

Renato Santos Laboissière

AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER GÁSTRICO: CORRELAÇÃO
ENTRE EXPRESSÃO PROTEICA, AMPLIFICAÇÃO GÊNICA E
CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte – MG

2016

Laboissière, Renato Santos.
L122a Avaliação do HER2 em câncer gástrico [manuscrito]: correlação entre expressão proteica, amplificação gênica e características clinicopatológicas. / Renato Santos Laboissière. - - Belo Horizonte: 2016.
87f.: il.
Orientador (a): Helenice Gobbi.
Coorientador (a): Mônica Maria Demas Álvares Cabral.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Fator de Crescimento Epidérmico. 2. Neoplasias Gástricas. 3. Imuno-Histoquímica. 4. Amplificação de Genes. 5. Metástase Neoplásica. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Gobbi, Helenice. II. Cabral, Mônica Maria Demas Álvares. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 320

Renato Santos Laboissière

AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER GÁSTRICO: CORRELAÇÃO ENTRE
EXPRESSÃO PROTEICA, AMPLIFICAÇÃO GÊNICA E CARACTERÍSTICAS
CLINICOPATOLÓGICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção de grau de Doutor em Patologia. Área de concentração: Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi

Coorientadora: Profa. Dra. Mônica Maria
Demas Álvares Cabral

Belo Horizonte
Fevereiro de 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER GÁSTRICO: CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO PROTEICA, AMPLIFICAÇÃO GÊNICA E CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

RENATO SANTOS LABOISSIÈRE

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Helenice Gobbi - Orientador
UFTM

Prof(a). Monica Maria Demas Alvares Cabral
UFMG

Prof(a). Marina De Brot Andrade
UFMG

Prof(a). Luciene Simões de Assis Tafuri
FUMEC

Prof(a). Rafael Malagoli Rocha
Fundação Antônio Prudente

Prof(a). Luiz Gonzaga Vaz Coelho
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2016.

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pesquisa em Patologia Mamária (LPM) e em Patologia do Trato Gastrointestinal (LP-TGI), ambos do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal (APM) da Faculdade de Medicina da UFMG e também no Laboratório de Patologia do Hospital A.C. Camargo em São Paulo, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

*A todas as mulheres da minha vida,
que me inspiram diariamente a ser o homem que sou*

Esse trabalho é fruto do apoio irrestrito que recebi e que recebo sempre das muitas pessoas a minha volta, às quais não poderia deixar de agradecer nesse momento.

À **minha mãe** por ter me ensinado, mesmo que inconscientemente, o prazer inestimável que há na tarefa de se ensinar os outros. Dedico a você e ao nosso amor este trabalho.

Ao **meu pai** por ter me aberto todas as portas que há no mundo e ter respeitado a minha vontade de abrir algumas outras por conta própria.

À **Carol** e ao fato de torcermos um pelo outro, sempre.

Aos meus queridos colegas de laboratório **Marcelo e Cristiana Buzelin, Rafael Malagoli, Débora Balabram e Marina De Brot**, pela incalculável contribuição em todas as etapas dessa jornada.

Ao **Professor Luiz Gonzaga Vaz Coelho**, pessoa de caráter e determinação inabaláveis.

Aos funcionários e residentes do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial à **Laudilene e Angélica** pela agradável convivência nesses quatro anos.

Aos meus amigos e familiares que sempre torcem e acreditam em mim, especialmente aos meus “padrinhos”, **Luciana de Paula Lima Gazzola e Frederico Henrique Correa de Melo**, que me abençoam em tudo que faço em minha carreira acadêmica e profissional.

A todos os meus **alunos** que diariamente renovam a minha alegria de viver e conferem sentido próprio a minha existência.

À **Professora Helenice Gobbi** por ter acolhido no seio do Laboratório de Patologia Mamária, sem restrições, um aficionado pela patologia gastrointestinal. Espero que o vínculo “mama-estômago”, formado ao longo desses quatro anos, resista visceralmente por muitos outros.

À **Professora Mônica Maria Demas Álvares Cabral** a quem devo agradecer pela amizade nas horas mais incertas desde a época da residência médica e pelos iluminados conselhos à sombra das árvores do estacionamento da Faculdade de Medicina da UFMG.

À saudosa **Professora Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira** (*in memoriam*) e à minha querida **tia Nilda dos Santos** (*in memoriam*) por terem influenciado profundamente a concepção desse estudo e às quais também dedico cada página dessa história.

A **Deus** por ter me proporcionado disposição e oportunidade para conhecer todas essas pessoas e aos **pacientes** que são o propósito de qualquer estudo sobre a saúde humana.

***“Just a spoonful of sugar helps
the medicine go down
in a most delightful way”***

*Spoonful of Sugar do filme Mary Poppins
composição de Richard Sherman e Robert Sherman*

RESUMO

Introdução: O câncer gástrico é comumente diagnosticado em um estágio avançado da doença, quando são escassas as opções de tratamento. Recentemente aprovou-se o uso de trastuzumabe em pacientes com tumores gástricos positivos para HER2. Embora a terapia anti-HER2 seja indicada para carcinomas metastáticos, o teste HER2 é feito no tumor primário. Além disso, são escassos os dados sobre o *status* HER2 entre pacientes brasileiros. **Objetivo:** Caracterizar o *status* HER2 em uma série de pacientes brasileiros com câncer gástrico, reportar associações com dados clinicopatológicos e obter a taxa de concordância para a expressão de HER2 entre tumores primários e linfonodos metastáticos pareados. **Material e Métodos:** Cortes histológicos de 137 gastrectomias primárias e linfadenectomias foram revistos e seus relatórios patológicos foram recuperados dos arquivos em um hospital universitário brasileiro. A imuno-histoquímica foi realizada em cortes de tecido inteiro de cada tumor gástrico, usando dois anticorpos primários anti-HER2, e em 85 casos com metástases linfonodais. Tumores primários equívocos para HER2 foram submetidos à hibridização *in situ* automatizada para amplificação gênica. Comparou-se o *status* HER2 com características clinicopatológicas para avaliar associações estatisticamente significativas. **Resultados:** Usando o anticorpo 4B5, a análise imuno-histoquímica revelou 13/124 casos (10,5%) positivos para HER2 (3+), 10/124 casos (8,1%) equívocos (2+) e 101/124 casos (81,4%) negativos, sendo 7/124 casos 1+. Não houve amplificação de nenhum caso equívoco. A taxa de positividade para HER2 foi de 10,5%. Houve uma associação entre o *status* HER2 positivo e tipo intestinal ($P=0,048$), baixo grau tumoral ($P=0,004$) e presença de invasão linfática ($P=0,031$). Não se verificou associação com a topografia do tumor. Usando o kit HercepTest®, a análise imuno-histoquímica revelou superexpressão de HER2 (3+ ou 2+) em 17/137 tumores primários (12,4%) e 12/85 linfonodos metastáticos (14,1%). A taxa de concordância foi de 88,2% (κ : 0,515, indicativo de concordância moderada). Dez casos foram discordantes, dos quais cinco (5,9%) eram HER2 positivo no câncer primário e negativo na metástase, enquanto os outros cinco (5,9%) apresentaram resultado negativo no tumor primário e positividade para HER2 na metástase linfonodal. **Conclusões:** Comparado a outros estudos, a menor frequência de casos positivos para HER2 em nossa série pode ser parcialmente explicada pelo menor número de tumores da junção esofagogástrica em pacientes brasileiros em relação aos carcinomas gástricos distais. Isso também poderia explicar a ausência de associação com a topografia do tumor. Além disso, como alguns pacientes elegíveis para a terapia anti-HER2 podem não ser selecionados se a imuno-histoquímica for feita apenas em tumores primários, o teste para HER2 em metástases linfonodais é incentivado, considerando que o *status* HER2 pode mudar entre as amostras de tumor primário e metástases correspondentes.

Palavras-chave: HER2; câncer gástrico; imuno-histoquímica; amplificação gênica; parâmetros clinicopatológicos; metástase linfonodal.

ABSTRACT

Introduction: Gastric cancer is usually diagnosed in an advanced stage of disease and treatment options are sparse. Trastuzumab was recently approved for patients with HER2-positive gastric tumors. Although anti-HER2 treatment is indicated for metastatic carcinomas, HER2 testing is performed in the primary tumor. Moreover, data on HER2 status among Brazilian patients are limited. **Objective:** Our aim was to characterize HER2 status in a series of Brazilian patients with gastric cancer, report any associations with clinicopathological data and obtain the concordance rate for HER2 expression between primary tumors and paired metastatic lymph nodes. **Methods:** Histological slides from 137 primary gastrectomies and lymphadenectomies were reviewed and their pathological reports were retrieved from the files at a Brazilian university hospital. Immunohistochemistry was performed on whole-tissue sections from each gastric tumor using two primary anti-HER2 antibodies and from paired lymph node metastases in 85 cases. HER2-equivocal cases in primary tumors were submitted to automated dual *in situ* hybridization for gene amplification. HER2 status was confronted with clinicopathological features to assess statistically significant associations. **Results:** Using the 4B5 anti-HER2 antibody, immunohistochemistry analysis revealed that 13/124 cases (10.5%) were HER2 positive (3+), 10/124 cases (8.1%) were equivocal (2+) and 101/124 cases (81.4%) were negative, being 7/124 cases 1+. None of the equivocal cases showed gene amplification. The overall HER2 positivity rate was 10.5%. There was an association between HER2-positive status and Laurén's intestinal subtype ($P=0.048$), low-grade tumors ($P=0.004$) and presence of lymphovascular invasion ($P=0.031$). No association was found with tumor topography. Using the HercepTest™ kit, immunohistochemistry analysis revealed that 17/137 primary tumors (12.4%) and 12/85 metastatic lymph nodes (14.1%) showed HER2 overexpression (3+ or 2+). The concordance rate was of 88.2% (κ -value of 0.515, indicative of a moderate agreement). There were 10 discordant cases, from which five cases (5.9%) were HER2 positive in the primary cancer and negative in nodal metastases, while five cases (5.9%) showed a negative result in the surgical resection specimen and HER2 positivity in metastatic deposits. **Conclusions:** Confronted with data published by other authors, the lower percentage of HER2-positive cases in our series might be partially explained by the lower number of tumors from the gastroesophageal junction in comparison with distal gastric carcinomas in Brazilian patients. This could also account for the lack of statistically significant association with tumor topography. Furthermore, since eligible patients for anti-HER2 treatment may remain undetected if immunohistochemistry is performed only in primary tumors, HER2 testing in lymph node metastases is encouraged as HER2 status can change between primary and corresponding metastatic samples.

Keywords: HER2; gastric cancer; immunohistochemistry; gene amplification; clinicopathological features; lymph node metastasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

AJEG – adenocarcinoma da junção esofagogástrica

APM – Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEP17 – centrômero do cromossomo 17

CG – carcinoma gástrico

CISH – hibridização *in situ* cromogênica

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa

EMEA – *European Medicine Agency*

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FDA – *Food and Drug Administration*

FISH – hibridização *in situ* fluorescente

HC – Hospital das Clínicas

IHQ – imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional de Câncer

ISH – hibridização *in situ*

JEG – junção esofagogástrica

LPM – Laboratório de Pesquisa em Patologia Mamária

LP-TGI – Laboratório de Pesquisa em Patologia do Trato Gastrointestinal

NA – não avaliado

OMS – Organização Mundial da Saúde

pM – nível de estadiamento de acordo com presença de metástases à distância

pN – nível de estadiamento de acordo com metástases em linfonodos regionais

pT – nível de estadiamento de acordo com características do tumor primário

SISH – hibridização *in situ* pela prata

SJED – Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva

SUS – Sistema Único de Saúde

TMA – microarranjos de tecido

TNM – sistema de estadiamento de neoplasias malignas sólidas

ToGA – estudo clínico *Trastuzumab for Gastric Cancer*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Estudos sobre o HER2 no câncer gástrico envolvendo grandes casuísticas	23
Tabela 2 – Estudos sobre o HER2 no câncer gástrico envolvendo casuísticas brasileiras	25
Tabela 3 – Análise da amplificação do gene <i>HER2</i> por hibridização <i>in situ</i>	33
Figura 1 – Comparação do padrão típico de coloração imuno-histoquímica para HER2: (A) membranas completo no câncer de mama e (B) membranas incompleto no câncer gástrico. (A e B: imuno-histoquímica com anticorpo anti-HER2 clone 4B5, aumento de 400x)	19
Figura 2 – Fluxograma para seleção de pacientes com carcinoma gástrico ou adenocarcinoma da junção esofagogástrica metastáticos, elegíveis ao tratamento com trastuzumabe	20
Figura 3 – Representação esquemática da graduação da expressão proteica do HER2 por imuno-histoquímica utilizando-se a “regra da magnificação”	32
Figura 4 – Exemplo de caso de câncer gástrico amplificado pela técnica de hibridização <i>in situ</i> pela prata, evidenciando <i>clusters</i> , aglomerados de cópias do gene <i>HER2</i> em preto (aumento de 400x)	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CARCINOMA GÁSTRICO E ADENOCARCINOMA DA JUNÇÃO ESOFAGOGÁSTRICA	14
1.2. HER2 E TERAPIA ANTI-HER2	17
1.3. HER2 NO CÂNCER GÁSTRICO	18
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. CASUÍSTICA (CRITÉRIOS DE INCLUSÃO)	28
3.2. REVISÃO HISTOPATOLÓGICA E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE PARAFINA	28
3.2.1. CASOS DE TUMOR PRIMÁRIO	28
3.2.2. CASOS DE TUMOR SECUNDÁRIO (METÁSTASES LINFONODAIS)	29
3.3. ELABORAÇÃO DO BANCO DE DADOS	29
3.4. ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE HER2 POR IHQ	30
3.4.1. REALIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE IHQ	30
3.4.2. INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES DE IHQ	31
3.5. ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO GÊNICA DE HER2 POR SISH	32
3.5.1. REALIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE SISH	32
3.5.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE SISH	32
3.6. ESTUDO ESTATÍSTICO	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO BMC GASTROENTEROLOGY	36
4.2. ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE	45
5. CONCLUSÕES	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. ANEXOS	79

ANEXO A – PROTOCOLO DE ANÁLISE DE PEÇAS CIRÚRGICAS DE CARCINOMA GÁSTRICO UTILIZADO NO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM PATOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL	79
ANEXO B - PROTOCOLO PARA ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO COM O KIT HERCEPTEST®	81
ANEXO C – COMPROVANTE DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO	83
ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	84
ANEXO E – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	85
ANEXO F – ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO	86
ANEXO G – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DA TESE	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARCINOMA GÁSTRICO E ADENOCARCINOMA DA JUNÇÃO ESOFAGOGÁSTRICA

Carcinoma gástrico (CG) representa a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada no estômago, perfazendo 90% dos casos de tumores malignos que surgem neste órgão (COLEMAN et al., 1993). Apresenta características morfológicas extremamente heterogêneas que refletem sua complexa carcinogênese (FENOGLIO-PREISER et al., 1996). A exemplo do que ocorre de um modo geral nas neoplasias malignas, múltiplos fatores podem estar envolvidos na origem e no desenvolvimento do CG. Segundo modelo clássico proposto para a carcinogênese gástrica, destacam-se a infecção pelo *Helicobacter pylori*, características da dieta e fatores genéticos, bem como a presença de condições pré-cancerosas, como gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal, além de lesões pré-cancerosas, como as displasias de alto e baixo grau (CORREA, 1992; CORREA et al., 1975).

