

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE HER2 EM
ADENOCARCINOMA DO ESTÔMAGO NA REGIÃO
CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diego Michelon De Carli

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE HER2 EM
ADENOCARCINOMA DO ESTÔMAGO NA REGIÃO
CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Diego Michelin De Carli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de concentração em Métodos e Técnicas Diagnósticas e Terapêuticas, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências da Saúde**

Orientador : Prof. Dr. Renato Borges Fagundes

Santa Maria, RS. Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carli, Diego Michelon De
Expressão imunoistoquímica de HER2 em adenocarcinoma
do estômago na região central do Rio Grande do Sul /
Diego Michelon De Carli.-2013.
44 p.; 30cm

Orientador: Renato Borges Fagundes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, RS, 2013

1. Imunoistoquímica 2. Neoplasias Gástricas 3. Câncer
gástrico. HER2 I. Fagundes, Renato Borges II. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Diego Michelon De Carli. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: de.carli@terra.com.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada aprova a
Dissertação de Mestrado

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE HER2 EM
ADENOCARCINOMA DO ESTÔMAGO NA REGIÃO CENTRAL
DO RIO GRANDE DO SUL**

Elaborado por
Diego Michelin De Carli

Como requisito para obtenção o grau de
Mestre Profissional em Ciências da Saúde.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Renato Borges Fagundes, Prof. Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Dr Fernando Fornari, Prof Dr. (UPF)

Dr Luis Fernando Moreira, Prof. Dr. (UFRGS)

Santa Maria. 30 de julho de 2013.

Agradecimentos

A minha família, especialmente, a minha esposa Camila de Christo Dorneles, pelo amor, paciência, carinho e apoio, não só neste mestrado como nos desafios do dia-a-dia.

Ao Professor Dr Renato Borges Fagundes, pela confiança e paciência, não só nesta orientação de mestrado, como na maior parte de minha vida acadêmica.

A Dra. Marta Pires da Rocha, pelo apoio, companheirismo e ajuda na realização desta pesquisa, sem os quais, com certeza, não teria chegado ao fim.

Aos técnicos do Serviço de Imunoistoquímica do HUSM, Claudia de Mello Bertoncheli dos Santos e Ailton Pinto de Quadros, pela ajuda inestimável, o que os tornou fundamentais para o sucesso desta pesquisa.

Aos Médicos, Professores e técnicos do Serviço de Gastroenterologia e endoscopia digestiva do HUSM, pela amizade e contribuição em minha formação profissional.

OS QUE LUTAM

Há aqueles que lutam um dia; e por isso são muito bons;
Há aqueles que lutam muitos dias; e por isso são muito bons;
Há aqueles que lutam anos; e são melhores ainda;
Porém há aqueles que lutam toda a vida; esses são os imprescindíveis.

Bertold Brecht

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Mestrado Profissional em Ciências da Saúde.
Área de concentração em Métodos e Técnicas Diagnósticas e Terapêuticas
Universidade Federal de Santa Maria.

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE HER2 EM ADENOCARCINOMA DO ESTÔMAGO NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

Autor: Diego Michelon De Carli

Orientador: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes.

Data e local da defesa: Santa Maria, 30 de julho de 2013.

Introdução: O Câncer Gástrico (CG) ocupa o quarto lugar em incidência no mundo, sendo a segunda causa de óbito por neoplasia maligna. Por ser assintomático nas fases iniciais, na maioria das vezes, é diagnosticado em fases avançadas. A expressão do gene HER2 tem sido identificada em cerca de 20% dos CG, e sua hiper-expressão está associada a um pior prognóstico nestes pacientes. **Objetivo:** Investigar a expressão imunoistoquímica do HER2 em espécimes de adenocarcinoma gástrico, e sua relação com a classificação histológica e localização anatômica. **Pacientes e métodos:** Estudo transversal, retrospectivo, onde foi analisada a expressão imunoistoquímica para o HER2, em uma amostra de 48 espécimes de CG, através da técnica de imunoistoquímica, pelo método avidina-biotina-peroxidase, utilizando anticorpo primário C-erb B2, clone EP1045Y (Biocare Medical, USA). **Resultados:** Foram encontrados 7 casos com expressão positiva de HER2; destes, 5 eram casos de adenocarcinoma do tipo intestinal e 2 eram casos do tipo misto, porém, nestes, a expressão ocorreu no componente intestinal, o que determinou uma associação significativa da expressão de HER2 com o componente intestinal do adenocarcinoma gástrico ($p=0,003$). Quanto ao sítio anatômico, dos 6 casos proximais, somente 1 (16,6%) foi positivo para o HER2, e nos 42 casos distais 6 (14,28%) foram positivos para o HER2. Não foi demonstrada associação da expressão de HER2 com o sítio anatômico das lesões. **Conclusão:** A expressão de HER2 ocorreu em 14,6% da amostra, associada significativamente ao subtipo intestinal de Lauren.

Palavras-chave: Imunoistoquímica. Neoplasias Gástricas. Câncer gástrico. HER2.

ABSTRACT

Introduction: Worldwide, Gastric Cancer (GC) is the fourth cancer in incidence and the second most common cause of cancer death. Because it is asymptomatic in the early stages, it is often diagnosed in advanced stages. HER2 gene expression has been identified in about 20% of GC. Its expression is associated with a worse prognosis for GC patients. **Objectives:** To study HER2 immunoexpression in specimens of gastric adenocarcinoma and its association with histological classification and anatomical location. **Patients and methods:** We conduct a cross-sectional study, where we analyzed HER2 immunoexpression in 48 specimens of gastric adenocarcinoma. We use avidin-biotin method with primary antibody peroxidase C-erb B2, clone EP1045Y (Biocare Medical, USA). **Results:** We found seven positive cases. HER2 was expressed in 5 intestinal type and 2 in the intestinal component of mixed type. There was no expression of HER2 in diffuse type. HER2 expression was associated with the intestinal component of gastric adenocarcinoma ($p = 0.003$). Regarding the anatomical site, 1 in 6 (16.6%) proximal cases was positive for HER2, and 6 in 42 (14.28%) distal were positive for HER2. We did not find an association between HER2 expression and the anatomical site of GC. **Conclusion:** HER2 immunoexpression was found in 14.6% of the sample and it showed significant association with Lauren's intestinal subtype.

Key-words: Immunohistochemistry. Stomach Neoplasms. Gastric cancer. HER2.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Adenocarcinoma subtipo difuso de Lauren com aumento de 200X, coloração HE (A) e HER2, negativo (B). Adenocarcinoma subtipo intestinal de Lauren com aumento de 200X, coloração HE (C) e HER2, reativo 3+ (D).	32
--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Relação da expressão imunoistoquímica de HER2 com os subtipos histológicos de Lauren e localização anatômica do adenocarcinoma gástrico	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ACG	Adenocarcinoma gástrico
CG	Câncer Gástrico
CGD	Câncer Gástrico Distal
CGJGE	Câncer Gástrico da Junção Gastro-Esofágica
CGP	Câncer Gástrico Proximal
DAB	Diaminobenzina
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilendiamino tetra-acético)
HE	Hematoxilina Eosina
HER	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imunoistoquímica
JGE	Junção Gastro-Esofágica
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
SGHUSM	Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Santa Maria
SPUFSM	Serviço de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico	14
3.2 Classificação Anatômica e Histológica.	16
3.3 Medidas preventivas.....	17
3.4 Estadiamento e Tratamento	17
3.5 HER 2	19
3.6 HER2 e câncer gástrico.....	19
3.7 Câncer Gástrico HER 2 Positivo e Trastuzumab	22
4 PACIENTES E MÉTODOS	23
4.1 Delineamento:	23
4.2 Caracterização da amostra	23
4.3 Processo de amostragem	23
4.4 Critérios de exclusão	24
4.5 Logística.....	24
4.6 Análise Estatística.....	25
4.7 Considerações éticas.....	25
CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Câncer Gástrico (CG) ocupa o quarto lugar em incidência no mundo e é a segunda causa de óbito por neoplasia maligna. Os fatores de risco para o CG incluem a infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H pylori*), baixo status socioeconômico, tabagismo, a alta ingestão de alimentos defumados e salgados, bem como o baixo consumo de frutas e vegetais. Apresenta pouca sintomatologia e, na maioria das vezes, é diagnosticado em fases avançadas.

O tratamento cirúrgico é o principal tratamento curativo e, em geral, é medida paliativa mais efetiva para a melhora dos sintomas, principalmente, os sintomas obstrutivos. A quimioterapia tem papel paliativo, sendo a combinação de 5-fluoracil e cisplatina um dos regimes mais usados na atualidade.

