta a tratamientos específicos); estas diversas marcas utilizan técnicas distintas y determinan un número variable de genes. Estas técnicas están validadas para tejido en fresco y/o tejido parafinado.

## TIEMPO DE ISQUEMIA

El tiempo de isquemia se debe tener en cuenta para una correcta preservación del ARNm o en caso de que se requiera una toma de muestra para banco de tumores, estudios genéticos, etcétera.

El tiempo de isquemia hace referencia al período que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y el inicio de la fijación. El tiempo que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y la exéresis es el tiempo de *isquemia caliente*. Y el que transcurre entre la exéresis y el inicio de la fijación del tejido es el tiempo de *isquemia fría*.

Un tiempo de isquemia prolongado conlleva acidosis tisular, degradación enzimática y pérdida/ o disminución de inmunorreacción.

Es difícil influir en el tiempo de isquemia caliente, pero sí es posible controlar el tiempo de isquemia fría, que se recomienda que sea lo más corto posible (inferior a una hora), por lo que es crítico facilitar

que la muestra, una vez extraída, llegue al fijador –formol y, si es posible, *formol buffer*.

## PROCESADO DEL ESPÉCIMEN EN FRESCO

En caso de necesitar material para biobanco y estudios moleculares en fresco, se utilizará material estéril. Hay que tener en cuenta, no obstante, que esta toma de muestras nunca debe comprometer el diagnóstico ni el estudio de factores pronósticos y predictivos.

Si es necesario, se llevará a cabo un examen radiológico.

## FIJACIÓN

El proceso de fijación incluye una serie de reacciones químicas que detienen el proceso de degradación tisular una vez interrumpido el suministro sanguíneo a las células.

El medio de fijación estándar es el *formol buffer* a una concentración del 10%. El mismo se puede obtener ya preparado y su duración es de 6 a 12 meses, o bien prepararlo (Formalina 40% “pura” 100cc c/agua destilada 900 cc/4g de fosfato sódico monobásico/6,5g de fosfato de sodio dibásico).

El volumen de fijador utilizado debe ser al menos 10 veces (1/10) el tejido a fijar.

Se recomienda que esté a temperatura ambiente. El frío enlentece el efecto del formol y retrasa la fijación.

El *tiempo óptimo* de fijación está establecido entre *las 6 y las 48 horas*. Un tiempo de fijación largo incrementa el enmascaramiento antigénico y requerirá de la utilización de técnicas de recuperación antigénica en las técnicas de inmunohistoquímica.

Se recomienda que se empleen: para una pieza quirúrgica, entre 24 y 48 horas de fijación; para una biopsia por punción, más de 6 horas; y, en general, un tiempo de fijación que no supere las 72 horas.

Con un tiempo de fijación en formol de entre 24 horas y 3 días no hay marcadas diferencias en la determinación inmunohistoquímica de receptores hormonales; no obstante, cuando este tiempo supera los 8 días, la expresión de estos receptores disminuye notablemente, y en muchas ocasiones se tornan negativos.

La fijación en formol es el método idóneo para preservar los detalles morfológicos, ofrece un buen resultado para la determinación de pruebas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* y conserva los ácidos nucleicos.

Es también el fijador para el que están optimizados prácticamente todos los *kits* comerciales utilizados en inmunohistoquímica, técnicas moleculares y muchos tests genéticos

No es recomendable la utilización de decalcificantes (ácido nítrico, etc.), fijadores alcohólicos (Z5, Pen-Fix®, etc.), fijadores mercuriales (Zenker, B3, B5, etc.), solución de Bouin, o métodos de fijación rápida (microondas, etc.) por sus efectos en la antigenicidad del tejido. De ser necesario decalcificar la muestra, es recomendable, como primer paso, fijarla en formol neutro.

### SELECCIÓN DEL TACO

Para llevar a cabo estudios inmunohistoquímicos, moleculares, tests genéticos, el taco a seleccionar debe reunir las siguientes condiciones:

- Área infiltrante del tumor: más de un 30% de las células a estudiar han de ser tumorales.
- Estar representado el foco tumoral “más agresivo”.
- Que, preferentemente, incluya tejido no neoplásico.
- No utilizar el material en el que se hayan efectuado los cortes por congelación para el estudio intraoperatorio.
- Presentar la menor cantidad posible de inflamación, necrosis, tejido adiposo, estroma, hemorragia, etcétera.