A heterogeneidade do CG se reflete nos diversos sistemas de classificação desenvolvidos para caracterizá-lo, que são baseados em diferentes abordagens: tipo histológico, padrão macroscópico, topografia, padrão de crescimento, grau histológico de diferenciação ou histogênese da neoplasia (BORRMANN, 1926; BOSMAN et al., 2010; CARNEIRO, 1997; LAURÉN, 1965; MING, 1977).

Estatísticas indicam que, a cada ano, aproximadamente 950.000 novos casos de CG sejam diagnosticados no mundo, perfazendo cerca de 7% do total de diagnósticos de câncer globalmente (FERLAY et al., 2015; POWER et al., 2010). Estima-se ainda que ocorram 720.000 óbitos decorrentes dessa doença anualmente, caracterizando-a como a terceira causa de morte por câncer em ambos os sexos no mundo (FERLAY et al., 2015). A distribuição do número de casos de CG entre diferentes partes do globo não é homogênea, identificando-se regiões de alta incidência como Japão, China e Coréia, com mais de 15 casos por 100.000 habitantes, e países como Austrália e Estados Unidos registrando níveis mais baixos, da ordem de menos de 7 casos por 100.000 habitantes (FERLAY et al., 2015; FORMAN et al., 2006).

Segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2016, serão diagnosticados 596.000 novos casos de câncer no Brasil. Desconsiderando-se os tumores de pele não melanomas, o CG figura como o quarto e quinto diagnósticos mais frequentes de câncer no país em homens e mulheres, respectivamente. Baseando-se exclusivamente em neoplasias malignas que surgem no trato gastrointestinal, o CG ocupa o segundo lugar entre os diagnósticos de câncer em brasileiros de ambos os sexos, ficando atrás apenas do carcinoma colorretal. Esses valores correspondem a um risco estimado anual de 13,04 novos casos a cada 100 mil homens e 7,37 novos casos para cada 100 mil mulheres, situando o Brasil entre os países com incidência elevada de CG (FERLAY et al., 2015; INCA, 2016).

A razão incidência/mortalidade do CG é notoriamente alta em todas as partes do mundo, sendo a sobrevida em cinco anos considerada baixa: 30% na maioria dos países desenvolvidos e 20% para os países em desenvolvimento (KAMANGAR et al., 2006). Apesar dos valores ainda elevados de mortalidade, há uma tendência de melhoria nas taxas de sobrevida com os avanços da endoscopia digestiva e consequente detecção de tumores em estágio mais precoce (FORMAN et al., 2006). Observações epidemiológicas realizadas no Brasil, contudo, permitem afirmar que infelizmente essas tendências de melhoria são menos pronunciadas em nosso meio, onde os diagnósticos são em geral tardios (BUSTAMANTE-TEIXEIRA et al., 2006; CAMPOS et al., 2012; LEMES et al., 2003).

Adenocarcinoma da junção esofagogástrica (AJEG) engloba um conjunto de neoplasias malignas com características clínicas e vias carcinogênicas distintas, estando assim reunidas pelo fato de acometerem o mesmo sítio anatômico e apresentarem diagnóstico de adenocarcinoma à histologia. Incluem-se nessa categoria tumores que surgem na própria junção esofagogástrica (JEG) ou que infiltram essa região por continuidade a partir de tumores originários no esôfago distal ou no estômago proximal. Embora não haja consenso na literatura a respeito dessa classificação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que todo adenocarcinoma que acometa a JEG seja incluído nessa categoria, independentemente de sua origem: gástrica ou esofágica (BOSMAN et al., 2010). A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) recomenda ainda que, para fins de estadiamento, sejam aplicados os critérios das neoplasias esofágicas para avaliação dos carcinomas gástricos que cruzem a JEG e que se estendam até no máximo os cinco centímetros proximais do estômago (EDGE et al., 2010).

Todas essas dificuldades para classificação dos tumores que acometem a JEG refletem-se na escassez de dados específicos publicados sobre a epidemiologia dessas lesões, dificultando sua compreensão. Constata-se, no entanto, que, embora se observe declínio na incidência relativa mundial do CG nas últimas décadas, nota-se tendência inversa para os casos de AJEG, principalmente em países da Europa ocidental e entre norte-americanos. Muitos desses casos de AJEG encontram-se relacionados à história prévia de doença do refluxo gastresofágico, esofagite de refluxo e desenvolvimento de esôfago de Barrett, correspondendo a casos originados no esôfago distal (RUTEGÅRD et al., 2011). Não há relatos, todavia, que apontem se essa tendência de aumento na incidência também é válida para os casos de AJEG originados no estômago proximal.

O prognóstico do CG e do AJEG baseia-se essencialmente no seu estadiamento em relação à profundidade de invasão tumoral na parede do órgão e à presença de metástases linfonodais (SOBIN et al., 2009). Essas características, aliadas a outros dados anatomopatológicos, como tipo histológico do tumor e presença de invasão vascular, bem como à condição clínica dos pacientes, definem os rumos do tratamento (BOSMAN et al., 2010). A abordagem cirúrgica com propósitos curativos é atualmente considerada a única intervenção capaz de eficientemente prolongar a sobrevida em ambas as neoplasias (POWER et al., 2010). Entretanto, como muitos diagnósticos são realizados em estágio localmente avançado ou metastático da doença, a taxa de sobrevida global permanece desfavorável em muitos países, inclusive no Brasil (BUSTAMANTE-TEIXEIRA et al., 2006; CAMPOS et al., 2012; KAMANGAR et al., 2006). Nesses casos, a conduta clínica abrange essencialmente cuidados paliativos, não havendo consenso na literatura acerca do uso de outras modalidades terapêuticas, como quimioterapia (POWER et al., 2010; ZILBERSTEIN et al., 2013).

São muitos os estudos clínicos utilizando-se quimioterápicos convencionais para o tratamento de casos avançados de CG e de AJEG (ROSS et al., 2002; WAGNER et al., 2006). O ganho de sobrevida para esses pacientes, contudo, permanece modesto. Ainda que se obtenham resultados um pouco melhores com o uso de terapia farmacológica combinada, o tratamento de casos avançados de CG e de AJEG, especialmente na fase metastática da doença, mantém-se desafiante com os recursos atualmente disponíveis (BOKU, 2008; CUNNINGHAM et al., 2008; VAN CUTSEN et al., 2006). Para fins de simplificação terminológica, iremos nos referir a ambos os tumores (CG e AJEG) como “câncer gástrico” no presente volume.

1.2. HER2 E TERAPIA ANTI-HER2

HER2 é uma proteína transmembranar, membro da família dos receptores para fatores do crescimento epidérmico humano, que inclui os receptores HER1, 2, 3 e 4 (SLAMON et al., 1987). Apresenta domínio intracelular do tipo tirosina quinase, capaz de originar, a partir da estimulação de um ligante extracelular e dimerização dos receptores, segundos mensageiros intracitoplasmáticos que coordenam a expressão nuclear de genes associados à proliferação e sobrevivência celulares. (GRAUS-PORTA et al., 1997; TZAHAR et al., 1996). Dessa forma, localizado no cromossomo 17, o gene *HER2*, responsável pela codificação da proteína homônima, é considerado um proto-oncogene, cuja amplificação gênica, bem como superexpressão proteica, encontram-se associadas à carcinogênese na mama, ovário, glândulas salivares, próstata e trato gastrointestinal (HUDIS, 2007; MOASSER, 2007).

Os estudos sobre o *status* HER2 em neoplasias malignas são mais numerosos naquelas de origem mamária, entre as quais a superexpressão proteica de HER2, detectada por imunohistoquímica (IHQ), tem sido relatada em 15-20% dos carcinomas invasivos (WOLFF et al., 2013). Em mais de 90% dos casos positivos para HER2 por IHQ, observa-se associação à amplificação gênica, detectada por meio de hibridização *in situ* (ISH) (WOLFF et al., 2013). Além disso, tem sido demonstrada correlação entre a amplificação do *HER2* e agressividade biológica dos tumores, configurando o *status* HER2 como fator prognóstico em carcinomas mamários (SHAH et al., 2010; SLAMON et al., 1987).

Esse foco de pesquisa no câncer de mama em muito se justifica a partir do desenvolvimento de terapias farmacológicas antitumorais utilizando-se terapias alvo específicas, que atuam em nível molecular (ROSS, 2009). Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal desenvolvido contra um domínio extracelular do receptor, cuja indicação para uso em carcinoma mamário invasor positivo para HER2 foi aprovada em 1998 pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*). Embora haja evidências sobre o desenvolvimento de cardiotoxicidade nos doentes tratados com trastuzumabe e de resistência tumoral à ação da droga, estudos prospectivos randomizados constataram melhora na sobrevida dos pacientes que a utilizaram isoladamente ou em terapia farmacológica combinada (SHAH et al., 2010).

Entre os fármacos utilizados em combinação com o trastuzumabe, destacam-se o lapatinibe, que apresenta ação anti-tirosina quinase, e o pertuzumabe, outro anticorpo monoclonal que

inibe a dimerização do HER2, além do conjugado ado-trastuzumabe emtansine, uma associação de trastuzumabe e um agente citotóxico (MALENFANT et al., 2014; ROSS, 2009). Esses medicamentos receberam aprovação do FDA para uso em carcinoma invasor da mama, respectivamente, em 2007, 2012 e 2013, tendo sido comprovada a melhora da sobrevida das pacientes tratadas com essas drogas por meio de estudos clínicos randomizados (AHMED et al., 2015).

1.3. HER2 NO CÂNCER GÁSTRICO

Amplificação gênica e superexpressão proteica do HER2 no CG foram descritas primeiramente em 1986 (FUKUSHIGE et al., 1986; SAKAI et al., 1986) e, desde então, outros estudos também demonstraram superexpressão proteica do receptor em CG, havendo, no entanto, grande discrepância em termos de porcentagem de casos positivos, variando de 4,4 a 53,4% em 11.860 pacientes compilados em metanálise, com média de 17,9% (JØRGENSEN et al., 2012). De forma semelhante, houve diferença percentual na frequência de casos de CG com amplificação gênica para *HER2*, porém de maneira mais discreta, da ordem de 8,7% a 18,1% em 1.597 pacientes compilados em metanálise, com média de 12,2% (JØRGENSEN et al., 2012).

Esse amplo espectro de variação apresenta causas multifatoriais, incluindo diferenças populacionais, embora os principais fatores possam ser explicados, em parte, pela inconsistência de parâmetros pré-analíticos, como tempo de fixação e falta de padronização em protocolos de reação de IHQ e de ISH. Entre os estudos, nota-se variação no clone de anticorpo anti-HER2 utilizado para a detecção da proteína, assim como o uso de diferentes sondas para a amplificação do gene. Verifica-se, ainda, inconstância no tipo de espécime submetido aos testes, incluindo biópsias endoscópicas, peças cirúrgicas e amostras provenientes de metástases linfonodais e à distância. Além disso, há entre os trabalhos publicados discrepância nos critérios utilizados para definição de casos positivos, principalmente por IHQ (JØRGENSEN et al., 2012). Os critérios empregados atualmente para a análise do *status* HER2 serão discutidos a seguir e apresentados em detalhe como parte da seção “Materiais e Métodos” do presente volume.

Embora nas últimas três décadas alguns estudos tenham avaliado a expressão de HER2 no CG, apenas recentemente registram-se na literatura avanços quanto à aplicação desse marcador em estudos clínicos especificamente direcionados para a abordagem desses tumores.

Neste cenário, um trabalho publicado por Hoffman e colaboradores (2008) analisou o *status* de HER2 em 168 casos de CG e de AJEG por meio de IHQ e ISH, encontrando concordância de 93,5% entre os métodos. A partir de análise detalhada dos casos discrepantes (positivos por ISH, porém negativos por IHQ), foram propostas modificações nos critérios de avaliação para expressão da proteína HER2 por IHQ no câncer gástrico, de maneira diferente da que foi preconizada para espécimes mamários, na tentativa de aumentar a concordância entre os métodos e a qualidade dos resultados. Embora, como nos casos de câncer de mama, um escore semiquantitativo seja obtido a partir da observação da intensidade e da extensão das áreas marcadas por IHQ, há critérios específicos utilizados para a leitura do teste no câncer gástrico. Ao contrário do que se verifica no carcinoma mamário, não há necessidade, por exemplo, de haver marcação de toda a circunferência celular, validando-se o padrão membranar incompleto para a IHQ em espécimes gástricos (Figura 1).