A hiper-expressão de HER2 em CG está associada a um pior prognóstico e apresenta um forte valor preditivo de resposta ao trastuzumab. Em função da variação das taxas de positividade de HER2 de acordo com a localização anatômica, e das diferentes incidências de CGP (câncer gástrico proximal) ou CGD (câncer gástrico distal) em diferentes áreas geográficas, justifica-se o estudo da prevalência da positividade do HER2 no CG na região central do Rio Grande do Sul. Recentemente, tem se detectado a expressão do gene HER2 em cerca de 20% dos CG, e a sua hiper-expressão no tecido tumoral está associada a um pior prognóstico nestes pacientes. Diante do advento da terapia-alvo contra o HER2, com o uso do quimioterápico Trastuzumab, os pacientes que expressam este gene têm apresentado um ganho de sobrevida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a expressão imunoistoquímica de HER2 em amostras de adenocarcinoma gástrico de pacientes residentes na região central do estado do RS

2.2 Objetivos específicos

Estudar a associação da expressão de HER2 com os subtipos histológicos de Lauren do adenocarcinoma de estômago.

Estudar a associação da expressão de HER2 com a localização anatômica do adenocarcinoma gástrico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Câncer gástrico é definido como a neoplasia que surge na região compreendida entre a junção esôfago-gástrica e o piloro. Aproximadamente 95% dos casos se originam do epitélio gástrico e são denominados adenocarcinomas. Com uma incidência mundial de 603.003 casos novos por ano em homens e 630.290 em mulheres, o adenocarcinoma gástrico (ACG) ocupa o quarto lugar em incidência no mundo (1), e é a segunda causa de óbito por neoplasias malignas. Apesar dos avanços tecnológicos, o ACG ainda é detectado em fases avançadas, em que já ocorreu a invasão da muscular própria. O diagnóstico tardio se deve aos sintomas vagos iniciais que só se tornam evidentes nos estágios avançados (1;2).

3.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico

A taxa de incidência varia entre os continentes, sendo mais prevalente no leste asiático, leste europeu e América do Sul. As taxas variam desde 3,4 mulheres/100.000 habitantes na América do Norte até 26,9 homens/100.000 habitantes na Ásia. O CG tende a acometer pacientes com idade entre 60-80 anos, sendo mais raros os casos em pacientes abaixo de 30 anos (2). As taxas de sobrevivência global em 5 anos (SV5) são de aproximadamente 20% na maior parte do mundo, exceto no Japão, onde a SV5 é em torno de 60%, graças aos programas de rastreamento, sistemas de estadiamento e tratamento(1).

No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2012 é de 12.670 casos novos de câncer de estômago em homens e 7.420 entre mulheres (risco estimado de 13/100.000 homens e 7/100.000 mulheres. Na região sul do Brasil, o CG é o quarto câncer mais frequente em homens (16/100.000) e o sexto em mulheres (8/100.000) (3). No Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Santa Maria, em uma análise de 25 anos, constatou-se a prevalência de ACG em 1,6% dos 20521 pacientes submetidos a endoscopia digestiva alta, no período de 1986 e 2010 (4).

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial que inclui fatores ambientais, condições socioeconômicas e hábitos de vida (5). Mais de 80% dos casos estão associados a

infecção pelo *H. pylori*. Outros fatores de risco (FR) incluem baixo status socioeconômico, tabagismo, ingestão de alimentos salgados e defumados e baixo consumo de frutas e vegetais.

H. pylori, uma bactéria gram-negativa, tem reconhecido papel no desenvolvimento do ACG. A combinação de uma cepa virulenta, um ambiente permissivo e suscetibilidade genética do hospedeiro são considerados essenciais para dar início a uma sequencia de lesões que evoluiriam da condição normal para gastrite crônica não-atrôfica, que evoluiria para gastrite atrófica e metaplasia intestinal e, finalmente, para displasia e adenocarcinoma(6;7). Acredita-se que a infecção pelo *H. pylori* produza estresse oxidativo, que suprime os mecanismos de defesa antioxidantes do organismo, levando ao dano oxidativo do DNA.

A dieta também influi para o desenvolvimento do CG. As populações sob risco são aquelas que consomem dietas ricas em amido, carne mal conservada, e apresentam baixo consumo de frutas e vegetais frescos. O excesso de sal, principalmente associado com o processo de preservação de carne e ou peixe, aumenta o risco de câncer gástrico diretamente, pois destrói a barreira da mucosa, levando à gastrite e à ulceração, podendo potencializar a ação carcinogênica dos compostos nitrogenados, presentes no processo de conservação de alimentos como carnes, peixes e vegetais (8). Já o consumo de frutas e vegetais frescos representam um fator de proteção (9).

O álcool é um irritante gástrico e um importante fator de risco. Meta-análises recentes apontam evidências de que o consumo de álcool em quantidades moderadas (mais de 4 doses por dia) determina um risco de 1,2 para o desenvolvimento do CG, sendo este risco maior para as bebidas destiladas, quando em comparação com as fermentadas (9-11). O tabagismo diminui a produção de prostaglandinas que atuam na defesa da mucosa gástrica, levando ao desenvolvimento de gastrite, ulceração e metaplasia intestinal. Os fumantes tendem a ter taxas mais altas de infecção pelo *H. pylori* e inflamação duodenal, em comparação com os não fumantes (1).

Histórico familiar está associado ao CG em 10% dos casos (os demais 90% são esporádicos), já tendo se identificado mutações no gene da E-Cadherin, associados ao desenvolvimento do ACG (9). Embora os membros de uma família em geral estejam expostos aos mesmos fatores de risco ambientais (infecção pelo *H. pylori*, hábitos dietéticos), estes fatores de risco atuam independentemente e em conjunto com a predisposição genética (2).

No último século, houve um decréscimo na incidência de adenocarcinoma gástrico distal nas regiões mais desenvolvidas do mundo, devido a redução da prevalência de infecção por *H. pylori* decorrente da melhoria sanitária, a maior ingestão de frutas e verduras frescas, e menor uso de métodos de conservação de alimentos baseados no salgamento ou defumação.

Por outro lado, a incidência de adenocarcinoma gástrico proximal vem aumentando ou se mantendo constante na Europa Ocidental e América do Norte. Entretanto, o CG distal permanece comum em muitas regiões do mundo, incluindo a América do Sul (1).

3.2 Classificação Anatômica e Histológica

Os ACG podem ser divididos anatomicamente em tumores da região proximal (CGP) e distal (CGD). O CG proximal é aquele que ocorre na junção gastro-esofágica, conhecida como cardia, sendo mais comum em países desenvolvidos, em pacientes caucasianos, com nível socioeconômico mais elevado, e está mais relacionado com a doença do refluxo gastro-esofágico e a obesidade. Já o tumor distal compreende lesões que ocorrem nas demais porções do estômago, principalmente no antro, mais comum em países em desenvolvimento, em indivíduos de raça negra e membros de classes econômicas mais baixas, sendo nestes casos a infecção pelo *H. pylori* e hábitos dietéticos os fatores de risco mais relacionados (2;6).

Segundo a classificação de Lauren, o CG é classificado em dois subtipos histológicos: com morfologia intestinal e difuso. O subtipo intestinal se caracteriza por ser geralmente volumoso, compostos de estruturas glandulares e predominam em áreas de alta prevalência do CG, e se desenvolvem a partir de lesões precursoras. Geralmente, acomete pacientes com idades próximas de 55 anos e apresenta relação homem/mulher de 2:1. O subtipo difuso possui crescimento infiltrativo, com células malignas pouco diferenciadas e pouco coesas. A sua incidência permanece relativamente constante, sem lesões precursoras identificáveis, acomete com maior frequência pacientes mais jovens (média de 48 anos) e apresenta relação semelhante entre homens e mulheres. Como a queda na incidência do CG ocorreu principalmente as custas do subtipo intestinal, a incidência dos dois subtipos atualmente parece ser equivalente (12).

3.3 Medidas preventivas

O objetivo final dos programas de prevenção são a redução na incidência e mortalidade relacionada com o câncer, e as medidas adotadas podem ser divididas em profilaxia primária e secundária.

A profilaxia primária inclui medidas com o objetivo de evitar exposição a agentes carcinogênicos, de melhorar os mecanismos de defesa do organismo, os quais incluem modificação no estilo de vida e quimioprevenção. No caso do CG, tem-se como orientação evitar dietas com excesso de sal, evitar tabagismo, e aumentar a ingestão de frutas e vegetais frescos. Em populações de alta incidência de CG (como no Japão e Coreia), testar e tratar o *H. pylori* é considerada uma estratégia efetiva na prevenção desta neoplasia (5;13;14).