Constituyen condiciones particulares: las lesiones bilaterales, multifocales o multicéntricas, o los tumores con distintos patrones morfológicos. En estos casos, se recomienda efectuar las determinaciones de manera escalonada.

Es imprescindible que sea el patólogo el que lleve a cabo la selección del material adecuado para la realización de estudios específicos.

### RECOMENDACIONES

*Material fijado:*

- Fijar el tejido antes de una hora después de la extracción.
- Utilizar formol buffer al 10%.
- Respetar un tiempo de fijación de entre 6 y 48 horas a temperatura ambiente.
- Representación en el taco incluido en parafina de más de un 30% de componente infiltrante, y evitar que haya necrosis, tejido adiposo, estroma, hemorragia, inflamación, etcétera.

- Si hay más de una lesión, han de estudiarse todas, aunque puede efectuarse un análisis progresivo lesión a lesión hasta encontrar la positividad del marcador o un resultado pronóstico con trascendencia clínica.

*Material en fresco:*

- Procesar el tejido antes de una hora después de la extracción; no comprometer el tejido que va a ser incluido en parafina.

- En las determinaciones realizadas con *técnicas de inmunohistoquímica* se deben considerar:

- *Receptores hormonales* (estrógenos y progesterona): porcentaje de células con positividad nuclear e intensidad media de la tinción.

- *Ki67*: en porcentaje de núcleos que lo expresan.

- *HER2*: negativo (cero o 1+), equívoco (2+), positivo (3+).

- Hibridación *in situ* (FISH/SISH/CISH). En tests con una sola sonda: media del número de señales de HER2/número de células. En tests con sonda dual: media del número de señales de HER2/media del número de señales CEP17.

- *Perfil genético*: indicar el nombre del test y las variables que este ofrece (riesgo alto, moderado o bajo, índice de recidiva, etc.) y la evaluación de la concordancia con los otros métodos.

Cabe señalar que tanto los parámetros morfológicos como los factores inmunohistoquímicos (receptores hormonales, Ki67 y HER2) son imprescindibles, siendo los demás optativos en función de las características de cada caso.

Las guías y recomendaciones actuales nos sugieren que los informes deberían tener consignados: solución fijadora, tiempo de fijación y clon utilizado en el test inmunohistoquímico.

El procesamiento de las muestras para técnicas de inmunohistoquímica, moleculares o genéticas requiere de un control de variables pre-analíticas, como son el tiempo de isquemia, el fijador y el tiempo de fijación.

Es imprescindible seguir los *protocolos* basados en *guías estandarizadas*, utilizar métodos *validados y reproducibles* y llevar a cabo un trabajo en equipo multidisciplinario para aplicar una conducta terapéutica a la paciente.

El informe anatomopatológico debe integrar:

- Parámetros morfológicos clásicos: tamaño, tipo histológico (GH), grado histológico (GGNGM), invasión linfovascular, márgenes, etcétera.

- Factores pronósticos y predictivos inmunohistoquímicos:
  - Receptores hormonales (estrógenos y progesterona): porcentaje de células con positividad nuclear e intensidad media de la tinción.
  - Ki67: en porcentaje de núcleos que lo expresan.
  - HER2: negativo (cero o 1+), equívoco (2+), positivo (3+).
- Hibridación *in situ* (FISH/SISH/CISH). En tests con una sola sonda: media del número de señales de HER2/número de células. En tests con sonda dual: media del número de señales de HER2/media del número de señales CEP17.
- Perfil genético: indicar el nombre del test y las variables que este ofrece.

Los parámetros morfológicos así como los factores pronósticos inmunohistoquímicos y/o con Hibridación *in situ* (receptores hormonales, Ki67 y HER2) son imprescindibles en caso de tumores mamarios infiltrantes; en los demás tumores son optativos en función de las características de cada caso.

Si todos estos pasos son correctos, se facilitarán los estudios morfológicos, inmunohistoquímicos y moleculares de los pacientes obteniendo “resultados óptimos” para definir su tratamiento.

“Todo” el equipo médico está involucrado en la obtención y conservación de los tejidos.

**Dra. Isabel Frahm**

*Servicio de Patología del Sanatorio Mater Dei*

*Integrante de la Comisión Directiva  
de la Sociedad Argentina de Mastología*