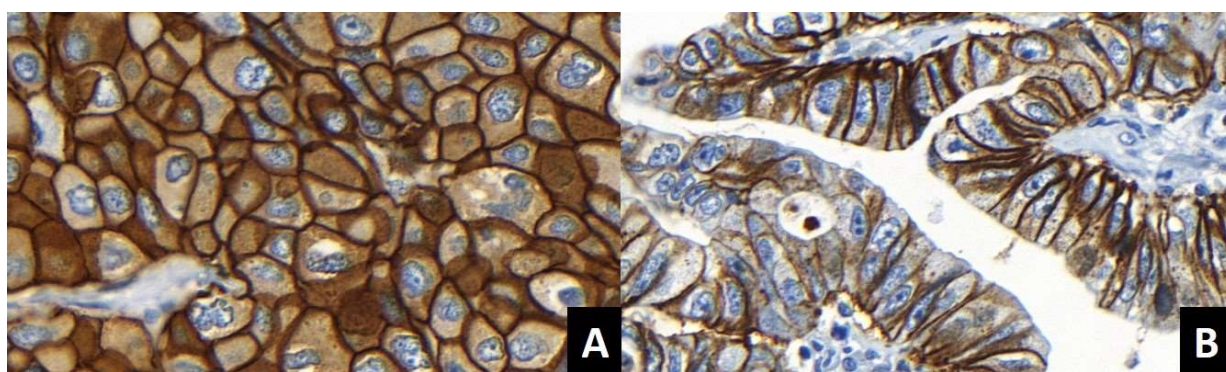


Figura 1 – Comparação do padrão típico de coloração imuno-histoquímica para HER2: (A) membranar completo no câncer de mama e (B) membranar incompleto no câncer gástrico. (A e B: imuno-histoquímica com anticorpo anti-HER2 clone 4B5, aumento de 400x).

Os autores também propuseram diferentes limites para avaliar a extensão da marcação, de acordo com o tipo de amostra analisada: acima de 10% de marcação para os tumores em peças cirúrgicas (gastrectomias) e mais de cinco células neoplásicas marcadas para as biópsias endoscópicas (HOFFMAN et al., 2008). Essa recomendação se baseia no fato de haver maior variabilidade na expressão do HER2 no CG dentro de um mesmo tumor, em comparação com espécimes mamários. Essa heterogeneidade de expressão foi definida como extensão de área marcada para HER2 inferior a 30% em amostra de câncer gástrico (RÜSCHOFF et al., 2010).

Aplicando os critérios de Hoffman e colaboradores (2008), o estudo ToGA (do inglês *Trastuzumab for Gastric Cancer*) selecionou, a partir de 3.665 casos de CG e de AJEG

localmente avançados ou metastáticos, 810 pacientes com tumores positivos para HER2 por IHQ ou ISH (cerca de 22% do total). A positividade para HER2 foi mais frequente nos tumores da JEG. Entre os casos de CG, encontrou-se maior expressão naqueles de tipo histológico intestinal, segundo a classificação de Laurén (1965). De caráter multicêntrico, randomizado e controlado, esse estudo clínico de fase III compilou casos provenientes de 24 centros na Ásia, Europa e Américas Central e do Sul, inclusive no Brasil. Um grupo de pacientes recebeu regime terapêutico combinado de quimioterapia + trastuzumabe, enquanto ao grupo controle foi administrada apenas quimioterapia, obtendo-se aumento da mediana de sobrevida global e de sobrevida livre de doença no primeiro grupo (BANG et al., 2010).

Esses resultados positivos justificaram, em 2010, a aprovação das agências reguladoras na União Europeia e, em agosto de 2011, nos Estados Unidos da América, para o uso de trastuzumabe em pacientes com CG ou AJEG metastáticos. A seleção dessa população alvo deve se basear em fluxograma elaborado por Rüschoff e colaboradores (2010), de acordo com recomendações da EMEA (do inglês *“European Medicine Agency”*) e reproduzido na Figura 2. Embora este algoritmo seja bastante semelhante ao recomendado por Wolff e colaboradores (2013) para seleção de pacientes com carcinoma de mama elegíveis ao tratamento com trastuzumabe, os critérios para avaliação da reação de IHQ, principalmente no que tange à categorização 1+, 2+ e 3+, diferem entre amostras de mama e estômago, como mencionado anteriormente.

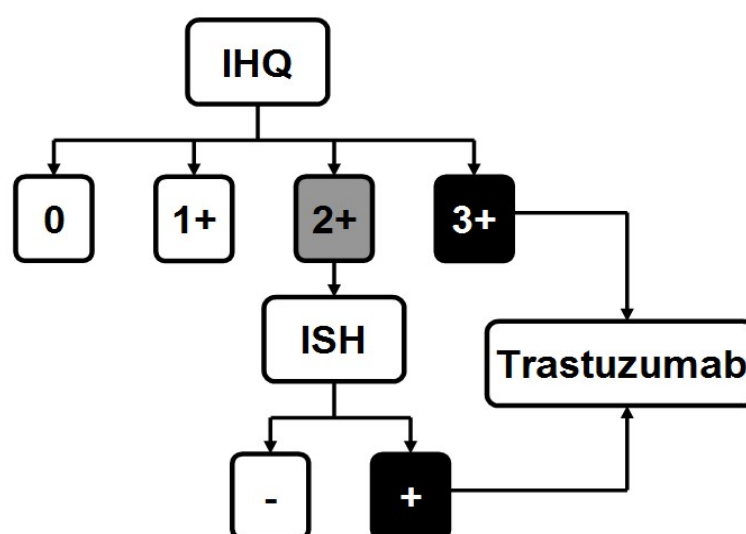


Figura 2 – Fluxograma para seleção de pacientes com carcinoma gástrico ou adenocarcinoma da junção esofagogástrica metastáticos, elegíveis ao tratamento com trastuzumabe.

Utilizando-se primeiramente IHQ, serão considerados elegíveis para tratamento os casos positivos, dentro da categoria 3+. O teste de ISH deve ser utilizado nos casos equívocos por IHQ (categoria 2+), sendo os casos amplificados considerados elegíveis para o tratamento.

Os anticorpos primários mais empregados para avaliação do HER2 por IHQ no CG são os monoclonais de coelho (SP3 e 4B5), além dos policlonais (A0485 e HerceptTest®), este último empregado no estudo ToGA e utilizado para definição dos critérios de interpretação do teste nos espécimes gástricos (BANG et al., 2010; HOFFMAN et al., 2008). Paralelamente ao que se observa em estudos sobre o HER2 no câncer de mama, verifica-se, em menor escala, relatos na literatura de trabalhos avaliando a concordância de superexpressão de HER2 no CG por diferentes anticorpos primários, comparando níveis de sensibilidade e especificidade a partir da amplificação gênica por ISH (ABRAHÃO-MACHADO et al., 2013; BOERS et al., 2011; CHO et al., 2012; PALA et al., 2013; PARK et al., 2012). A sensibilidade observada variou bastante entre esses estudos, mas mostrou consistentemente uma maior sensibilidade com o clone 4B5 e uma maior especificidade com o HerceptTest®. A concordância da superexpressão de HER2 entre esses dois anticorpos, entretanto, foi considerada forte e revelou κ de 0,785 em um dos estudos (PARK et al., 2012).

A amplificação gênica baseia-se na contagem das cópias do gene *HER2* em pelo menos 20 células tumorais. A técnica mais aplicada nos estudos com HER2 no CG é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), utilizada no estudo ToGA e também por Hoffman e colaboradores (2008). As hibridizações *in situ* pela prata (SISH) e cromogênica (CISH), embora menos empregadas no CG, apresentam a vantagem de permitirem análise em campo claro, com um microscópio óptico convencional. Estudos comparando esses métodos com FISH têm verificado excelente nível de concordância entre os resultados para amplificação de *HER2* no CG, variando de 99 a 100% para FISH e CISH e entre 96,4 e 100% para FISH e SISH (BOERS et al., 2011; GARCÍA-GARCÍA et al., 2011; GRIN et al., 2013; KIYOSE et al., 2012; LONG et al., 2011; PALA et al., 2013; PARK et al., 2012; YAN et al., 2010).

Aplicando-se o fluxograma da Figura 2 nos casos avaliados por IHQ e FISH do estudo ToGA, 16,6% desses tumores foram considerados de fato positivos para HER2 (BANG et al., 2010; VAN CUTSEM et al., 2015). A análise de subgrupo desses pacientes revelou aumento ainda maior da mediana de sobrevida global e de sobrevida livre de doença (BANG et al., 2010). Justificou-se, portanto, a definição do referido fluxograma como delineamento para a seleção

daqueles pacientes com CG metastático cujo tratamento poderá incluir o trastuzumabe (RÜSCHOFF et al., 2012). Após a divulgação do ensaio clínico ToGA em 2010 e da definição desse fluxograma e dos critérios para a interpretação dos testes, houve um crescente interesse em se estudar o *status* HER2 no CG, verificado pelo aumento do número de publicações na literatura mundial sobre o assunto nos últimos cinco anos. A Tabela 1 apresenta os estudos envolvendo as maiores casuísticas de pacientes com CG submetidos a avaliação do *status* HER2, comparando-se os resultados obtidos com aqueles do estudo ToGA.

O índice de superexpressão da proteína HER2 (categoria 3+) variou de 6,6% a 11,4% entre os trabalhos, enquanto a amplificação do gene por ISH foi observada em 11 a 23%. Aplicando-se o fluxograma para seleção dos pacientes, os tumores (3+) somados aos (2+) amplificados por ISH foram identificados em 7,3 a 16,6% dos casos. As associações mais frequentes entre o *status* HER2 e as características clínicas dos pacientes foram idade avançada e sexo masculino. Entre os dados anatomopatológicos dos tumores, os mais comumente associados à positividade para HER2 foram o tipo intestinal de Laurén, baixo grau histológico e localização da neoplasia no esôfago distal ou estômago proximal (JEG). Em uma revisão sistemática da literatura, Chua e colaboradores (2012) encontraram uma variação de 4 a 53% na taxa de superexpressão de HER2, com uma média de 18%, considerando-se 49 estudos e 11.337 reunidos em metanálise. Com relação à presença de associações estatisticamente significativas entre positividade para HER2 e características clinicopatológicas, uma metanálise reunindo 5.290 pacientes de 15 estudos diferentes, verificou associação entre superexpressão de HER2 e baixo grau histológico ($P<0,001$), tipo intestinal ($P<0,001$), presença de metástase linfonodal ($P=0.001$) e invasão vascular linfática ($P=0.001$) e sanguínea ($P=0.008$) (LIANG et al., 2014).

Embora a terapia anti-HER2 seja indicada para tumores metastáticos, os testes para HER2 são realizados em amostras de tumor primário. Alguns estudos vêm sendo publicados objetivando comparar o *status* HER2 em CG primário e em amostras pareadas de metástases linfonodais e à distância, encontrando taxas de concordância variáveis (BOZZETTI et al., 2011; GENG et al., 2014; GUMUSAY et al., 2015). A presença de casos com resultados divergentes para o *status* HER2 entre o CG primário e a metástase correlata levantam a hipótese sobre o teste ser realizado em ambas amostras (IENI et al., 2014; KOCHI et al., 2013). No caso de haver conversão positiva, quando o tumor primário é HER2 negativo, porém a metástase mostra positividade para HER2, especula-se se este paciente poderia se beneficiar do tratamento com trastuzumab (PENG et al., 2015).

Tabela 1 – Estudos sobre o HER2 no câncer gástrico envolvendo grandes casuísticas

Estudo, país e ano de publicação	N	Tipo de amostra	Local do tumor	Técnica para teste HER2	Índice de positividade para HER2	Associação com dados clínicos e patológicos
BANG et al. multicêntrico 2010	3665	G, B e M (corte inteiro)	JEG: 5% E: 58% M: 8% NA: 29%	IHQ (Hercep Test) FISH	11,4% (3+) 23% (FISH+) 16,6% (3+ e 2+/FISH+)	Tipo intestinal Topografia
KIM et al. Coréia do Sul 2011	1414	G (corte inteiro)	P: 12% D: 88%	IHQ (A0485)	7,8% (3+)	Idade avançada Sexo masculino Tipo intestinal Baixo grau / pN Invasão linfática Metástase linfonodal
SHAN et al. China 2013	1463	G (corte inteiro)	JEG: 37% E: 63%	IHQ (4B5) FISH	9,8% (3+) 17,2% (FISH+)	Topografia Tipo intestinal Baixo grau
CHO et al. Coréia do Sul 2013	2798	G e M (corte inteiro)	P: 47% D: 49% NA: 4%	IHQ (4B5) SISH	6,6% (3+) 7,3% (3+ e 2+/SISH+)	Idade avançada Sexo masculino Topografia / pN Tipo intestinal Estágio avançado
FAN et al. China 2013	957	G (corte inteiro)	P: 54% D: 46%	IHQ (A0485)	9,5% (3+)	Sexo masculino Tipo intestinal Baixo grau / pM Estágio avançado
AIZAWA et al. Japão 2014	1006	G (TMA)	P: 25% D: 75%	IHQ (4B5) SISH	9,6% (3+) 11,7% (3+ e 2+/SISH+)	Idade avançada Sexo masculino Padrão macroscópico Baixo grau / pN
CAPPELLESSO et al. Europa (multicêntrico) 2015	1040	G (TMA)	JEG: 21% E: 79%	IHQ (4B5 e CB11) CISH	4B5: 7,8% (3+) CB11: 7,7% (3+) 11% (CISH+)	Tipo intestinal Baixo grau
MATSUSAKA et al. Japão 2015	1427	G e B (corte inteiro)	P: 28% D: 72%	IHQ (4B5) FISH	11,4% (3+) 15,6% (3+ e 2+/FISH+)	Sexo masculino Tipo intestinal Metástase à distância Padrão macroscópico Topografia Tamanho / pT

B: biópsia endoscópica; CISH: hibridização *in situ* cromogênica; D: estômago distal; E: estômago; FISH: hibridização *in situ* fluorescente; G: gastrectomia; IHQ: imuno-histoquímica; JEG: junção esofagogástrica; M: metástase; N: amostra; NA: não avaliado; P: estômago proximal; SISH: hibridização *in situ* pela prata; TMA: microarranjos de tecido.