A profilaxia secundária consiste em programas de screening e tratamento do CG em estágio inicial, considerando que a estimativa de sobrevida nestes casos é de 95% em 5 anos. Atualmente, no Brasil, não existe um programa nacional de screening do CG (15), mas o programa de screening no Japão é efetivo e utiliza métodos indiretos (RX contrastado com bário, dosagem do pepsinogênio sérico) e métodos diretos como a endoscopia digestiva alta (5).

3.4 Estadiamento e Tratamento

O estadiamento é baseado na classificação TNM, 7ª edição de 2010, onde o T compreende a extensão local do tumor; N refere-se ao comprometimento linfonodal, e o M se refere à metástases a distância, conforme descrito abaixo (16;17):

T1a: invasão da lâmina própria ou muscular da mucosa,

T1b : invasão da submucosa,

T2: invasão da camada muscular própria,

T3: invasão da camada subserosa,

T4a: Invasão da serosa,

T4b: Invasão das estruturas próximas,

N0: ausência de comprometimento linfonodal

N1: 1-2 linfonodos acometidos

N2: 3-6 linfonodos acometidos

N3: 7-15 linfonodos acometidos

N4: mais de 15 linfonodos acometidos

M0: ausência de metástases

M1: presença de metástases e ou citologia peritoneal positiva

O tratamento do CG depende do estadiamento tumoral, em geral, realizado através da endoscopia digestiva e da tomografia de abdome e tórax. O tratamento cirúrgico é o principal tratamento curativo, sendo geralmente a medida mais efetiva para a melhora dos sintomas, principalmente, os sintomas obstrutivos.

Em geral, a gastrectomia total é realizada em tumores proximais e a gastrectomia parcial nos tumores distais, associada à linfadenectomia D2, que compreende os linfonodos perigástricos e os linfonodos localizados no tronco celiaco e no ligamento hepatoduodenal. A ressecção endoscópica tem sido usada como medida curativa para tumores gástricos precoces. Os melhores resultados da ressecção endoscópica têm sido obtidos nas lesões do tipo intestinal sem linfonodos comprometidos, principalmente, nas lesões elevadas com no máximo 2 cm de diâmetro, e, planas ou deprimidas, com menos de 1cm de diâmetro, sem evidência de ulceração, desde que invada até 1/3 da submucosa, ou $<500\mu$, definido com Sm1.

O tratamento adjuvante no CG está indicado nos casos com envolvimento linfonodal e/ou T3/T4, ou seja, estádios II e III, e pode envolver quimioterapia perioperatória (MAGIC trial), adjuvante (CLASSIC trial), ou quimiorradioterapia adjuvante (INT0116) (18-20). As drogas envolvidas no tratamento quimioterápico são as fluoropiridinas, os taxanos, os antraciclicos, os inibidores da topoisomerase e os análogos da platina.

Na doença localmente avançada não cirúrgica ou metastática, indica-se tratamento paliativo com quimioterapia. A combinação de uma fluoropiridina (5-fluorouracil ou capecitabina) e cisplatina é um dos regimes mais usados, e recentemente vem sendo somado a este esquema a terapia alvo contra o HER2, com o Trastuzumab, em pacientes com hiper-expressão de HER2 (18).

3.5 HER 2

Os receptores HER1 (c-erbB-1, EGFR), HER2 (c-erbB-2), HER3 (c-erbB-3), e HER4 (c-erbB-4), também chamados ErbB, são proteínas tirosina-quinases transmembranas, que ligam o fator de crescimento epidérmico - EGF - e outras moléculas assemelhadas, foram inicialmente descobertos em 1978. O HER2, o segundo receptor identificado, estruturalmente é uma glicoproteína com 185kD, produto do onco gene c-erbB2-2/neu que se localiza no braço curto do cromossomo 17 (lòcus 21) (21;22). Até o momento, não foi descrito ainda um ligante extracelular para o HER2, que pode espontaneamente formar dímeros, uma característica conferida pela estrutura peculiar de sua porção extracelular. Assim, o dímero HER2 pode se transfosforilar independentemente da ausência de ligante, estimulando a transformação morfológica e o crescimento celular, seja em sua forma mutada (o oncogene *neu*, formando homodímeros *neu:neu*), seja na sua forma não mutada (23;24).

A família dos receptores de fator de crescimento epidérmico humano, (HER), desencadeia o estímulo da enzima tirosina-quinase transmembrana, que são enzimas que exercem atividade importante na regulação de cada aspecto da biologia celular, regulando a apoptose, o rearranjo do citoesqueleto, o ciclo de progressão celular, a resposta imune e a transcrição gênica (25). A sua desregulação desencadeia uma rede de processos de sinalização que promovem proliferação celular, migração, adesão e angiogênese, além da inibição da apoptose.

A expressão de HER2 é mais bem conhecida no câncer de mama onde é encontrada em 15-25% dos casos e está associada a pior prognóstico, principalmente, quando existem metástases em linfonodos (26). Além do câncer de mama, a expressão de HER2 tem sido descrita em diversos outros tumores como ovário, pulmão, bexiga, endométrio e estômago (27).

3.6 HER2 e câncer gástrico

No caso do câncer gástrico, a expressão de HER2 foi primeiramente descrita em 1986 (28). Até 2006, diversos estudos confirmaram os primeiros achados, mas as taxas de expressão variavam de 8,2% até 53,4% (29-45). As explicações para tais diferenças foram

atribuídas a causas multifatoriais, incluindo as diferenças das populações estudadas, mas o fator mais importante seria a ausência de um método sistematizado na interpretação dos achados, conforme demonstrado com a utilização de diferentes escores (30).

Quando comparado com o câncer de mama, a imuno-reatividade de HER2 no câncer gástrico tem uma distribuição heterogênea no tecido tumoral e uma reação incompleta da membrana (24). O câncer de mama e o câncer gástrico têm morfologia, biologia e expressão clínica diferentes, o que tornou necessária a utilização de critérios específicos de análise da expressão do HER2 no CG (46). A heterogeneidade do tumor foi avaliada em um estudo que mostrou casos em que o primeiro bloco foi negativo, e quando se analisou um segundo bloco, 7,2% dos casos anteriormente considerados negativos, ocorreu uma reatividade alta (2+ /3+), apontando para a necessidade de análise de mais de um local representativo do tumor (47). Também devido à heterogeneidade do HER2, um maior cuidado deve ser tomado com a interpretação da expressão imunoistoquímica nos casos de biópsias endoscópicas, onde o número de biópsias deve ser maior, e realizadas em diferentes locais do tumor para aumentar a probabilidade de positividade. No entanto, nenhum estudo formal foi ainda realizado para abordar esta questão e definir quantas biópsias endoscópicas são necessárias para evitar falhas na classificação do status de HER2 (46;48;49).

Em 2008, Hofmann e colaboradores propuseram um sistema de escores para a interpretação imunoistoquímica do HER2 específicos para o CG. Em 168 amostras tumorais, provenientes de ressecções gástricas, foi analisada a expressão de HER2 na membrana citoplasmática e a amplificação do gene através de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), demonstrando uma positividade de 10,7% para HER2. Estes autores propuseram o seguinte escore de graduação para a análise imunoistoquímica da expressão de HER2:

- Grau 0: ausência de reatividade ou <10% de reatividade nas células tumorais;
- Grau 1+: Reatividade fraca em > 10% das células tumorais; com reatividade somente em parte da membrana;
- Grau 2+: Moderada reatividade em >10% das células, com marcação em toda a membrana lateral e basolateral;
- Grau 3+: Forte reatividade, com marcação intensa da membrana basolateral e lateral em >10% das células.

Neste estudo, foram encontrados 21 casos 3+, e destes todos apresentaram positividade na técnica de FISH; dos 21 casos graduados como 2+, somente 7 foram positivos na técnica de

FISH; já nos 71 casos classificados como 1+, somente 1 foi positivo na técnica de FISH, e nos grau 0 todos também foram negativos na técnica de FISH. O estudo de Hoffmann e colaboradores validou o escore atualmente utilizado. Outra alteração nesta classificação que se diferenciou da interpretação que era feita no câncer de mama foi a definição da reação da membrana na sua porção basolateral e a ausência de reação na membrana luminal, dando o aspecto de “U”, possivelmente, decorrente da formação glandular do tecido gástrico (50).

Com base nestes critérios, um estudo randomizado e multicêntrico chamado ToGA (trastuzumab with chemotherapy in HER2-positive advanced GC) avaliou a hiper-expressão de HER2 em amostras de câncer gástrico, e encontrou uma taxa de positividade de 22,1%. A expressão de HER2 foi mais alta em pacientes com CG subtipo intestinal quando comparado com subtipo difuso/misto (32,2 versus 6,1; $p < 0,001$), bem como em tumores da JGE (33,2 versus 20,9%) quando comparado com CGD (51). Brasil, Taiwan e Guatemala, participantes deste estudo, apresentaram baixas porcentagens de CGJGE (0-3%) e baixas taxas de positividade de HER2 (3-15%)(52).