Não há estudos clínicos que permitam estabelecer estratégias terapêuticas nesse cenário. Para o câncer de mama, a recomendação é que o teste para HER2 seja feito no tumor primário. Se a paciente desenvolver metástase, deverá então ser realizado novo exame, caso a amostragem do

tumor metastático estiver disponível (WOLFF et al., 2013). Não há consenso sobre a realização de testes para HER2 no CG em amostras de sítios metastáticos, embora alguns pacientes que participaram do estudo ToGA tenham sido selecionados a partir de testes em amostras provenientes de metástases (BANG et al., 2010; VAN CUTSEM et al., 2015).

Independentemente dessas questões, a nova opção terapêutica, incorporada aos protocolos de tratamento dos casos de CG e AJEG avançados, aumentou a importância e o papel do patologista dentro da equipe multidisciplinar, envolvida no tratamento destes pacientes. Desse modo, a exemplo do que se verificou no carcinoma de mama, recai sobre o patologista a responsabilidade de selecionar amostras e conduzir os estudos de IHQ e ISH para definição do *status* HER2 no câncer gástrico e, conseqüentemente, os resultados obtidos definirão a conduta terapêutica oncológica. As terapias alvo, como o trastuzumabe, apresentam, porém, custo elevado e não se mostram livres de efeitos colaterais (GONZÁLEZ et al., 2008; NEYT et al., 2006). Portanto, a classificação de pacientes elegíveis a esse tipo de tratamento deve ser realizada com máxima excelência e seguindo preceitos éticos, a fim de selecionar aqueles indivíduos que possam lograr maiores benefícios.

Neste contexto, delineiam-se desafios para o patologista que, além de analisar os aspectos anatomopatológicos convencionais dos tumores, deverá estar apto a incorporar em sua rotina a avaliação de fatores tumorais preditivos de resposta terapêutica, como o HER2. Em contrapartida, estes desafios contribuirão para refinar os conhecimentos sobre o perfil do CG em nosso meio, além de subsidiar a abordagem terapêutica de maneira mais individualizada.

Estudos sobre HER2 em câncer de mama têm sido realizados no Laboratório de Patologia Mamária (LPM) da Faculdade de Medicina da UFMG e a padronização do teste já é uma realidade para sua aplicação clínica de rotina em nossa instituição (GOBBI, et al. 2008; GOUVÊA, et al. 2006; GOUVÊA, et al. 2004; NUNES, et al. 2013; NUNES, et al. 2008; NUNES, et al. 2007). Contudo, ainda são escassos os estudos sobre o HER2 no câncer gástrico no Brasil, onde, desconsiderando-se os tumores de pele não melanomas, essa neoplasia perfaz cerca de 5% do total de diagnósticos de câncer realizados anualmente (INCA, 2016). A Tabela 2 apresenta os principais estudos sobre HER2 no CG envolvendo pacientes brasileiros. É importante frisar a acentuada amplitude de resultados encontrados para a frequência de superexpressão do HER2, variando entre 0,8 e 11,6% de casos 3+. Embora os trabalhos tenham

aplicado metodologias distintas, o que pode explicar em parte essa variação, é notável a predominância de casos distais de CG entre as diferentes casuísticas, variando de 88 a 56%.

Tabela 2 – Estudos sobre o HER2 no câncer gástrico envolvendo casuísticas brasileiras

Estudo, local e ano de publicação	N	Tipo de amostra	Local do tumor	Técnica para teste HER2	Índice de positividade para HER2	Associação com dados clínicos e patológicos
BEGNAMI et al. São Paulo, SP 2005	462	G (TMA)	P: 13% D: 87%	IHQ (A0485)	12% (3+ e 2+)	Tipo intestinal
CIRNE-LIMA et al. Porto Alegre, RS 2009	37	G (corte inteiro)	P: 30% D: 70%	IHQ (A0485)	5,4% (3+ e 2+)	Nenhuma
BEGNAMI et al. São Paulo, SP 2011	221	G (TMA)	P: 20% D: 80%	IHQ (A0485) FISH	3% (3+) 8% (FISH+)	Tipo intestinal Baixo grau
ABRAHÃO-MACHADO et al. Barretos, SP 2013	199	G (TMA e corte inteiro)	P: 44% D: 56%	IHQ (HercepTest, 4B5 e SP3) SISH	4B5: 11,6% (3+) SP3: 9,1% (3+) HercepTest: 5,1% (3+) 4B5: 14,6% (3+ e 2+/SISH+)	NA
JUNG et al. Curitiba, PR 2013	118	G, B e M (TMA)	NA	IHQ (CB11)	G: 0,8% (3+) B: 1,7% (3+) M: 3,7% (3+)	pN
JÁCOME et al. Barretos, SP 2014	201	G (TMA)	P: 19% D: 81%	IHQ (A0485)	6% (3+)	Idade avançada Tipo intestinal
DAMASCENO et al. Brasília, DF 2014	106	G (corte inteiro)	NA	IHQ (HercepTest) FISH	4,7% (3+) 4,7% (3+ e 2+/SISH+)	Baixo grau
DE CARLI et al. Santa Maria, RS 2015	48	G (corte inteiro)	P: 12% D: 88%	IHQ (EP1045Y)	6,3% (3+)	Tipo intestinal

B: biópsia endoscópica; D: estômago distal; FISH: hibridização *in situ* fluorescente; G: gastrectomia; IHQ: imunohistoquímica; M: metástase; N: amostra; NA: não avaliado; P: estômago proximal; SISH: hibridização *in situ* pela prata; TMA: microarranjos de tecido.

Como a positividade para HER2 é mais comumente verificada em AJEG (BANG et al., 2010), é justificável especular que a proporção de casos positivos para HER2 seja menor no Brasil comparada à média global, já que predominam em pacientes brasileiros tumores originários do antro gástrico (INCA, 2016). A comparação dos estudos das Tabelas 1 e 2 pode evidenciar essa observação, resguardando-se as devidas limitações ao se comparar casuísticas de proporções

tão diferentes. O tipo intestinal e o baixo grau histológico dos tumores foram as características patológicas mais frequentemente associadas ao *status* HER2 nos estudos brasileiros, assim como verificado nos trabalhos da Tabela 1.

Destaca-se também o fato de que somente três estudos realizaram ISH além da IHQ e que apenas um trabalho submeteu amostras metástases ao teste para HER2. Neste caso, houve pareamento dos espécimes em 38 pacientes e taxa de concordância de 63,1% entre os resultados obtidos para o *status* HER2, comparando-se os tumores primários e as metástases (JUNG et al., 2013). Esse valor é menor do que o verificado na maioria dos estudos publicados em outras regiões do mundo, provavelmente devido à amostragem restrita nessa série.

Ainda que metade dos trabalhos da Tabela 2 tenham sido desenvolvidos na região sudeste do Brasil, não há nenhum relato na literatura de estudo com HER2 e CG que tenha sido realizado em Minas Gerais, onde, segundo estimativa do INCA (2014), foram feitos 1960 diagnósticos de CG em 2014, dentre os quais 250 casos apenas no município de Belo Horizonte. Inserido em nosso meio, o Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG é considerado centro de referência para o diagnóstico e tratamento do câncer gástrico nas esferas estadual e nacional, representando, portanto, arquivo significativo de casos de CG ao nosso alcance.

Como citado anteriormente, há diferenças na incidência do CG em relação a regiões geográficas, grupos étnicos e taxa de infecção por *H. pylori*. Devido à alta miscigenação e heterogeneidade genética da população em nosso país, torna-se importante avaliar o HER2 no câncer gástrico em casuísticas de pacientes brasileiros. Além disso, a abordagem de fatores como tipo de amostra a ser testada para leitura do teste HER2 faz-se necessária para adequada detecção de casos positivos em nosso meio. Como a terapia anti-HER2 ainda não se encontra disponível aos pacientes com CG atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), essas iniciativas poderão proporcionar embasamento científico para o delineamento de políticas públicas de saúde que definirão novos protocolos clínicos de tratamento para pacientes com câncer gástrico no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar as frequências de expressão para o HER2 em amostras obtidas de uma população de pacientes brasileiros com câncer gástrico, a partir de diferentes métodos de detecção, aplicados em tipos distintos de amostra tumoral, a fim de avaliar possíveis associações entre o *status* HER2 e dados clinicopatológicos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a expressão proteica de HER2 por meio de IHQ em amostras de tumor primário de CG (peças cirúrgicas) e metástases linfonodais pareadas.
2. Avaliar a amplificação gênica do *HER2* por meio de SISH em amostras de tumor primário de CG (peças cirúrgicas) cuja IHQ tenha apresentado resultado equívoco (2+).
3. Definir a frequência de positividade de HER2 (casos 3+ por IHQ somados aos 2+ amplificados por SISH) em amostras de tumor primário de CG (peças cirúrgicas).
4. Correlacionar o *status* HER2 com dados clínicos dos pacientes e características anatomopatológicas dos tumores.
5. Determinar a taxa de concordância entre os resultados obtidos na avaliação da expressão proteica de HER2 por IHQ em amostras de tumor primário de CG (peças cirúrgicas) e respectivas metástases linfonodais pareadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA (CRITÉRIOS DE INCLUSÃO)

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, conforme parecer reproduzido no Anexo E. Foram selecionados todos os casos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico (esofagectomia distal, gastrectomia total, subtotal ou parcial, com ou sem linfadenectomia) no Hospital das Clínicas (HC) da UFMG no período de 2007 a 2011 para tratamento de CG e de AJEG. Os casos foram separados a partir dos arquivos do Laboratório de Pesquisa em Patologia do Trato Gastrointestinal (LP-TGI) do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG e do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG. Para a inclusão neste estudo, os casos de tumores primários em peças cirúrgicas preencheram os seguintes requisitos:

- a) Diagnóstico histológico original de CG ou de AJEG.
- b) Disponibilidade de lâminas para reavaliação histológica e de blocos do tumor primário e secundário (nos casos com linfonodos positivos) para confecção de novos cortes para IHQ e ISH.

3.2. REVISÃO HISTOPATOLÓGICA E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE PARAFINA

As lâminas originais referentes aos casos selecionados e coradas pelo método de hematoxilina-eosina foram reavaliadas por dois patologistas (RSL e MMDAC). Os casos cujas amostras mostravam artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequado foram excluídos do estudo, uma vez que a má qualidade do tecido fixado indica a possibilidade de má conservação dos antígenos tumorais e, consequentemente, afeta a fidedignidade da reação por IHQ, podendo comprometer também a amplificação gênica por ISH.

3.2.1. CASOS DE TUMOR PRIMÁRIO

Foram reavaliadas características dos tumores, como tipo e grau histológicos. Os tumores foram reclassificados de acordo com a classificação de Laurén (1965) em tipos intestinal, difuso, misto e não-classificável. Da mesma forma foi revisto o grau histológico de diferenciação de acordo com o índice de formação glandular e pleomorfismo citológico (tumores bem, moderadamente

e pouco diferenciados), conforme recomendação da OMS (BOSMAN, 2010). Foram reavaliadas as presenças de invasão vascular sanguínea e linfática. A profundidade de invasão (pT) foi definida segundo critérios do sistema TNM e recomendações do AJCC (EDGE et al., 2010; SOBIN et al., 2009). Foram selecionados dois blocos de cada tumor primário que apresentavam boa representação tumoral, de preferência ocupando mais de 50% da área do corte. Um bloco foi utilizado para os testes, enquanto o outro permaneceu como reserva. Nos casos de tumores mistos, deu-se preferência para blocos com amostragem do componente intestinal.

3.2.2. CASOS DE TUMOR SECUNDÁRIO (METÁSTASES LINFONODAIS)

Nos casos de metástases em linfonodos, foram reavaliados aspectos como número de linfonodos acometidos e estadiamento (pN) conforme critérios do sistema TNM e recomendações do AJCC (EDGE et al., 2010; SOBIN et al., 2009). Aspectos morfológicos da neoplasia metastática também foram avaliados, como tipo e grau histológicos, seguindo os mesmos critérios utilizados para os tumores primários. Foram selecionados os linfonodos positivos contendo a maior área de neoplasia metastática para as reações de IHQ, havendo predileção pelo componente intestinal nos casos de tumores mistos.

3.3. ELABORAÇÃO DO BANCO DE DADOS

Utilizando-se como fonte de coleta os dados do protocolo próprio do LP-TGI para análise de peças cirúrgicas de tumores do estômago, reproduzido no Anexo A, foram compilados os seguintes aspectos clinicopatológicos dos casos selecionados:

- Gênero;
- Idade;
- Tipo de cirurgia (esofagectomia distal, gastrectomia parcial, subtotal ou total);
- Topografia do tumor (junção esofagogástrica, terços proximal, médio ou distal do estômago);
- Curvatura acometida (pequena ou grande curvaturas);
- Profundidade do tumor (pT);
- Metástases linfonodais (pN);
- Metástases à distância (pM);

- Profundidade de acometimento da parede do órgão (tumores precoces x avançados);
- Tipo macroscópico:
 - Segundo critérios da Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva (SJED), aprovados pela *Japanese Gastric Cancer Association* (1998) para tumores precoces;
 - Segundo Borrmann (1926) para tumores avançados;
- Classificação histológica segundo Laurén (1965);
- Classificação histológica segundo recomendações da OMS (BOSMAN, 2010);
- Padrão de crescimento segundo Ming (1977);
- Grau histológico de diferenciação;⁷
- Invasão vascular linfática;
- Invasão vascular sanguínea;
- Número de linfonodos dissecados;
- Número de linfonodos acometidos (metástases linfonodais).

Os critérios revistos no item 3.2 foram considerados no preenchimento do banco de dados, sendo utilizados os dados obtidos na revisão feita em consenso pelos dois patologistas.

3.4. ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE HER2 POR IHQ

3.4.1. REALIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE IHQ

As reações de IHQ foram realizadas no LPM do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Lâminas contendo novos cortes histológicos com espessura de 4µm de amostras de tumores primários (peças cirúrgicas) e de tumores secundários (metástases linfonodais) foram submetidas a estudo por IHQ para avaliação da expressão proteica de HER2. Utilizou-se o kit HercepTest® (*Dako*®, Glostrup, Dinamarca), contendo anticorpo policlonal anti-HER2 pré-diluído, cuja aplicação foi precedida por recuperação antigênica em banho-maria a 95°C por 40 minutos. O protocolo manual de reação foi seguido conforme especificação técnica do fabricante e encontra-se reproduzido no Anexo B. Em cada bateria, foram utilizadas lâminas como controles externos positivo e negativo, fornecidas no kit pelo fabricante, além de amostras de câncer de mama positivas para HER2 e previamente testadas no LPM.

Lâminas contendo cortes histológicos com espessura de 4µm das amostras de tumores primários (peças cirúrgicas) também foram submetidas a teste de IHQ para HER2 com o kit PATHWAY®, contendo o anticorpo primário anti-HER2, monoclonal de coelho, clone 4B5, pré-diluído (*Ventana Medical Systems®*, Arizona, EUA). Utilizou-se plataforma automatizada para a reação de IHQ no aparelho BenchMark XT® (*Ventana Medical Systems®*, Arizona, EUA), de acordo com especificação técnica do fabricante. Amostras de câncer de mama positivas para HER2 e previamente testadas no LPM foram utilizadas como controle externo positivo em cada bateria.

3.4.2. INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES DE IHQ

Para análise da superexpressão da proteína HER2 nas amostras de tumor primário e metástases linfonodais, utilizaram-se os critérios para avaliação de peças cirúrgicas, de acordo com as recomendações de Rüschoff e colaboradores (2010):

- Resultado negativo: escore 0 (ausência de marcação de membrana nas células neoplásicas ou reatividade de membrana de qualquer intensidade em menos de 10% das células neoplásicas) ou escore 1+ (coloração de intensidade fraca e de extensão incompleta na membrana celular, em mais de 10% das células neoplásicas).
- Resultado equívoco ou suspeito: escore 2+ (coloração de intensidade fraca a moderada e extensão completa, basolateral ou lateral na membrana celular, em mais de 10% das células neoplásicas).
- Resultado positivo: escore 3+ (coloração de intensidade forte e extensão completa, basolateral ou lateral na membrana celular, em mais de 10% das células neoplásicas).

Conforme recomendado pelos referidos autores, utilizou-se, para graduação da intensidade da imunomarcação, a “regra da magnificação”, ilustrada na Figura 3. Denomina-se fraca a reatividade visualizada apenas em objetiva de aumento de 40 vezes, moderada aquela observada em objetivas de aumento de 10 ou 20 vezes e forte com objetiva de aumento de 4 vezes. Ressalta-se que a intensidade deverá ser avaliada apenas nos casos em que a marcação exibe padrão de membrana celular, desconsiderando-se reações inespecíficas de padrão citoplasmático ou nuclear.

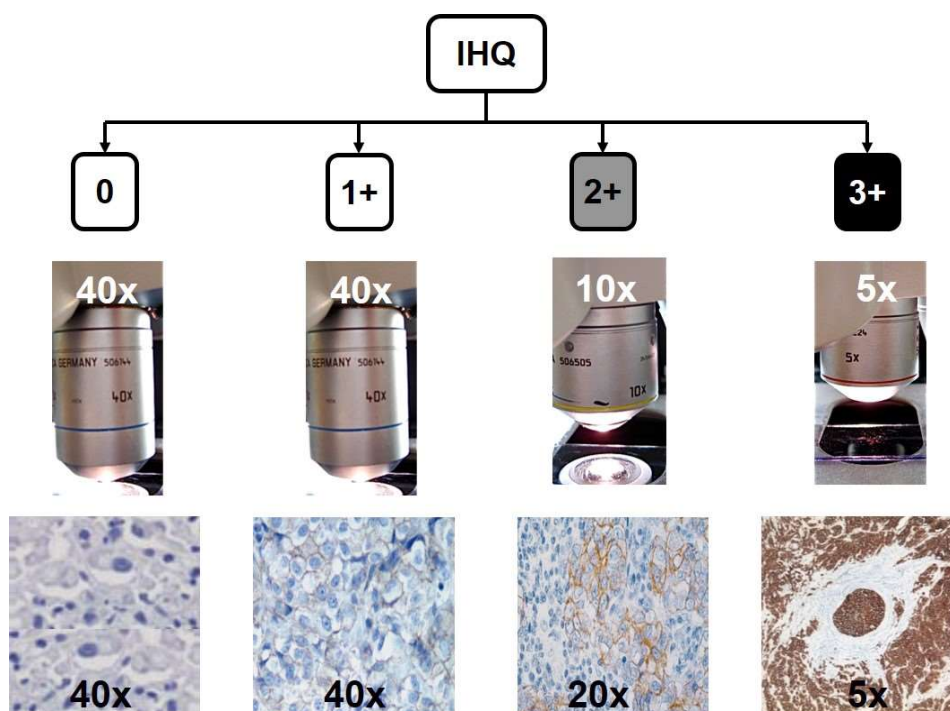


Figura 3 – Representação esquemática da graduação da expressão proteica do HER2 por imunohistoquímica utilizando-se a “regra da magnificação”

3.5. ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO GÊNICA DE HER2 POR SISH

3.5.1. REALIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE SISH

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Patologia do Hospital A.C. Camargo, em São Paulo. Novos cortes histológicos dos casos de tumor primário (peças cirúrgicas) que obtiveram resultado equívoco (2+) pelo método IHQ com o anticorpo 4B5 foram submetidos à reação de SISH. Utilizou-se o kit INFORM HER2 Dual ISH DNA® em equipamento de automação BenchMark XT® (*Ventana Medical Systems®*, Arizona, EUA), de acordo com especificação técnica do fabricante. Foram utilizadas sondas para reação com o gene *HER2* e marcação do centrômero do cromossomo 17. Casos positivos (3+) para HER2 foram utilizados como controle externo positivo. Em cada lâmina, a observação dos sinais em células inflamatórias e fibroblastos serviu de controle interno positivo da reação.

3.5.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE SISH

Na interpretação da reação de SISH, um gene *HER2* individual apresenta-se como um único e pequeno ponto preto. O centrômero do cromossomo 17 (CEP17) revela um ponto discretamente

maior e vermelho. Para cada sinal do CEP17, espera-se encontrar em células normais e não-amplificadas, um sinal do gene *HER2*, em proporção 1:1. A amplificação do gene *HER2* é visível como múltiplos pontos individuais dentro do núcleo, ou aglomerados mistos e múltiplos pontos nucleares, chamados de *clusters* (Figura 4), ou ainda como uma razão elevada entre os pontos do *HER2* amplificado e o CEP17. A avaliação do estado do gene *HER2* por SISH foi feita de acordo com o protocolo de interpretação do teste fornecido pelo fabricante e reproduzido na Tabela 3. Em cada caso, foram analisadas 20 células tumorais não superpostas, utilizando microscópio óptico convencional de campo claro no aumento de 400X.

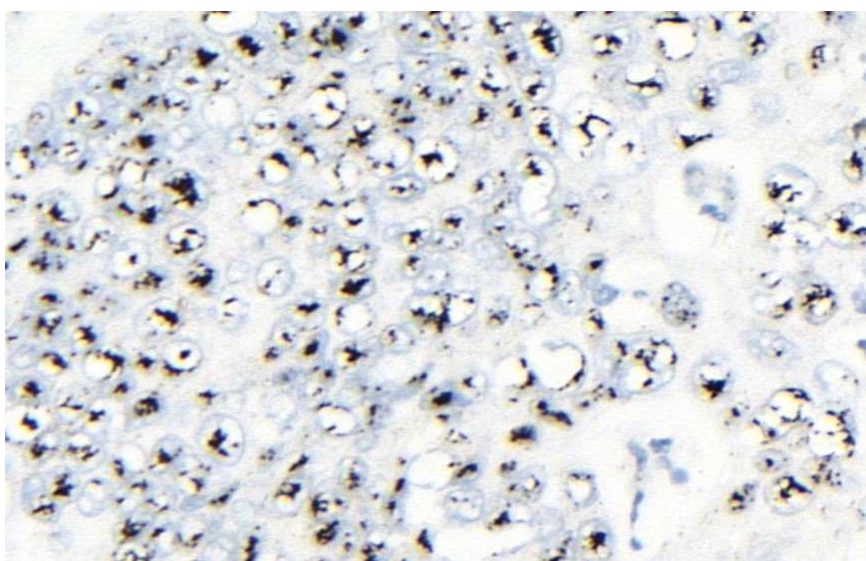


Figura 4 – Exemplo de caso de câncer gástrico amplificado pela técnica de hibridização *in situ* pela prata, evidenciando *clusters*, aglomerados de cópias do gene *HER2* em preto (aumento de 400x)

Caso ao final dessa primeira contagem, o resultado tenha ficado entre 1.8 e 2.2 para a razão *HER2*/CEP17 ou entre 4.0 a 6.0 cópias do gene *HER2* em média por núcleo, o caso foi considerado equívoco para amplificação gênica. Nessa situação, vinte células adicionais foram contadas, sendo recalculados os valores e reavaliada a amplificação gênica em 40 células.

Tabela 3 – Análise da amplificação do gene *HER2* por hibridização *in situ*

Não amplificado	Razão <i>HER2</i> /CEP 17 < 2.0 ou < 6.0 cópias do gene <i>HER2</i> presentes em cada núcleo
Amplificado	Razão <i>HER2</i> /CEP 17 $\geq$ 2.0 ou $\geq$ 6.0 cópias ou aglomerados do gene <i>HER2</i> presentes em cada núcleo

3.6. ESTUDO ESTATÍSTICO

Para verificação de possíveis associações entre o *status* HER2 e características clinicopatológicas foi empregado o teste qui-quadrado de Pearson, considerando-se os valores menores de 0,05 como estatisticamente significativos.

Para a análise da concordância entre o *status* HER2 nos tumores primários e metástases linfonodais pareadas foi utilizado o teste κ (kappa) de Cohen e calculado o intervalo de confiança de 95%. Valores entre 0-0,2 foram considerados como indicativos de nenhuma concordância; 0,21-0,4 concordância fraca; 0,41-0,6 concordância moderada; 0,61-0,8 concordância forte e 0,81-1 concordância praticamente perfeita.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados no formato de artigos científicos. O primeiro deles foi publicado no periódico *BMC Gastroenterology* e o segundo foi submetido à publicação no periódico *Pathology Research and Practice*.

Ambos estão estruturados de acordo com a formatação exigida por cada revista. A carta de aceite da publicação do primeiro artigo e a confirmação da submissão do segundo artigo encontram-se reproduzidas nos Anexos C e D, respectivamente.

4.1. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO BMC GASTROENTEROLOGY

Laboissiere et al. *BMC Gastroenterology* (2015) 15:157
DOI 10.1186/s12876-015-0384-1



RESEARCH ARTICLE

Open Access



Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: a retrospective study using whole-tissue sections

Renato Santos Laboissiere^{1*}, Marcelo Araújo Buzelin², Débora Balabram², Marina De Brot², Cristiana Buzelin Nunes², Rafael Malagoli Rocha², Mônica Maria Demas Álvares Cabral² and Helenice Gobbi²

Abstract

Background: Gastric cancer is usually diagnosed in an advanced stage of disease and treatment options are sparse. Trastuzumab was recently approved for metastatic or locally advanced carcinomas arising in the stomach or in the gastroesophageal junction in patients with HER2-positive tumors. However, data on the frequency of HER2-positive cases among Brazilian patients are limited. Our aim was to characterize HER2 protein and gene status in a series of Brazilian patients with gastric cancer and to evaluate its association with clinicopathological data.

Methods: Histological slides from 124 primary gastrectomies were reviewed and their pathological reports were retrieved from the files at a Brazilian university hospital. Automated immunohistochemistry for HER2 was performed on whole-tissue sections from each tumor. HER2-equivocal cases by immunohistochemistry were submitted to automated dual *in situ* hybridization for gene amplification evaluation. HER2 status was confronted with clinicopathological parameters in order to assess statistically significant associations.

Results: Immunohistochemistry analysis revealed that 13/124 cases (10.5 %) were HER2 positive (3+), 10/124 cases (8.1 %) were equivocal (2+) and 101/124 cases (81.4 %) were negative, being 7 cases 1+. None of the equivocal cases showed gene amplification. The overall HER2 positivity rate was 10.5 %. There was an association between HER2 expression and Laurén's intestinal histological subtype ($P = 0.048$), well to moderately differentiated tumors ($P = 0.004$) and presence of lymphovascular invasion ($P = 0.031$). No association was found between HER2 status and tumor topography.

Conclusions: Confronted with data published by other authors, the lower percentage of HER2-positive cases found in our series might be partially explained by the lower frequency of tumors arising at the gastroesophageal junction in comparison with distal gastric carcinomas in Brazilian patients. This could also account for the lack of statistically significant association between HER2 status and tumor topography in our study.

Keywords: HER2, Gastric cancer, Immunohistochemistry, Gene amplification, Clinicopathological features

* Correspondence: renatoslab@gmail.com

¹Departamento de Medicina DEMED-UFSJ, Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74. Fábricas, São João del-Rei, MG 36301-160, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Laboissiere et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

About one million new cases of gastric cancer (GC) are estimated to occur each year in the world, corresponding to 8 % of all cancer diagnoses globally [1, 2]. GC is also considered the second leading cause of cancer-related deaths worldwide and over 700,000 deaths are expected to occur due to this disease annually [1, 3]. However, the distribution of patients with GC in different parts of the globe is not homogeneous: over 70 % of new cases and deaths occur in developing countries. The highest incidence rates are found in Eastern Asia, Eastern Europe, and South America [1]. The National Institute of Cancer of Brazil estimates that GC comprises over 5 % of all malignancies in this country [4].