Um estudo compreendendo 169 casos de adenocarcinoma gástrico, onde 70 tumores eram localizados na região esôfago-gástrica, segundo a Classificação de Lauren, 110 tumores eram do subtipo intestinal, 34 do subtipo difuso e 25 do tipo misto. Nesse caso, ocorreu uma taxa de positividade de 11,2 % (19 casos) com predomínio do subtipo intestinal (17 casos), mas foi identificada diferença significativa entre a localização anatômica do tumor, com maior prevalência nos tumores proximais (53). Estudos europeus encontraram taxa de positividade para HER2 de 10-22,8%, identificando predomínio do subtipo intestinal (81-91%), porém, não foi estudada a expressão quanto à localização anatômica (54-57).

Na Ásia, foram demonstradas prevalências que variam de 11,7%-12%, e em todas as casuísticas houve predomínio significativo do subtipo histológico intestinal (58-60). A maioria destes estudos não identificou diferença entre a localização proximal e a localização distal, com exceção de estudo realizado no Japão em que a prevalência do HER2 foi 3 vezes maior nos tumores proximais, em comparação com os distais (33,3X10,4%) (58).

Na America Latina, existem poucos estudos sobre a prevalência do HER2, com destaque para um estudo peruano que encontrou taxa de positividade de 9% e a expressão ocorreu com maior frequência no subtipo intestinal e nas lesões de localização proximal (61). Dados brasileiros são escassos e, até onde se conhece, existem somente dois estudos, um de 2005, em que Begnami e colaboradores, em uma casuística de 482 câncer gástricos, encontraram positividade de HER2 em 56 casos, o que correspondeu a 12% da amostra. Destes, 49 eram constituídos de carcinomas do subtipo intestinal de Lauren e não foi

observada diferença estatística da expressão de HER2 entre os tumores proximais e os distais (62). No outro trabalho, realizado em 2009 por Cirne-Lima e colaboradores, foram estudados 37 casos de câncer gástrico e a expressão de HER2 ocorreu em somente dois (5,4%) casos (63). A crítica a estes estudos é que em ambos a interpretação da expressão imunoistoquímica de HER2 foi realizada com os critérios de interpretação utilizados no câncer de mama, em que se considera resultado positivo quando toda a membrana expressa o HER2 e não somente as membranas basal e basolateral, o que pode ter subestimado os resultados dos mesmos.

3.7 Câncer Gástrico HER 2 Positivo e Trastuzumab

O interesse no HER2 foi renovado após a publicação do ToGA Trial (Trastuzumab for Gastric Cancer) um estudo internacional de fase III, randomizado, controlado e multicêntrico, desenhado para demonstrar a eficácia e segurança de uma droga anti-HER2 (trastuzumab), em associação com a quimioterapia como tratamento de primeira linha para o câncer gástrico avançado e metastático, nos pacientes com hiper-expressão do HER2 nas células tumorais(51).

Trastuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 já aceito como agente padronizado para tratamento de câncer de mama HER2 positivo, e em estudo para utilização em CG. O uso de Trastuzumab avaliado no estudo ToGA identificou redução no risco de óbito de 26% para os pacientes que receberam esta droga combinada à quimioterapia (5FU ou capecitabina em combinação com cisplatina), em comparação com os pacientes que receberam apenas a quimioterapia. A sobrevida global média encontrada foi de 13,8 meses no grupo do trastuzumab *versus* 11,1 meses no grupo controle, tornando este o primeiro anticorpo monoclonal a mostrar benefício na sobrevida entre as várias outras terapias alvo que estão sendo testadas para câncer gástrico.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Para este estudo, foi idealizado um delineamento transversal, onde os fatores de estudo foram o diagnóstico histológico e o sítio anatômico, e o desfecho foi a expressão imunoistoquímica positiva ou negativa de HER2.

4.2 Caracterização da amostra

A amostra utilizada foi uma amostra de conveniência, constituída de material emblocado em parafina, resultante de gastrectomias de pacientes com diagnóstico histológico de CG, armazenados no Serviço de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (SPUFMSM). Os procedimentos foram realizados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), durante os anos de 2005 a 2010. As informações referentes a cada paciente foram obtidas do banco de dados do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Santa Maria (SGHUSM).

A região central do Rio Grande do Sul é definida pelos municípios que compõem a 4ª. coordenadoria de saúde do RS que são: Santa Maria, Julho de Castilhos, Quevedos, Toropi, São Pedro do Sul, São Martinho da Serra, Itaara, Ivorá, Nova Palma, Silveira Martins, Faxinal do Soturno, Dona Francisca, São João do Polêsine, Paraíso do Sul, Agudo, Restinga Seca, Dilermando de Aguiar, Formigueiro, São Sepé, Vila Nova do Sul.

4.3 Processo de amostragem

Foram selecionadas amostras de câncer gástrico, armazenadas no SPUFMSM, no período supra mencionado.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídas amostras de câncer gástrico do tipo não-adenocarcinoma, amostras com material insuficiente e de pacientes com informações incompletas ou inexistentes no banco de dados do SGHUSM. .

4.5 Logística

As amostras emblocadas em parafina foram cortadas em micrótomo rotativo, sendo os cortes, na espessura de 3 μ , montados em lâminas silanadas. Após fixação de duas horas em estufa a 60°, os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em bateria decrescente de alcoóis até a água, seguindo-se o processo de bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, em dois banhos de 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas por 26 minutos na potência máxima (800W), com as lâminas imersas em TRIS- EDTA(pH 9). O bloqueio da avidina e biotina endógena foi realizado com kit comercial DAKO, por 10 minutos, seguindo-se lavagem em água corrente, água destilada e tampão PBS. A seguir, as lâminas foram incubadas *overnight* em geladeira, com temperatura de 4 a 8 graus, em câmara úmida, com o anticorpo primário C-erb B2, clone EP1045Y (Monoclonal antibody, 1:150, Biocare medical, USA) por 12 horas. Seguiu-se o processo com dois banhos de 5 minutos cada, em tampão PBS e incubação com o anticorpo secundário biotilnado universal (anti IgG) por 30 minutos e novamente dois banhos de 5 minutos no tampão PBS. Após esta etapa, ocorreu nova incubação com o complexo streptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos e dois banhos de tampão PBS. A reação foi revelada com uma solução de PBS com diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas em uma bateria de 5 alcoóis anidro, clarificadas em três banhos de xilol e montadas com bálsamo sintético.

A expressão imunoistoquímica da HER2 foi interpretada com base na porcentagem de células com coloração membranosa, conforme descrito por Hofmann(50) , a seguir:

- a) **0** : ausência de reatividade ou <10% de reatividade nas células tumorais;

- b) **1+**: Reatividade fraca em > 10% das células tumorais; com reatividade somente em parte da membrana;
- c) **2++**: Moderada reatividade em >10% das células, com marcação em toda a membrana lateral e basolateral;
- d) **3++**: Forte reatividade, com marcação intensa da membrana basolateral e lateral em >10% das células.

Nas análises foi incluído o bloco mais representativo do tumor. Lâminas de hematoxilina e eosina (HE) foram utilizadas para a identificação das áreas representativas do tumor. Nos casos em que a imunohistoquímica foi negativa, um segundo bloco representativo do tumor, de sítio diferente, foi analisado para confirmar o achado negativo.

Foram considerados como positivos os casos em que a imunohistoquímica apresentou reatividade 2+ e 3+, e negativa quando 0 ou 1+, conforme o escore descrito anteriormente. Um bloco de tecido neoplásico de mama previamente definido como positivo para HER2 foi usado em cada técnica imunohistoquímica, como um controle externo positivo. Todas as lâminas tanto do HE como da imunohistoquímica foram revisadas por patologista experiente do SPUFSM e seus achados comparados com os achados do autor.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados deu-se através do software SPSS 11 (*Statistical Package for the Social Sciences*). As variáveis quantitativas foram descritas através de média e DP, e as qualitativas em percentuais. Foi utilizado o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando adequados para analisar a associação entre a hiper-expressão de HER2 e os subtipos histológicos e localização anatômica.

4.7 Considerações éticas

Por tratar-se de um estudo retrospectivo, com peças cirúrgicas, esta pesquisa não envolveu seres humanos diretamente. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, sob CAAE, número 0115.0.243.000-11

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE HER2 EM ADENOCARCINOMA DO ESTÔMAGO

AUTORES:

Diego Michelin De Carli¹
Marta Pires da Rocha²
Luis Carlos Moreira Antunes³
Renato Borges Fagundes⁴

1: Médico Gastroenterologista, mestrando no programa de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

2: Médica Patologista do Hospital Universitário de Santa Maria.