Treatment options for GC are generally limited, since it is usually diagnosed at an advanced stage of disease and, therefore, the five-year survival rate is consistently low, around 20 % in most parts of the world [2, 5]. According to the ToGA study, a recent phase III international randomized trial, treatment in combination of chemotherapy and trastuzumab (TZB) has significantly improved survival in patients with HER2-positive advanced GC [6]. TZB is a recombinant monoclonal antibody targeting HER2, a transmembrane protein which belongs to the family of human epidermal growth factor receptors [7]. HER2 intracellular domain shows tyrosine kinase activity, capable of generating intracytoplasmic second messengers that coordinate nuclear expression of genes associated with angiogenesis, cell proliferation, and survival [8]. Overexpression of the HER2 protein, a product of a proto-oncogene situated at chromosome 17, has been associated with carcinogenesis and tumor progression of breast, ovary, salivary glands, prostate and gastrointestinal tract cancers [9].

Based on ToGA trial results, international regulatory agencies have recently approved the use of TZB in HER2-positive metastatic or locally advanced carcinomas arising in the stomach or in the gastroesophageal junction (GEJ) [10]. Carcinomas from eligible patients for treatment with TZB must present HER2-positive status, attested by protein overexpression (score 3+) by immunohistochemistry (IHC) or gene amplification by *in situ* hybridization (ISH) for tumors with equivocal IHC results (score 2+) [11, 12]. Since then, many studies have focused on presenting the frequency of HER2-positive GC in different populations, with a wide variation on methods used for protein and gene detection. Therefore, results remarkably range from 2 to 45 % of HER2 overexpression in GC series [13–17]. A large systematic review including data from 49 studies found a median rate of 18 % of HER2 positivity in 11,337 patients with GC [18]. Nevertheless, the prevalence of HER2-positive cases among Brazilian patients remains unknown, with few data published [19–26]. Since the Brazilian public health system has not yet endorsed the use of TZB for GC treatment

in this country, we believe that the detection of HER2-positive GC in Brazilian patients may provide scientific basis for the establishment of new public health policies and define better clinical protocols to improve treatment of these patients in Brazil.

Therefore, in the present study, we aimed to characterize HER2 expression in GC in a series of Brazilian patients, using whole-tissue tumor sections from surgical specimens, and to evaluate the association between HER2 protein and gene status with clinicopathological data.

Methods

The present study was approved by the Ethics Committee of our institution (Comitê de Ética e Pesquisa COEP-UFMG) under CAAE protocol number 32898114.9.0000.5149. Written informed consent was obtained in accordance with the institutional guidelines.

We studied 142 consecutive patients who underwent primary gastrectomy between 2007 and 2011 at the Clinics Hospital, Federal University of Minas Gerais, Brazil, whose histopathological diagnosis was GC. None of the patients had received neoadjuvant chemotherapy or other type of treatment for their tumor prior to surgery. All 142 cases had their pathological reports retrieved and, in order to confirm the diagnosis of GC, the original hematoxylin-eosin stained slides were simultaneously reviewed by two pathologists (RSL and MMDAC), one of which is an expert in gastrointestinal pathology (MMDAC). Clinical data (patients' age and gender) and pathological parameters (tumor topography, maximum tumor diameter, stage, histological grade and subtype, presence of lymphovascular and blood-vessel invasion) were recorded. Tumors were divided into two groups according to gastric topography: distal and proximal tumors, the latter category included carcinomas from the GEJ. The TNM system criteria and recommendations from the 7th Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual were used for tumor staging [27, 28]. The index of glandular formation and cytologic pleomorphism were considered for histological grading into well, moderately or poorly differentiated tumors. Laurén's histologic classification system was used for tumor subtyping [29].

New 4 µm-thickness whole-tissue sections were obtained from formalin fixed paraffin embedded tumor samples and submitted to automated IHC, using a BenchMark XT™ platform (Ventana Medical Systems, Arizona, USA) and the prediluted primary rabbit monoclonal antibody anti-HER2/neu (4B5 clone). All slides were subsequently counterstained with hematoxylin. A pre-tested HER2-positive breast cancer sample was used as external positive control. Eighteen cases did not contain enough tumor tissue for subsequent IHC protocols and were excluded from this study, resulting in 124 appropriate cases for analysis.

Three pathologists (RSL, HG and CBN) all at once analyzed immunostained slides using a multi-head microscope and obtained a consensus score for HER2 expression according to Hofmann's and Rüschoff's recommendations for GC surgical specimens [11, 12]. The cases were categorized into four groups (0, 1+, 2+ and 3+), depending on the extension and intensity of the expression: 0, no reactivity, or membranous reactivity in < 10 % of cells; 1+, faint/barely perceptible membranous reactivity in > 10 % of cells, and cells are reactive only in part of their membrane; 2+, weak to moderate complete or basolateral membranous reactivity in > 10 % of cells; 3+, strong complete or basolateral membranous reactivity in > 10 % of cells [11]. Only a membranous pattern of expression was suitable for evaluation. The cases included into the 3+ category were considered positive for HER2 protein overexpression, whereas 0 and 1+ cases were regarded as negative.

Cases scored as 2+ were considered equivocal for HER2 protein expression and new 4 µm-thickness whole-tissue sections were submitted to silver brightfield *in situ* hybridization (SISH) using the same automated platform (BenchMark XT™) and the INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail assay (Ventana Medical Systems, Arizona, USA). The *HER2* and chromosome 17 (CEP17) copy numbers were counted in 20 nonoverlapping nuclei concurrently by two observers (RSL and CBN). *HER2* genomic profile was defined as non-amplified if the mean *HER2*/CEP17 ratio was <2.0 and amplified if the *HER2*/CEP17 ratio was ≥2.0. If the ratio fell between 1.8 and 2.2, an additional 20 nuclei were scored and the overall ratio calculated. IHC 2+ cases showing gene amplification by SISH and IHC 3+ cases were both considered positive for HER2 final status [11, 12].

The statistical analysis was performed using the SPSS version 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). The Pearson chi-square test was used to correlate IHC results and HER2 final status with clinicopathological parameters. All *P* values were two-sided, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Clinicopathological characteristics and their association with HER2 final status and IHC scores are shown in Table 1. Patients' age at diagnosis ranged from 28 to 92 years (median: 62.33 years), and there were 64 males (51.6 %) and 60 females (48.4 %) among 124 patients included in this study. Tumors were preferably identified at the distal stomach (80.6 %) in comparison with tumors arising in the gastric cardia or from the GEJ. Tumor size varied between 0.5 and 14.0 cm (average, 5.31 cm) and advanced tumors (pT2, pT3 and pT4 categories) accounted for 107 cases (86.3 %). According to histological grading, 13 cases (10.5 %) were well-differentiated, 45 cases (36.3 %) moderately differentiated, and 66 cases (53.2 %) poorly

differentiated tumors. Laurén's intestinal histological subtype was the most frequently diagnosed, accounting for 61 cases (49.2 %). Diffuse and mixed subtypes were observed in 21 (16.9 %) and 33 (26.6 %) cases, respectively. The nine remaining cases (7.3 %) were classified as indeterminate. Lymphovascular invasion was found in 94 cases (75.8 %), and 85 patients (68.5 %) had lymph node metastasis at diagnosis, with an average of 9.27 positive nodes per case (range, 1 to 63 positive nodes).

Immunohistochemical analysis revealed 13 positive cases (3+; 10.5 %) for HER2 protein overexpression (Fig. 1a), 10 equivocal cases (2+; 8.1 %) (Fig. 1b) and 101 negative cases (81.4 %), 7 of which were scored 1+ (5.6 %) (Fig. 1c). Median age at diagnosis tended to increase according to HER2 status (negative, 61.76 years; equivocal, 66.3 years; and positive, 68.58 years), although this did not reach statistical significance. None of the patients in the IHC 3+ category were younger than 46 years of age and the oldest patient in the series (a 92 year old woman) was among them. There was no association between HER2 expression and patients' gender.

There was a positive association between HER2 protein expression and well to moderately differentiated tumors (*P* < 0.001), as well as with Laurén's intestinal subtype (*P* = 0.009).

Tumors arising in the distal stomach accounted for 76.9 % of IHC 3+ cases, while 23.1 % were found in the gastric cardia or in the GEJ, but this variation was not statistically significant. No IHC 3+ tumor showed a diffuse or indeterminate morphology and only two (15.4 %) were considered poorly differentiated carcinomas. Every IHC 3+ tumor showed lymphovascular invasion and they were all diagnosed at an advanced stage of disease, mainly in the pT3 category (76.9 %). Eleven cases (84.6 %) were positive for lymph node metastasis, with an average of 7.5 positive nodes per case. However, no statistical significance was observed between HER2 protein overexpression and pT, pN or pM status.

Compared to IHC 3+ cases, HER2-equivocal tumors (2+) presented a slightly similar profile when morphological data was taken into account. No case showed diffuse or indeterminate histology, with a predominance of intestinal subtype (9 cases, 90.0 %) and moderately differentiated tumors (8 cases, 80.0 %). The majority of tumors in this setting also compromised the distal stomach and were diagnosed at an advanced stage of disease (9 cases, 90.0 %). However, there was a decrease in the proportion of cases showing lymphovascular invasion and lymph node metastasis (6 cases, 60.0 %) in comparison with numbers found among IHC 3+ cases (13 cases, 100.0 % and 11 cases, 84.6 %, respectively).

HER2-negative carcinomas (scores 0 and 1+) aggregated all tumors with a diffuse or indeterminate morphology as well as the majority of those with a poorly differentiated

Table 1 Association between HER2 status and clinicopathological parameters

	Overall n = 124 (%)	HER2 positive 13(10.5)	HER2 negative 111 (89.5)	P value	HER2 (3+) 13(10.5)	HER2 (2+) 10 (8.1)	HER2 (0, 1+) 101(81.4)	P value
Age at diagnosis				0.803				0.590
≥60 years	82 (66.1)	9	73		9	8	65	
<60 years	42 (33.9)	4	38		4	2	36	
Gender				0.865				0.459
Male	64 (51.6)	7	57		7	7	50	
Female	60 (48.4)	6	54		6	3	51	
Tumor topography				0.720				0.709
Distal stomach	100(80.6)	10	90		10	9	81	
Proximal stomach/GEJ	24 (19.4)	3	21		3	1	20	
Histological subtype				0.048				0.009
Intestinal	61 (49.2)	11	50		11	9	41	
Diffuse	21 (16.9)	0	21		0	0	21	
Mixed	33 (26.6)	2	31		2	1	30	
Undetermined	9 (7.3)	0	9		0	0	9	
Histological grade				0.004				<0.001
Well	13 (10.5)	4	9		4	1	8	
Moderately	45 (36.3)	7	38		7	8	30	
Poorly	66 (53.2)	2	64		2	1	63	
Lymphovascular invasion				0.031				0.060
Positive	94 (75.8)	13	81		13	6	75	
Negative	30 (24.2)	0	30		0	4	26	
Blood-vessel invasion				0.395				0.170
Positive	44 (35.5)	6	38		6	1	37	
Negative	80 (64.5)	7	73		7	9	64	
pT status				0.271				0.165
pT1	17 (13.7)	0	17		0	1	16	
pT2	32 (25.8)	3	29		3	2	27	
pT3	69 (55.6)	10	59		10	5	54	
pT4	6 (4.9)	0	6		0	2	4	
pN status				0.453				0.762
pN0	39 (31.5)	2	37		2	4	33	
pN1	46 (37.1)	7	39		7	4	35	
pN2	24 (19.3)	3	21		3	1	20	
pN3	15 (12.1)	1	14		1	1	13	
pM status				0.548				0.705
pM0	121(97.6)	13	108		13	10	98	
pM1	3 (2.4)	0	3		0	0	3	

Bold numbers represent P values with statistical significance

histological grade and early stage of the disease at diagnosis.

IHC 2+ cases were submitted to SISH but no gene amplification was detected. Therefore, cases with a final HER2-positive status were exclusively composed by IHC 3+ tumors, representing 10.5 % of all GC in this series. HER2

positivity was associated with intestinal subtype ($P = 0.048$), well to moderately differentiated tumors ($P = 0.004$) and presence of lymphovascular invasion ($P = 0.031$).

Regarding intratumoral HER2 protein heterogeneity, the extension of IHC 3+ areas ranged from 10 to 99 % of positive neoplastic cells (Fig. 1d). There was also a

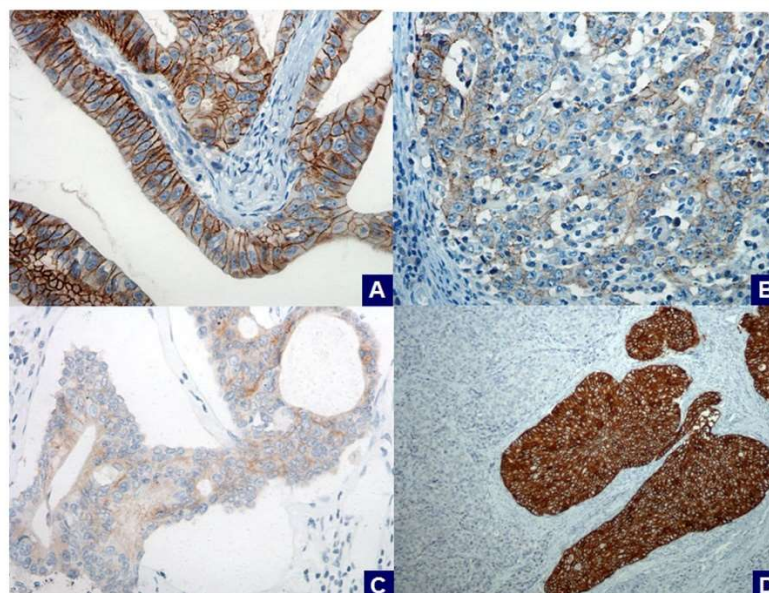


Fig. 1 Immunohistochemical analysis of HER2 expression in gastric carcinomas using the 4B5 antibody in whole-tissue sections. **(a)** a HER2-positive case (3+); **(b)** a HER2-equivocal case (2+); **(c)** a HER2-negative case (1+); **(d)** intratumoral protein heterogeneity in a HER2-positive case (3+). (A-C: x400 field magnification; D: x200 field magnification)

variation in the extension of HER2 immunoreactive areas in the equivocal category, ranging from 10 to 40 % of tumor cells. In both categories, intratumoral protein heterogeneity was mostly seen in mixed type carcinomas, in which HER2 expression highly correlated with intestinal-type areas.