3: Médico Oncologista do Hospital Universitário de Santa Maria. Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

4: Professor Doutor do Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria, Professor do programa de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria e Professor do Programa de pós-graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Artigo aguarda correções da banca para tradução para o inglês e formatação e submissão para publicação

Resumo

Introdução: O Câncer Gástrico (CG), ocupa o quarto lugar em incidência no mundo, e é a segunda causa de óbito por neoplasia maligna. Por ser assintomático nas fases iniciais, na maioria das vezes, é diagnosticado em fases avançadas. A expressão do gene HER2 tem sido identificada em cerca de 20% dos CG, e sua hiper-expressão está associada a um pior prognóstico nestes pacientes. **Objetivo:** Investigar a expressão imunohistoquímica do HER2 em espécimes de adenocarcinoma gástrico, e sua relação com a classificação histológica e localização anatômica. **Material e métodos:** Estudo transversal, retrospectivo, onde foi analisada a expressão imunohistoquímica para o HER2, em uma amostra de 48 espécimes de CG, através da técnica de imunohistoquímica, pelo método avidina-biotina-peroxidase utilizando anticorpo primário C-erb B2, clone EP1045Y (Biocare Medical, USA). **Resultados:** Foram encontrados 7 casos com expressão positiva de HER2; destes, 5 eram casos de adenocarcinoma do tipo intestinal e 2 eram casos do tipo misto, porém, nestes, a expressão ocorreu no componente intestinal, o que determinou uma associação significativa da expressão de HER2 com o componente intestinal do adenocarcinoma gástrico ($p=0,003$). Quanto ao sítio anatômico, dos 6 casos proximais somente 1 (16,6%) foi positivo para o HER2, e, nos 42 casos distais, 6 (14,28%) foram positivos para o HER2. Não foi demonstrada associação da expressão de HER2 com o sítio anatômico das lesões. **Conclusão:** A expressão de HER2 ocorreu em 14,6% da amostra, associada significativamente ao subtipo intestinal de Lauren.

Unitermos: Imunohistoquímica. Neoplasias Gástricas. Câncer gástrico. HER2.

Abstract

Introduction: Worldwide, Gastric Cancer (GC) is the fourth cancer in incidence and the second most common cause of cancer death. Because it is asymptomatic in the early stages, it is often diagnosed in advanced stages. HER2 gene expression has been identified in about 20% of GC. Its expression is associated with a worse prognosis for GC patients. **Objectives:** To study HER2 immunoexpression in specimens of gastric adenocarcinoma and its association with histological classification and anatomical location. **Material and methods:** We conduct a cross-sectional study, where we analyzed HER2 immunoexpression in 48 specimens of gastric adenocarcinoma. We use avidin-biotin method with primary antibody peroxidase C-erb B2, clone EP1045Y (Biocare Medical, USA). **Results:** We found seven positive cases. HER2 was expressed in 5 intestinal type and 2 in the intestinal component of mixed type. There was no expression of HER2 in diffuse type. HER2 expression was associated with the intestinal component of gastric adenocarcinoma ($p = 0.003$). Regarding the anatomical site, 1 in 6 (16.6%) proximal cases was positive for HER2, and 6 in 42 (14.28%) distal were positive for HER2. We did not find an association between HER2 expression and the anatomical site of GC. **Conclusion:** HER2 immunoexpression was found in 14.6% of the sample and it showed significant association with Lauren's intestinal subtype.

Keywords: Immunohistochemistry. Stomach Neoplasms. Gastric cancer. HER2.

Introdução

Com uma incidência mundial de 603.003 casos novos por ano em homens e 630.290 em mulheres, o adenocarcinoma gástrico (CG) ocupa o quarto lugar em incidência no mundo, sendo a segunda causa de óbito por neoplasias malignas, considerando que, mesmo com os avanços tecnológicos, o CG ainda é detectado em fases avançadas, determinando taxas de sobrevida global em 5 anos de aproximadamente 20% na maior parte do mundo. Exceto no Japão, onde a estas taxas são em torno de 60%, graças aos programas de rastreamento, sistemas de estadiamento e tratamento (1).

No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2012 é de 12.670 casos novos de câncer de estômago em homens e 7.420 entre mulheres (risco estimado de 13/100.000 homens e 7/100.000 mulheres. Na região sul do Brasil, o CG é o quarto câncer mais frequente em homens (16/100.000) e o sexto em mulheres (8/100.000) (2). No Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Santa Maria, constatou-se a prevalência de 1,6% de CG no período de 1986 e 2010 (3).

Os receptores HER1, HER2, HER3 e HER4, também chamados ErbB, são proteínas tirosina-quinases transmembranas que ligam o fator de crescimento epidérmico - EGF - e outras moléculas assemelhadas, foram identificados em 1978. O HER2, estruturalmente uma glicoproteína com 185kD, produto do onco gen c-erbB2-2/neu que se localiza no braço curto do cromossomo 17 (lócus 21) (4;5), foi o segundo receptor identificado. Foi demonstrado recentemente que pacientes com adenocarcinoma gástrico com expressão imunistoquímica positiva para HER2 apresentavam aumento de sobrevida, com a adição de trastuzumab ao esquema quimioterápico(6).

Dados sobre a expressão de HER2 no câncer gástrico ainda são escassos. Este trabalho tem como objetivo investigar a expressão imunistoquímica do HER2 em uma amostra de 48 espécimes de adenocarcinoma gástrico, e estudar a associação desta expressão com os subtipos histológicos de Lauren e com a localização anatômica da lesão.

Material e métodos

Foram selecionados 48 espécimes de adenocarcinoma, de pacientes submetidos a gastrectomias. Destes casos as lâminas de hematoxilina e eosina (HE) foram utilizadas para a identificação das áreas representativas do tumor, para selecionar os blocos de parafina à análise imunistoquímica.

As amostras emblocadas em parafina foram cortadas em micrótomo rotativo, sendo os cortes, na espessura de 3 μ , montados em lâminas silanadas. Após fixação de duas horas em estufa a 60°, os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em bateria decrescente de alcoóis até a água. Iniciou-se o processo de bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, em dois banhos de 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas por 26 minutos na potência máxima (800W), com as lâminas imersas em TRIS-EDTA(pH9). O bloqueio da avidina e biotina endógena foi realizado com kit comercial DAKO, por 10 minutos, sendo depois lavadas em água corrente, água destilada e tampão PBS. A seguir, as lâminas foram incubadas “overnight” na temperatura de 4 a 8 graus e em câmara úmida com o anticorpo primário C-erb B2, clone EP1045Y (Monoclonal antibody, 1:150, Biocare medical, USA) por 12 horas. Seguiu-se o processo com dois banhos de 5 minutos cada, em tampão PBS e incubação com o anticorpo secundário biotilado universal (anti IgG) por 30 minutos e novamente dois banhos de 5 minutos no tampão PBS. Após esta etapa, ocorreu nova incubação com o complexo streptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos e dois banhos de tampão PBS. A reação foi revelada com uma solução de PBS com diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas em uma bateria de 5 alcoóis anidro, clarificadas em três banhos de xilol e montadas com bálsamo sintético.

A expressão imunoistoquímica do HER2 foi descrita com base na porcentagem de células com coloração membranosa, conforme descrito por Hofmann(7), a seguir: grau **0** : ausência de reatividade ou <10% de reatividade nas células tumorais; **1+**: Reatividade fraca em > 10% das células tumorais; com reatividade somente em parte da membrana; **2+**: Moderada reatividade em >10% das células, com marcação em toda a membrana lateral e basolateral;**3+**: Forte reatividade, com marcação intensa da membrana basolateral e lateral em >10% das células. Um bloco de tecido neoplásico de mama sabidamente positivo ao HER2 foi usado em cada técnica imunoistoquímica, como um controle externo positivo.

Foram considerados positivos os casos em que a imunoistoquímica apresentou reatividade 2+ e 3+, e negativa quando foi 0 ou 1+, conforme o escore descrito acima. Nos casos em que a imunoistoquímica foi negativa, um segundo bloco representativo do tumor, de sitio diferente foi analisado para confirmar o achado negativo. Todas as lâminas foram revisadas por patologista com experiência em anatomia patológica do tubo digestivo (MPR) .

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob CAAE número 0115.0.243.000-11.

Resultados

A amostra foi constituída por 42 tumores distais e 6 tumores proximais. De acordo com a classificação de Lauren, 21 eram do subtipo intestinal, 20 do subtipo difuso, e 7 do subtipo misto.