Apart from their HER2 score, many cases displayed a cytoplasmic immunoreactivity in normal gastric mucosa cells (87 cases, 70.2 %), metaplastic epithelium (30 cases, 24.2 %) and *foci* of dysplasia (24 cases, 19.4 %) (Fig. 2). This pattern of expression was seen in both metaplastic and dysplastic epithelium, despite the nature of the metaplasia or the degree of the dysplasia. Nuclear expression was frequently seen among diffuse type carcinomas, but all these immunostained areas were not taken into account for the scoring of the HER2 immunohistochemical profile.

Discussion

In our study, we found a final HER2-positive status of 10.5 %. The overall HER2 positivity rate found in the ToGA study was 810 of 3,665 patients (22.1 %) [6]. These numbers represent one of the largest sets of HER2 testing data in GC samples, obtained from patients from 24 different countries in Asia, Europe and Latin America. Although 22.1 % accounts for more than double the amount of positive tumors we found in our series, the ToGA trial HER2

positivity screening criteria included all cases with protein expression by IHC (3+ and 2+ cases) or gene amplification by ISH alone. More detailed data concerning HER2 testing in the ToGA study has been recently published revealing that precisely 610 cases out of 3,665 tumor samples (16.6 %) were in fact considered HER2 positive, by either scoring IHC 3+ or IHC 2+ with gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [30]. A *post hoc* exploratory analysis concluded that patients in those categories were the ones who utterly benefited the most from treatment with T2B [6]. Thus, the exact percentage of patients eligible for treatment with T2B according to HER2 screening performed on the ToGA trial was 16.6 % and, when IHC results are considered alone, only 398 cases (10.9 %) were actually HER2 positive (3+) [30]. In our study, since no IHC 2+ cases showed gene amplification by SISH, we found a IHC 3+ rate and a final HER2 positive status of 10.5 %.

GC in Brazilian patients tends to arise in the antrum, associated with *Helicobacter pylori* chronic infection, therefore, our series is composed mainly of carcinomas of the distal stomach (80.6 %). Since HER2 expression has been greatly associated with GC of the cardia and GEJ [17, 30–33], we expected to find an even lower positivity rate among our cases. ToGA trial results showed a difference in HER2 positivity rates between Europe/Asia and Central/South America (23.8 and 16.1 % respectively,

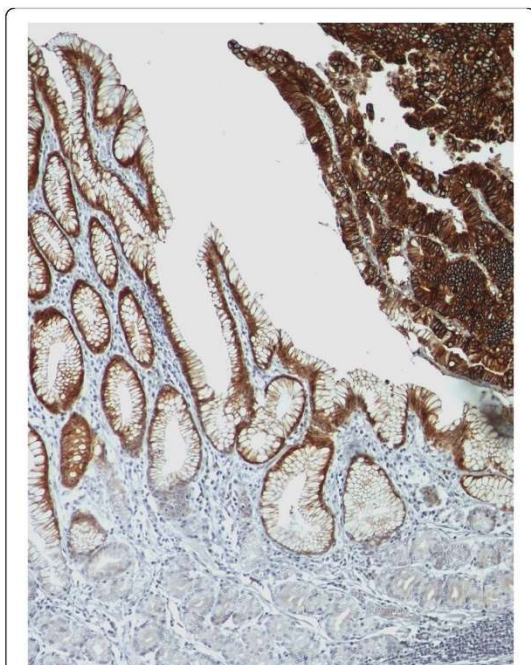


Fig. 2 Possible pitfalls in the immunohistochemical analysis of HER2 protein expression using the 4B5 antibody. Cytoplasmic non specific staining in normal foveolar gastric mucosa (left) and in a focus of gastric high-grade dysplasia (right) (x200 field magnification)

including all FISH-positive and IHC 3+ cases). The authors associated the contrasting results as due to the lower number of patients screened in Latin America (484 out of 3,665 patients) instead of a possible variation in tumor biology [30]. Unfortunately, we could not find information specifically regarding HER2 expression in GC of Brazilian patients enrolled in the ToGA study. If cross-data between tumor topography and patients' countries of origin could be retrieved, it might also help explain divergent HER2-positive GC rates in Latin America.

Similar to our results, in a recent large European series [34], as well as in a Japanese cohort of 1,461 patients [35], there was no difference in HER2 positivity between proximal and distal gastric tumors. However, two large Chinese series [17, 33] recently showed significantly higher HER2 expression in proximal GC, in agreement with ToGA trial findings [30] and with results from a series of 2,798 South Korean patients [32]. The authors have implied that intestinal-type cancers are usually more frequent in the GEJ and, as different etiologies may play a role in carcinogenesis of tumors from these two locations, this could partially justify distinct HER2 expression rates according to tumor topography [30]. In addition to the genetic ancestry according to ethnicity, multiple gastric

carcinogenesis pathways may be greatly influenced by dietary habits and chronic *Helicobacter pylori* infection [3]. Although this probably also has some influence on HER2 positivity rates found in different populations with GC, the relation between these factors and HER2 expression remains unknown, with few papers published [36, 37].

The number of IHC 3+ cases found in our study could be explained in part by the fact that whole-tissue sections were exclusively used for HER2 evaluation, instead of endoscopic biopsies. A recent study paired primary gastrectomies and their endoscopic biopsies to compare HER2 expression scores and found a concordance rate of only 57 %, mostly due to intratumoral HER2 heterogeneity [38]. HER2 genetic heterogeneity by ISH has been previously demonstrated on breast cancer, but it seems to be a more complex issue on GC specimens [39]. Protein expression heterogeneity by IHC, usually referred as variability in immunohistochemical intensity and extension of HER2-positive areas, is also a problem which could greatly impact on sample selection for HER2 testing in GC. In fact, HER2 expression heterogeneity has been demonstrated not only by our study but also by other authors [39, 40], including a study comprising 2,727 gastrectomies [32]. As a result, whole-tissue sections obtained from resected primary gastric tumors may offer a larger representation of different sub clonal cancer cell population which could help avoid false-negative results due to HER2 heterogeneity. Since patients with locally advanced or metastatic GC might not undergo primary gastrectomy, whole-tissue sections are not always available and other GC samples ought to be used instead, raising the question as to which are the best suited for HER2 testing: endoscopic biopsies *versus* metastatic lesions. For endoscopic biopsies, the recommendation is a viable number of representative tumor fragments (ideally 6–8) and, if possible, the pathologist should also perform HER2 testing on another specimen when a negative result is found on a tumor endoscopic biopsy [40].

In addition, GC samples from the ToGA trial were tested for HER2 expression with the HercepTest kit, which uses a rabbit polyclonal anti-HER2 antibody [6], whereas a rabbit monoclonal antibody (4B5) was employed in our study. Other studies have reported lower sensitivity rates for HercepTest in comparison with 4B5 clone for the detection of HER2 protein expression [15, 41, 42]. This could also account for the similar IHC 3+ percentage of cases found in our series and on the ToGA trial, despite the predominance of tumors from the distal stomach among our patients.

Data on HER2 expression in Brazilian patients with GC are very limited and there is a wide variation on published results. The first two studies ever conducted in Brazil found a HER2 overexpression rate of 12 and

5.4 %, including IHC 3+ and 2+ cases added together [23, 24]. However, the grading score for breast cancer was used for HER2 status assessment, in which the entire cell membrane should be stained, and not only lateral or basolateral walls, which suggests underestimation of HER2 positivity. In more recent research using specific HER2 scoring criteria for GC, IHC 3+ cases ranged from 0.8 % to 11.6 % [19–22, 25, 26]. Studies showing the lowest rates (0.8 %, 3 % and 6 %) used tumor tissue microarrays (TMAs) obtained from surgical specimens and other anti-HER2 antibodies rather than 4B5 [19, 20, 22]. These results are difficult to be compared with ours due to methodological differences, especially when TMAs and tumoral protein expression heterogeneity are confronted. Thus, TMAs could represent samples more similar to endoscopic biopsies rather than to larger whole-tissue sections from primary gastrectomies, which were used in our study.

Our results corroborate current literature findings on Brazilian patients with GC tested for HER2 expression using a highly sensitive anti-HER2 antibody in whole-tissue tumor sections. As a matter of fact, a recent analysis from a Brazilian cancer center compared the performance of HercepTest, SP3 and 4B5 antibodies between whole-tissue sections and TMAs in a series of 199 gastrectomies [21].

The authors found the highest HER2 positivity rate using the same parameters of our study: 4B5 antibody in whole-tissue tumor sections (11.6 %), a value most similar to our finding (10.5 %). The lowest HER2 positivity rate was identified among TMAs and HercepTest kit (3 %) [21].

Despite the higher sensitivity found with the 4B5 antibody, some authors have also reported extensive cytoplasmic background staining of the gastric foveolar layer and *foci* of intestinal metaplasia/dysplasia, as seen in our study, which suggests an intrinsic clonal characteristic rather than a methodological problem [15, 21, 41, 42]. In fact, HER2 staining of dysplastic epithelium has been correlated to gene amplification by ISH [43]. Although there were no difficulties in distinguishing HER2-positive neoplastic cells from those areas, we stress that the staining of the latter must not be considered when scoring HER2 expression.

Until the writing of the present manuscript the authors were able to retrieve only three other studies regarding ISH for gene amplification detection in GC samples from Brazilian patients [19, 21, 25]. Begnami et al. found an overall amplification rate of 8 % using FISH, but the percentage of IHC 2+ amplified cases was not mentioned [19]. Similar to our findings, another group did not find any

Table 2 HER2 expression in gastric cancer: analysing studies with patients from different parts of the world

Study	Year	Patients' place of origin	Number of patients	HER2 positive rate (%)	Association with clinicopathological features
Bang YJ [6]	2010	ToGA trial (Multicenter)	3,665	16.6	Topography (GEJ) Intestinal-type
Begnami MD [19]	2011	Brazil (Single center)	221	8.0	Intestinal-type Low-grade
Cruz-Reyes C [45]	2013	Mexico (Single center)	269	3.7	Intestinal-type
Cho J [32]	2013	South Korea (Single center)	2,798	7.3	Older age Male gender Intestinal-type Upper-third stomach Higher lymph node stage Advanced staging
Shan L [17]	2013	China (Single center)	1,463	9.8	Topography (GEJ) Intestinal-type Low-grade
Matsusaka S [35]	2015	Japan (Multicenter)	1,461	15.6	Intestinal-type Hepatic metastasis Absence of peritoneal metastasis
Cappellesso R [34]	2015	Europe (Multicenter)	1,040	11.0	Intestinal-type Low-grade
Laboissiere RS	2015	Brazil (Single Center)	124	10.5	Intestinal-type Low-grade Lymphovascular invasion

GEJ gastroesophageal junction

amplified cases among IHC 2+ tumors, although FISH was the employed method [25]. Besides our study, only another one applied silver brightfield dual ISH in IHC 2+ cases [21]. Results showed a wide range of amplification rates (from zero to 100 %), according to the primary antibody used for IHC and tissue samples (whole-tissue sections *versus* TMAs). 4B5 antibody on 198 whole-tissue sections revealed 20 cases with a equivocal HER2 score (10.1 %) of which only 6 cases (30 %) showed gene amplification by SISH [21]. The percentage of cases with a final HER2 positive status was 14.6 %, a slightly higher rate than the one we uncovered, which could be partly due to the lower frequency of distal GC (43.2 %) in their series. They have concluded that the most accurate IHC method for evaluating HER2 expression in GC was to use the 4B5 antibody on whole-tissue sections [21], which was exactly the method employed in our study.

Moreover, we found an association between HER2 positive tumors and some pathological parameters, such as Laurén's intestinal subtype ($P = 0.048$), well to moderately differentiated tumors ($P = 0.004$) and presence of lymphovascular invasion ($P = 0.031$). The intestinal subtype has been proven to be the pathological feature most invariably associated with HER2 positivity in multiple studies [17, 32, 34, 35, 44, 45], including the ToGA trial [30] and some with Brazilian patients [19, 22, 23, 26]. Since HER2 positivity is expected to be found on intestinal-type tumors, we strongly encourage that, when dealing with a mixed-type tumor, areas showing an intestinal morphology should be selected for HER2 scoring.

Association of HER2 positivity with histological grade and presence of lymphovascular invasion has also been reported by some authors [19, 25, 31, 46] but not by others [20, 47]. A recent meta-analysis comprising 15 studies and 5,290 patients concluded that not only Laurén's classification system but also tumor differentiation and lymphovascular invasion were associated with HER2 positivity [48]. Table 2 summarizes results from various studies concerning HER2 positivity rates and the association between HER2 expression with clinicopathological features in patients with GC from different parts of the world, in comparison to our findings.

Conclusions

Our study demonstrates a HER2-positive GC frequency of 10.5 % among Brazilian patients, analogous to rates observed in different populations from studies applying similar methodology. Also, our findings showed an association of HER2 positive status with Laurén's intestinal subtype, well to moderately differentiated tumors, and presence of lymphovascular invasion, as it has been reported by other authors. Finally, there was no association found with tumor topography mainly due to the predominance of carcinomas

of the gastric antrum in our series, as expected among Brazilian patients with GC.

Abbreviations

CEP17: chromosome 17; FISH: fluorescence *in situ* hybridization; GC: gastric cancer; GEJ: gastroesophageal junction; IHC: immunohistochemistry; ISH: *in situ* hybridization; SISH: silver *in situ* hybridization; TMA: tissue microarray; TZB: trastuzumab.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RSL conceived of the study, participated in its design and execution. MAB carried out the immunohistochemistry assay. DB performed the statistical analysis and helped draft the manuscript. MDB participated in the design of the study and helped draft the manuscript. CBN performed immunohistochemical scoring and gene amplification analysis. RMR carried out the *in situ* hybridization assay. MMDA reviewed histological parameters and helped draft the manuscript. HG conceived of the study, and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

RSL: Department of Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of São João Del-Rei, São João Del-Rei, Brazil
MDB, CBN, MMDA, HG: Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Author details

¹Departamento de Medicina DEMED-UFSJ, Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74. Fábricas, São João del-Rei, MG 36301-160, Brazil. ²Departamento de Anatomia Patológica FM-UFMG, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190 - 3o. andar, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil.