A graduação da expressão imunoistoquímica foi grau 0 em 40 (83,3%) amostras; grau 1+ em 1 (2,1%) amostra; grau 2+ em 4 (8,3%) amostras e 3+ (Figura 2) em 3 (6,3%) amostras. De acordo com os critérios estabelecidos, foram considerados positivos 7 casos, o que corresponde a 14,6% da amostra estudada. Dos 20 casos do subtipo difuso, nenhum foi positivo para o HER2 (figura 1A/B, cinco dos 21 casos do subtipo intestinal apresentaram positividade (figura 1 C/D), o que corresponde a 23,8% dos casos do subtipo intestinal, e nos 7 casos do subtipo misto, 2 se mostraram positivos e nesses somente o componente intestinal apresentou expressão positiva de HER2. Considerando o componente intestinal das lesões, houve uma associação significativa do mesmo para a expressão de HER2 ($p=0,003$). Dos 6 casos de lesão proximal, somente 1 (16,6%) foi positivo para o HER2, e nos 42 casos de lesão distal 6 (14,28%) apresentaram positividade, não sendo observada significância estatística para a associação da expressão de HER2 com a localização anatômica ($p= 0,88$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação da expressão imunoistoquímica de HER2 com os subtipos histológicos de Lauren e localização anatômica do adenocarcinoma gástrico

	HER2 POSITIVO			HER2 NEGATIVO			TOTAL
	DIFUSO	INTESTINAL	MISTO	DIFUSO	INTESTINAL	MISTO	
PROXIMAL	0	1	0	3	2	-	6
DISTAL	0	4	2	17	14	5	42
TOTAL	0	5*	2*	20*	16	5	48

* $p=0,003$.

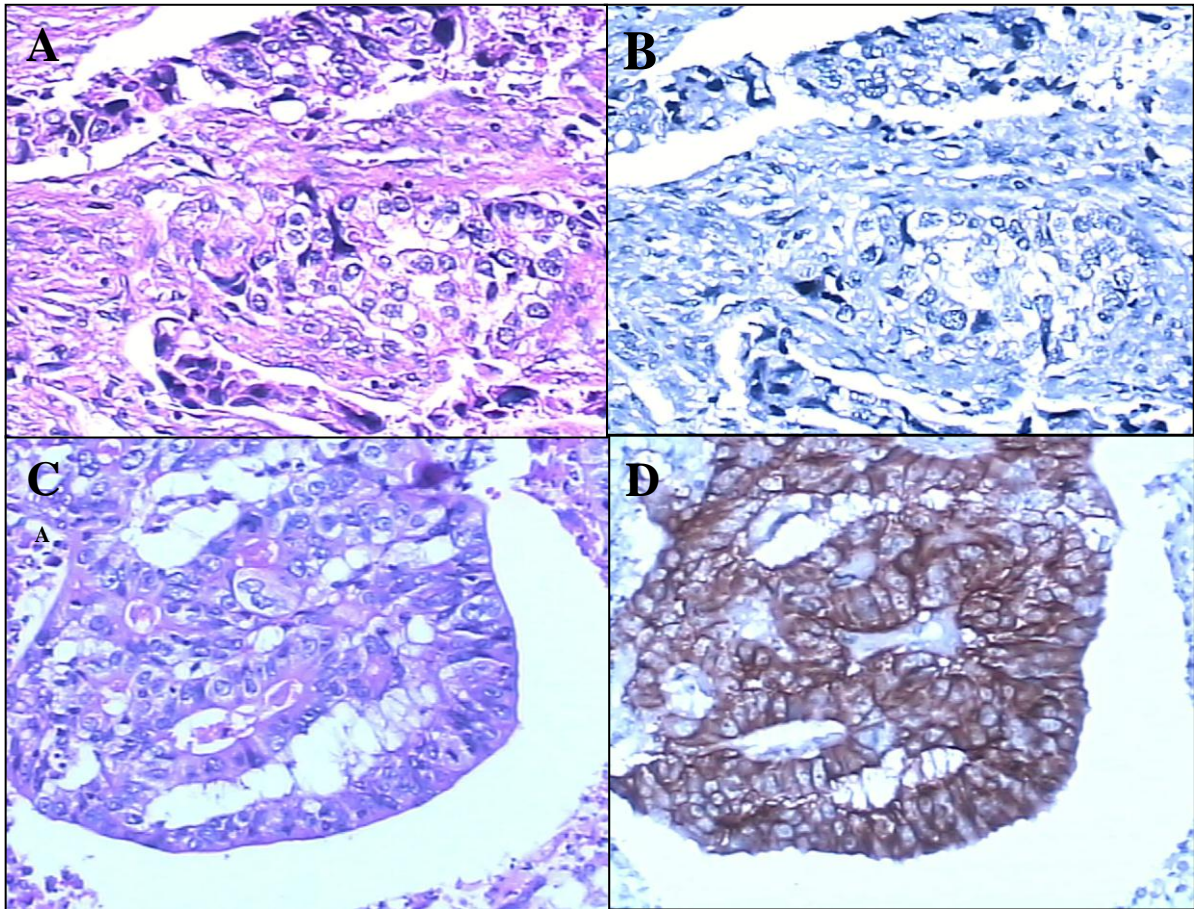


Figura 1 – Adenocarcinoma subtipo difuso de Lauren com aumento de 200X, coloração HE (A) e HER2, negativo (B). Adenocarcinoma subtipo intestinal de Lauren com aumento de 200X, coloração HE (C) e HER2, reativo 3+ (D).

Discussão

No presente estudo, foi encontrada uma taxa global de positividade para o HER2 de 14,6%. Foi observada uma associação significativa da expressão de HER2 com os subtipos intestinal e misto de Lauren, e ausência de associação com o tipo difuso. Nos dois casos do tipo misto, as lâminas foram revisadas, e somente o componente intestinal do tumor foi reativo para o HER2.

Até onde se conhece, este é o primeiro estudo nacional que utilizou critérios imunoistoquímicos específicos para o cancer gástrico, seguindo a proposta por Hofmann em 2008, que desde então uniformizou os critérios imunoistoquímicos de análise do HER2 no que se refere ao adenocarcinoma gástrico(7;8). Os presentes achados são muito semelhantes aos encontrados em estudos americanos e europeus, nos quais as taxas de prevalência do HER2 se situam na faixa de 10-22,8%, sendo que o subtipo histológico predominante em todos os estudos foi o tipo intestinal. Nestes estudos, quando se analisou a localização anatômica não

foi constatada nenhuma diferença entre os tumores proximais com relação aos distais, semelhante ao que foi demonstrado em nosso trabalho (9-13).

Estudos asiáticos também relatam taxas de positividade de 11,7-12%, semelhantes aos presentes achados, assim como o predomínio da positividade de HER2 no subtipo intestinal de Lauren (14-16), havendo somente um estudo japonês com diferença na prevalência do HER2 no que se refere à distribuição anatômica. Neste estudo, foi constatada a prevalência três vezes maior da expressão de HER2 em tumores de localização proximal (16).

Estudo internacional de fase III, randomizado, controlado e multicêntrico, desenhado para demonstrar a eficácia e segurança de uma droga anti-HER 2 (trastuzumab) associada a quimioterapia para tratamento do câncer gástrico avançado e metastático, denominado ToGA Trial, demonstrou que nos pacientes cujas lesões apresentavam positividade para HER2 a associação de trastuzumab ao esquema básico de quimioterapia aumentou a sobrevida em 16 meses, comparado com 11,8 meses nos pacientes que fizeram uso somente da quimioterapia. Este estudo encontrou uma taxa de positividade de HER2 de 22,1%. A expressão do HER2 foi mais alta em lesões do subtipo intestinal, quando comparada com os subtipos difuso/misto semelhante ao aqui relatado. Porém, diferente dos resultados, este estudo encontrou maior expressão de HER2 em tumores proximais, possivelmente, devido ao escasso número de tumores proximais na amostra (6). A maior prevalência de HER2 no estudo ToGA, em relação aos achados e aos dos outros estudos, pode ser decorrente do seu desenho, onde o objetivo era determinar a eficácia do trastuzumab em lesões com expressão de HER2, fato que, possivelmente, superestimou a prevalência de HER2 nos seus resultados.

Até onde se conhece, somente dois estudos sobre a expressão de HER2 em câncer gástrico foram realizados no Brasil. O primeiro estudo realizado por Begmani et al em 2005, analisou a expressão imunoistoquímica em 462 casos e encontrou prevalência da expressão de HER2 da ordem de 12%, com um predomínio do subtipo intestinal de Lauren que correspondeu a 87,5% dos casos positivos. Entretanto, não encontrou diferença quanto a localização anatômica. Embora este estudo tenha demonstrado resultados semelhantes aos inferidos nesta pesquisa, a frequência da expressão de HER2 pode ter sido subestimada, uma vez que utilizou escore de graduação imuno-histoquímica para câncer de mama, em que toda a membrana deve ser marcada, e não somente a parede lateral, e basolateral (17). O segundo estudo realizado no Rio Grande do Sul por Cirne-Lima et al, em 2009, identificou positividade de HER2 em 5,4%, de uma amostra de 37 casos. Este baixo índice pode ser decorrente do escore imunoistoquímico utilizado, da amostra menor, e apresentar um percentual mais baixo do subtipo intestinal (18). No presente estudo, além de utilizar critérios imunoistoquímicos

específicos para análise do cancer gástrico, há uma porcentagem equivalente de tumores do tipo intestinal e difuso, evitando a predominância de um subtipo histológico, o que provavelmente influenciaria na expressão de HER2, que apresenta evidências de ser mais comum no subtipo intestinal.

Analisando-se nos trabalhos anteriores a expressão de HER2 separadamente, no subtipo intestinal e no difuso, encontra-se uma prevalência no primeiro que varia de 6,1-22%, e no segundo subtipo 0-7,6% (7;9-12;14-18). Kataoka e colaboradores em 2013, revisando as amostras do subtipo misto, encontraram resultados semelhantes aos desta pesquisa, revelando positividade para HER2 somente no componente intestinal (15). Este achado corrobora a evidência de que a expressão de HER2 apresenta uma associação mais consistente com o subtipo intestinal de Lauren.

O presente estudo tem a limitação inerente aos estudos retrospectivos, e a amostra com número reduzido de casos de localização proximal pode ter comprometido a análise dos dados referentes à associação da expressão de HER2 com a localização anatômica. Outra limitação é decorrente da não utilização da técnica de FISH para confirmar a expressão imunohistoquímica do HER2 nos casos classificados como 2+, pois, nos casos com classificação imunohistoquímica 2+, quando se avalia a amplificação genica detectada pela técnica de FISH, é encontrada uma taxa de positividade que varia de 36,4% até 66% casos. Esta questão é relevante, uma vez que somente os casos com classificação 3+ e os com classificação 2+ e positivos para FISH apresentam evidências mais consistentes de benefício da introdução do trastuzumab no esquema quimioterápico (7;11;14;15). Com o advento do trastuzumab, a acurada determinação da expressão de HER2 no adenocarcinoma gástrico se tornou importante para a identificação dos pacientes que irão se beneficiar desta terapia. Novos estudos que se proponham a identificar a positividade de HER2 no câncer gástrico, além de utilizarem desenho prospectivo, devem utilizar o escore adequado para interpretação da expressão e a confirmação pela técnica de FISH.

Conclusão

O presente trabalho demonstrou positividade da expressão de HER2 em 14,6% dos casos de adenocarcinoma gástrico, com predomínio no subtipo intestinal de Lauren, e não encontrou diferença na expressão relacionada à localização anatômica das lesões.

Bibliografia

- (1) Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24(14):2137-2150.
- (2) Brasil.Ministério da Saúde.Secretaria de Atenção à Saúde.Instituto Nacional de Câncer.Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. INCA 2011. In press 2011.
- (3) Rampazzo A, Mott GL, Fontana K, Fagundes RB. Gastric adenocarcinoma trends in the central region of Rio Grande do Sul (Southern Brazil): what has changed in 25 years? *Arq Gastroenterol* 2012; 49(3):178-183.
- (4) Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K 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.
- (5) Rose JS, Bekaii-Saab TS. New developments in the treatment of metastatic gastric cancer: focus on trastuzumab. *Onco Targets Ther* 2011; 4:21-26.
- (6) Bang YJ, van CE, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376(9742):687-697.
- (7) Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van d, V, Kim W et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52(7):797-805.
- (8) Jorgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology* 2010; 78(1):26-33.
- (9) Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010; 457(3):299-307.
- (10) Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Muller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol* 2010; 32(1-2):57-65.
- (11) Barros-Silva JD, Leitao D, Afonso L, Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Fragoso M et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* 2009; 100(3):487-493.
- (12) Kunz PL, Mojtahed A, Fisher GA, Ford JM, Chang DT, Balise RR et al. HER2 expression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a US population: clinicopathologic analysis with proposed approach to HER2 assessment. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20(1):13-24.

- (13) Gomez-Martin C, Garralda E, Echarri MJ, Ballesteros A, Arcediano A, Rodriguez-Peralto JL et al. HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer. *J Clin Pathol* 2012; 65(8):751-757.
- (14) Zhou F, Li N, Jiang W, Hua Z, Xia L, Wei Q et al. Prognosis significance of HER-2/neu overexpression/amplification in Chinese patients with curatively resected gastric cancer after the ToGA clinical trial. *World J Surg Oncol* 2012; 10(1):274.
- (15) Kataoka Y, Okabe H, Yoshizawa A, Minamiguchi S, Yoshimura K, Haga H et al. HER2 expression and its clinicopathological features in resectable gastric cancer. *Gastric Cancer* 2013; 16(1):84-93.
- (16) Kim KC, Koh YW, Chang HM, Kim TH, Yook JH, Kim BS et al. Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: comparative analysis of 1,414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(10):2833-2840.
- (17) Begnami MD, Campos AH, Silva E, Montagnini AL, Nascimento CF, Nonogaki S et al. Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos. *J Bras Pato Med Lab* 2005; 41(4):279-286.
- (18) Cirne-Lima FK, Rosa AS, Kulczynski JM, Mattana DS, Corezolla K, Moreira LF. Immunohistochemical expression of HER-2/NEU-CERBB-2 in patients with adenocarcinoma of the stomach. *Rev Col Bras Cir* 2009; 36(2):131-134.

CONCLUSÕES

Este estudo identificou:

1) Prevalência de 14,6% de positividade da expressão imunoistoquímica de HER2 em adenocarcinoma gástrico.

2) A expressão imunoistoquímica de HER2 foi significativamente mais frequente nas lesões no subtipo intestinal de Lauren

3) Não houve diferença na expressão imunoistoquímica de HER2 entre os tumores proximais e os distais, entretanto, este achado pode ter sido afetado pelo reduzido número de lesões proximais.

O presente estudo permite sugerir que os tumores gástricos com diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma do subtipo intestinal sejam testados para a expressão imunoistoquímica de HER2, visando a utilização de trastuzumab no tratamento.

REFERÊNCIAS

- (1) KAMANGAR F, DORES GM, ANDERSON WF. **Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world.** J Clin Oncol 2006; 24(14):2137-2150.
- (2) NAGINI S. **Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention.** World J Gastrointest Oncol 2012; 4(7):156-169.
- (3) BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE.Secretaria de Atenção à Saúde.Instituto Nacional de Câncer.Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012:** Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. INCA 2011. In press 2011.
- (4) RAMPAZZO A, MOTT GL, FONTANA K, FAGUNDES RB. **Gastric adenocarcinoma trends in the central region of Rio Grande do Sul (Southern Brazil): what has changed in 25 years?** Arq Gastroenterol 2012; 49(3):178-183.
- (5) KATO M, ASAKA M. **Recent development of gastric cancer prevention.** Jpn J Clin Oncol 2012; 42(11):987-994.
- (6) SELGRAD M, BORNSCHEIN J, ROKKAS T, MALFERTHEINER P. **Helicobacter pylori: gastric cancer and extragastric intestinal malignancies.** Helicobacter 2012; 17 Suppl 1:30-35.
- (7) MULLER LB, FAGUNDES RB, MORAES CC, RAMPAZZO A. **Prevalence of Helicobacter pylori infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia.** Arq Gastroenterol 2007; 44(2):93-98.
- (8) ZHONG C, LI KN, BI JW, WANG BC. **Sodium intake, salt taste and gastric cancer risk according to helicobacter pylori infection, smoking, histological type and tumor site in china.** Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(6):2481-2484.
- (9) GUGGENHEIM DE, SHAH MA. **Gastric cancer epidemiology and risk factors.** J Surg Oncol 2013; 107(3):230-236.

- (10) TRAMACERE I, NEGRI E, PELUCCHI C, BAGNARDI V, ROTA M, SCOTTI L ET AL. **A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk.** Ann Oncol 2012; 23(1):28-36.
- (11) MAHJUB H, SADRI G. **Association between Alcohol Consumption and Gastric Cancer: A Meta-Analysis.** J Res Health Sci 2007; 7(2):63-72.
- (12) ROBBINS SL. **Patologia - Bases patológica das Doenças.** 7 ed ed. Rio de Janeiro: 2005.
- (13) FOCK KM, TALLEY N, MOAYYEDI P, HUNT R, AZUMA T, SUGANO K ET AL. **Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention.** J Gastroenterol Hepatol 2008; 23(3):351-365.
- (14) FOCK KM, KATELARIIS P, SUGANO K, ANG TL, HUNT R, TALLEY NJ et al. **Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for Helicobacter pylori infection.** J Gastroenterol Hepatol 2009; 24(10):1587-1600.
- (15) COORDENAÇÃO GERAL DE AÇÕES ESTRATÉGICAS CdE, organização Luiz Claudio Santos. **ABC do Cancer.** 2 ed. 2012.
- (16) VIUDEZ-BERRAL A, MIRANDA-MURUA C, A ET AL. **Current management of gastric cancer.** Rev Esp Enferm Dig 2012; 104(3):134-141.
- (17) WASHINGTON K. **7th edition of the AJCC cancer staging manual:** stomach. Ann Surg Oncol 2010; 17(12):3077-3079.
- (18) CUNNINGHAM D, ALLUM WH, STENNING SP, et al. **Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer.** N Engl J Med 2006; 355(1):11-20.
- (19) BANG YJ, KIM YW, YANG HK, et al. **Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial.** Lancet 2012; 379(9813):315-321.
- (20) MACDONALD JS, SMALLEY SR, BENEDETTI J, 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.

- (21) FUKUSHIGE S, MATSUBARA K, YOSHIDA M, 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.
- (22) FUKUSHIGE S, MATSUBARA K, YOSHIDA M, 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.
- (23) FREITAS CS. **Estendendo o Conhecimento sobre a familia HER-Receptores para o Fator de Crescimento Epideérmico e seus ligantes ás Malignidades Hematoógicas.** Revista brasileira de Cancerologia 2008; 54(1):79-86.
- (24) ROSE JS, BEKAI-SAAB TS. **New developments in the treatment of metastatic gastric cancer: focus on trastuzumab.** Onco Targets Ther 2011; 4:21-26.
- (25) ROSKOSKI R, JR. **The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer.** Biochem Biophys Res Commun 2004; 319(1):1-11.
- (26) SPECTOR NL, BLACKWELL KL. **Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer.** J Clin Oncol 2009; 27(34):5838-5847.
- (27) TAPIA C, GLATZ K, NOVOTNY H, et al. **Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin.** Mod Pathol 2007; 20(2):192-198.
- (28) YAMAMOTO T, IKAWA S, AKIYAMA T, ET AL. **Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor.** Nature 1986; 319(6050):230-234.
- (29) YONEMURA Y, NINOMIYA I, YAMAGUCHI A, et al. **Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer.** Cancer Res 1991; 51(3):1034-1038.
- (30) JORGENSEN JT. **Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer.** Oncology 2010; 78(1):26-33.
- (31) ROH JK, PAIK S, CHUNG HC, et al. **Overexpression of erbB-2 protein in gastric adenocarcinoma--a potential role in therapeutic response to adjuvant 5-FU-doxorubicin regimen.** Gan To Kagaku Ryoho 1992; 19(8 Suppl):1207-1219.

- (32) LEE HR, KIM JH, UHM HD, et al. **Overexpression of c-ErbB-2 protein in gastric cancer by immunohistochemical stain.** *Oncology* 1996; 53(3):192-197.
- (33) SHUN CT, WU MS, LIN JT, et al. **Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, Helicobacter pylori infection and prognosis in gastric cancer.** *Hepatogastroenterology* 1997; 44(14):604-609.
- (34) OOI A, KOBAYASHI M, MAI M, NAKANISHI I. **Amplification of c-erbB-2 in gastric cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence in situ hybridization.** *Lab Invest* 1998; 78(3):345-351.
- (35) ISHIKAWA T, KOBAYASHI M, MAI M, SUZUKI T, OOI A. **Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization.** *Am J Pathol* 1997; 151(3):761-768.
- (36) WU MS, SHUN CT, WANG HP, et al. **Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and Helicobacter pylori infection.** *Gastroenterology* 1997; 112(5):1457-1465.
- (37) ALLGAYER H, BABIC R, GRUETZNER KU. **C-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems.** *J Clin Oncol* 2000; 18(11):2201-2209.
- (38) OUGOLKOV A, MAI M, TAKAHASHI Y, et al. **Altered expression of beta-catenin and c-erbB-2 in early gastric cancer.** *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19(3):349-355.
- (39) WANG YL, SHEU BS, YANG HB, LIN PW, CHANG YC. **Overexpression of c-erbB-2 proteins in tumor and non-tumor parts of gastric adenocarcinoma--emphasis on its relation to H. pylori infection and clinicohistological characteristics.** *Hepatogastroenterology* 2002; 49(46):1172-1176.
- (40) GHADERI A, VASEI M, MALECK-HOSSEINI SA, et al. **The expression of c-erbB-1 and c-erbB-2 in Iranian patients with gastric carcinoma.** *Pathol Oncol Res* 2002; 8(4):252-256.
- (41) TAKEHANA T, KUNITOMO K, KONO K, et al. **Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay.** *Int J Cancer* 2002; 98(6):833-837.

- (42) PINTO-DE-SOUSA J, DAVID L, ALMEIDA R, et al. **C-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma.** *Int J Surg Pathol* 2002; 10(4):247-256.
- (43) YANO T, DOI T, OHTSU A, BOKU N et al. **Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer.** *Oncol Rep* 2006; 15(1):65-71.
- (44) PARK DI, YUN JW, et al. **HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer.** *Dig Dis Sci* 2006; 51(8):1371-1379.
- (45) YU GZ, CHEN Y, WANG JJ. **Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135(10):1331-1339.
- (46) ALBARELLO L, PECCIARINI L, DOGLIONI C. **HER2 testing in gastric cancer.** *Adv Anat Pathol* 2011; 18(1):53-59.
- (47) ASIOLI S, MALETTA F, VERDUN DI CL et al. **Approaching heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 in surgical specimens of gastric cancer.** *Hum Pathol* 2012; 43(11):2070-2079.
- (48) GRILLO F, FASSAN M, CECCAROLI C, et al. **The Reliability of Endoscopic Biopsies in Assessing HER2 Status in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: A Study Comparing Biopsies with Surgical Samples.** *Transl Oncol* 2013; 6(1):10-16.
- (49) PIRRELLI M, CARUSO ML, DI MM, ARMENTANO R, VALENTINI AM. **Are Biopsy Specimens Predictive of HER2 Status in Gastric Cancer Patients?** *Dig Dis Sci* 2012.
- (50) HOFMANN M, STOSS O, SHI D, et al. **Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study.** *Histopathology* 2008; 52(7):797-805.
- (51) BANG YJ, VAN CE, FEYEREISLOVA A, et al. **Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial.** *Lancet* 2010; 376(9742):687-697.

- (52) KANG YK, BANG Y, LORDICK F, et al. **Incidence of gastric and gastro-esophageal cancer in the ToGA trail: Correlation with HER2 positivity.** 2008 Gastrointestinal Carcners Sinposium . 2008.
Ref Type: Abstract
- (53) KUNZ PL, MOJTAHED A, FISHER GA, et al. **HER2 expression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a US population: clinicopathologic analysis with proposed approach to HER2 assessment.** Appl Immunohistochem Mol Morphol 2012; 20(1):13-24.
- (54) GRABSCH H, SIVAKUMAR S, GRAY S, 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.
- (55) BARROS-SILVA JD, LEITAO D, AFONSO L et al. **Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients.** Br J Cancer 2009; 100(3):487-493.
- (56) GOMEZ-MARTIN C, GARRALDA E, ECHARRI MJ, et al. **HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer.** J Clin Pathol 2012; 65(8):751-757.
- (57) RUSCHOFF J, DIETEL M, BARETTON G, et al. **HER2 diagnostics in gastric cancer- guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing.** Virchows Arch 2010; 457(3):299-307.
- (58) KATAOKA Y, OKABE H, YOSHIZAWA A, et al. **HER2 expression and its clinicopathological features in resectable gastric cancer.** Gastric Cancer 2013; 16(1):84-93.
- (59) KIM KC, KOH YW, CHANG HM, et al. **Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: comparative analysis of 1,414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays.** Ann Surg Oncol 2011; 18(10):2833-2840.
- (60) ZHOU F, LI N, JIANG W, et al. **Prognosis significance of HER-2/neu overexpression/amplification in Chinese patients with curatively resected gastric cancer after the ToGA clinical trial.** World J Surg Oncol 2012; 10(1):274.
- (61) GÁRATE BB, BERROCAL AY. **Expresión de HER2 en Cancer Gástrico en el Perú.** Rev Gastroenterol Perú 2010; 30(4):324-327.

(62) BEGNAMI MD, CAMPOS AH, et al. **Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos.** J Bras Pato Med Lab 2005; 41(4):279-286.

(63) CIRNE-LIMA FK, ROSA AS, KULCZYNSKI JM, MATTANA DS, COREZOLLA K, MOREIRA LF. **Immunohistochemical expression of HER-2/NEU-CERBB-2 in patients with adenocarcinoma of the stomach.** Rev Col Bras Cir 2009; 36(2):131-134.