Received: 17 August 2015 Accepted: 21 October 2015

Published online: 04 November 2015

References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.
- Power DG, Kelsen DP, Shah MA. Advanced gastric cancer—slow but steady progress. *Cancer Treat Rev*. 2010;36:384–92.
- Sugano K. Gastric cancer: pathogenesis, screening, and treatment. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2008;18:513–22.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014. p. 38–9.
- 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;24:2137–50.
- Bang YJ, Van Cutsem E, 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;376:687–97.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177–82.
- Hudis CA. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007;357:39–51.
- Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26:6469–87.
- Bilici A. Treatment options in patients with metastatic gastric cancer: current status and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20:3905–15.

11. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52:797–805.
12. Rüschhoff 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;457:299–307.
13. Yan B, Yau EX, Bte Omar SS, Ong CW, Pang B, Yeoh KG, et al. A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer. *J Clin Pathol*. 2010;63:3839–42.
14. Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, 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;15:65–71.
15. Boers JE, Meeuwissen H, Methorst N. HER2 status in gastro-oesophageal adenocarcinomas assessed by two rabbit monoclonal antibodies (SP3 and 4B5) and two in situ hybridization methods (FISH and SISH). *Histopathology*. 2011;58:383–94.
16. Kunz PL, Mojtahe 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;20:13–24.
17. Shan L, Ying J, Lu N. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. *Diagn Pathol*. 2013;8:76.
18. Chua TC, Merrett ND. Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes - a systematic review. *Int J Cancer*. 2012;130:2845–56.
19. Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, Nonogaki S, Montagnini AL, da Costa Jr WL, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J Clin Oncol*. 2011;29:3030–6.
20. Jung JE, Ioshii SO. Immunohistochemical assessment of HER2 expression in gastric cancer in a cohort of 118 Brazilian patients. *J Bras Patol Med Lab*. 2013;49:361–7.
21. Abrahão-Machado LF, Jácome AA, Wohnrath DR, dos Santos JS, Carneseca EC, Fregnani JH, et al. HER2 in gastric cancer: comparative analysis of three different antibodies using whole-tissue sections and tissue microarrays. *World J Gastroenterol*. 2013;19:6438–46.
22. Jácome AA, Wohnrath DR, Scapulatempo Neto C, Carneseca EC, Serrano SV, Viana LS, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptors in gastric cancer: a survival analysis by Weibull model incorporating long-term survivors. *Gastric Cancer*. 2014;17:76–86.
23. Begnami MD, Campos AH, Silva E, Montagnini A, Nascimento CF, Nonogaki S, et al. Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(4):279–86.
24. Cime-Lima FK, Rosa Ade S, 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):131–4.
25. Damasceno EA, Carneiro FP, Magalhães AV, Carneiro Mde V, Takano GH, Vianna LM, et al. IMP3 expression in gastric cancer: association with clinicopathological features and HER2 status. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(12):2163–8.
26. De Carli DM, Rocha MP, Antunes LC, Fagundes RB. Immunohistochemical expression of her2 in adenocarcinoma of the stomach. *Arq Gastroenterol*. 2015;52(2):152–5.
27. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009. p. 73–8.
28. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2009. p. 117–26.
29. Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49.
30. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, Xu JM, Lee KW, Jiao SC, et al. HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):476–84.
31. Moelans CB, Van Diest PJ, Milne AN, Offerhaus GJ. Her-2/neu testing and therapy in gastroesophageal adenocarcinoma. *Patholog Res Int*. 2010;2011:674182.
32. Cho J, Jeong J, Sung J, Sung CO, Kim KM, Park CK, et al. A large cohort of consecutive patients confirmed frequent HER2 positivity in gastric carcinomas with advanced stages. *Ann Surg Oncol*. 2013;20:5477–84.
33. Fan XS, Chen JY, Li CF, Zhang YF, Meng FQ, Wu HY, et al. Differences in HER2 over-expression between proximal and distal gastric cancers in the Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2013;19:3316–23.
34. Cappellesso R, Fassan M, Hanspeter E, Bomschein J, d'Amore ES, Cuorvo LV, et al. HER2 status in gastroesophageal cancer: a tissue microarray study of 1040 cases. *Hum Pathol*. 2015;46:665–72.
35. Matsusaka S, Nashimoto A, Nishikawa K, Miki A, Miwa H, Yamaguchi K, et al. Clinicopathological factors associated with HER2 status in gastric cancer: results from a prospective multicenter observational cohort study in a Japanese population (JFMC44-1101). *Gastric Cancer*. 2015 Aug 12. [Epub ahead of print].
36. Menendez JA, Papadimitropoulou A, Vellon L, Lupu R. A genomic explanation connecting "Mediterranean diet", olive oil and cancer: oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory "PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site" complexes at the Her-2/neu (erbB-2) oncogene promoter in breast, ovarian and stomach cancer cells. *Eur J Cancer*. 2006;42:2425–32.
37. Yoo MW, Han HS, Kim SY, Cho YH, Lee HG, Kim JH, et al. Is *Helicobacter pylori* associated with Her2/neu Overexpression in Gastric Cancer Patients who Underwent Curative Resection? *Hepatogastroenterology*. 2014;61:858–62.
38. Yoshida H, Yamamoto N, Taniguchi H, Oda I, Katai H, Kushima R, et al. Comparison of HER2 status between surgically resected specimens and matched biopsy specimens of gastric intestinal-type adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2014;465:145–54.
39. Yang J, Luo H, Li Y, Li J, Cai Z, Su X, et al. Intratumoral heterogeneity determines discordant results of diagnostic tests for human epidermal growth factor receptor (HER) 2 in gastric cancer specimens. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62:221–8.
40. Lee S, De Boer WB, Fermoye S, Platten M, Kumarasinghe MP. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: issues related to heterogeneity in biopsies and resections. *Histopathology*. 2011;59:832–40.
41. Radu OM, Foxwell T, Cieply K, Navina S, Dacic S, Nason KS, et al. HER2 amplification in gastroesophageal adenocarcinoma: correlation of two antibodies using gastric cancer scoring criteria, H score, and digital image analysis with fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol*. 2012;137:583–94.
42. Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, et al. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use? *Hum Pathol*. 2012;43:413–22.
43. Fassan M, Mastracci L, Grillo F, Zagonel V, Bruno S, Battaglia G, et al. Early HER2 dysregulation in gastric and oesophageal carcinogenesis. *Histopathology*. 2012;61:769–76.
44. 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;16:84–93.
45. Cruz-Reyes C, Gamboa-Dominguez A. HER2 amplification in gastric cancer is a rare event restricted to the intestinal phenotype. *Int J Surg Pathol*. 2013;21:240–6.
46. 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;18:2833–40.
47. Fisher SB, Fisher KE, Squires 3rd MH, Patel SH, Kooby DA, El-Rayes BF, et al. HER2 in resected gastric cancer: Is there prognostic value? *J Surg Oncol*. 2014;109:61–6.
48. Liang JW, Zhang JJ, Zhang T, Zheng ZC. Clinicopathological and prognostic significance of HER2 overexpression in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumour Biol*. 2014;35:4849–58.

4.2. ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE

Elsevier Editorial System(tm) for Pathology

- Research and Practice

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: A parallel between HER2 protein expression in primary gastric carcinoma and corresponding synchronous lymph node metastases

Article Type: Full Length Article

Keywords: HER2; gastric cancer; immunohistochemistry; lymph node metastasis; clinicopathological features

Corresponding Author: Prof. Renato Santos Laboissiere, M.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of São João del-Rei UFSJ

First Author: Renato Santos Laboissiere, M.D.

Order of Authors: Renato Santos Laboissiere, M.D.; Marcelo A Buzelin; Débora Balabram, M.D., PhD; Mônica M Demas Álvares Cabral, M.D., PhD; Helenice Gobbi, M.D., PhD

Abstract: Trastuzumab was recently approved for advanced gastric cancer in patients with HER2-positive tumors. Even though anti-HER2 treatment is indicated for metastatic carcinomas, eligible patients are selected by HER2 testing in the primary tumor. Our aim was to characterize the concordance rate of HER2 protein expression between primary tumors and correlated metastatic lymph nodes. Histological slides from 137 primary gastrectomies and corresponding lymphadenectomies were reviewed and their pathological reports were retrieved from the files at a Brazilian university hospital. Immunohistochemistry for HER2 was performed on whole-tissue sections from each primary tumor and from paired lymph node metastases in 85 cases. HER2 status was confronted with clinicopathological parameters in order to assess statistically significant associations. Immunohistochemistry analysis revealed that 17/137 primary tumors (12.4%) and 12/85 metastatic lymph nodes (14.1%) showed HER2 overexpression. There were associations between intestinal-type tumors and tumor differentiation and HER2 expression in primary tumor ($P=0.026$ and $P=0.005$) and metastatic samples ($P=0.008$ and $P<0.001$). The concordance rate was of 88.2% (κ -value of 0.515, indicative of a moderate agreement). There were 10 discordant cases, from which five cases (5.9%) were HER2 positive in the primary cancer and negative in nodal metastases, while five cases (5.9%) showed a negative result in the surgical resection specimen and HER2 positivity in metastatic lymph nodes. Since eligible patients for anti-HER2 treatment may remain undetected if immunohistochemistry is performed only in primary tumor samples, HER2 testing in lymph node metastases is encouraged as HER2 status can change between primary gastric cancer and corresponding synchronous metastases.

***Manuscript**

Title page

Title of the article

A parallel between HER2 protein expression in primary gastric carcinoma and corresponding synchronous lymph node metastases

Authors

Renato Santos Laboissiere^a - renatoslab@gmail.com **(Corresponding Author)**

Marcelo Araújo Buzelin^b - marcelobuzelin@hotmail.com

Débora Balabram^b - debalabra@gmail.com

Mônica Maria Demas Álvares Cabral^b - mgalvarescabral@hotmail.com

Helenice Gobbi^b - helenicegobbi@gmail.com

Authors' affiliations

^aDepartment of Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of São João del-Rei.

Campus Dom Bosco. Praça Dom Helvécio, 74. Fábricas – São João del-Rei – MG – Brazil
36301-160

^bDepartment of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas

Gerais.

Avenida Prof. Alfredo Balena, 190 - 3o. andar – Belo Horizonte – MG – Brazil

30130-100

Abstract

Trastuzumab was recently approved for advanced gastric cancer in patients with HER2-positive tumors. Even though anti-HER2 treatment is indicated for metastatic carcinomas, eligible patients are selected by HER2 testing in the primary tumor. Our aim was to characterize the concordance rate of HER2 protein expression between primary tumors and correlated metastatic lymph nodes. Histological slides from 137 primary gastrectomies and corresponding lymphadenectomies were reviewed and their pathological reports were retrieved from the files at a Brazilian university hospital. Immunohistochemistry for HER2 was performed on whole-tissue sections from each primary tumor and from paired lymph node metastases in 85 cases. HER2 status was confronted with clinicopathological parameters in order to assess statistically significant associations. Immunohistochemistry analysis revealed that 17/137 primary tumors (12.4%) and 12/85 metastatic lymph nodes (14.1%) showed HER2 overexpression. There were associations between intestinal-type tumors and tumor differentiation and HER2 expression in primary tumor ($P=0.026$ and $P=0.005$) and metastatic samples ($P=0.008$ and $P<0.001$). The concordance rate was of 88.2% (κ -value of 0.515, indicative of a moderate agreement). There were 10 discordant cases, from which five cases (5.9%) were HER2 positive in the primary cancer and negative in nodal metastases, while five cases (5.9%) showed a negative result in the surgical resection specimen and HER2 positivity in metastatic lymph nodes. Since eligible patients for anti-HER2 treatment may remain undetected if immunohistochemistry is performed only in primary tumor samples, HER2 testing in lymph node metastases is encouraged as HER2 status can change between primary gastric cancer and corresponding synchronous metastases.

Keywords

HER2; gastric cancer; immunohistochemistry; lymph node metastasis;
clinicopathological features

Abbreviations

GC – gastric carcinoma

GEJ – gastroesophageal junction

ToGA – Trastuzumab for Gastric Cancer study

IHC – immunohistochemistry

ISH – *in situ* hybridization

Introduction

Gastric carcinoma (GC) is the second leading cause of cancer-related deaths and about one million cases are estimated to occur each year in the world [1,2]. This disease is frequently diagnosed at an advanced stage, when metastases are usually present and treatment options are generally scarce [2]. In this scenario, HER2-targeted therapy has been introduced as an option for patients with HER2-positive advanced GC [3]. International regulatory agencies recently approved the use of trastuzumab for treatment of HER2-positive metastatic or locally advanced carcinomas arising in the stomach or in the gastroesophageal junction (GEJ), based on results from the Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) study [4].

Even though patients who are eligible to receive HER2-targeted therapies already present with metastatic disease at diagnosis, HER2 tests are usually conducted on primary cancer samples. A limited number of studies has compared HER2 status in gastric surgical resection specimens and paired metastases from different metastatic sites [5-13]. When synchronous metastatic lymph nodes are taken into account, some authors found discordant HER2 status between those samples and primary GC, raising the question if one should perform HER2 testing in metastatic lymph nodes when facing a negative result in the primary tumor [9,14-18].

Therefore, in the present study, we aimed to investigate the concordance rate of HER2 protein expression in GC using whole-tissue tumor sections from surgical specimens and paired synchronous lymph node metastases and to evaluate the association between HER2 status and clinicopathological data.

Material and methods

Pathological reports from 137 primary gastrectomies and corresponding lymphadenectomies were retrieved from the files at the Clinics Hospital, Federal University of Minas Gerais, Brazil. Surgery was performed between January 2007 and December 2011 and patients had not received neoadjuvant chemotherapy or any type of treatment for their tumor prior to surgery.

The present study was approved by the Ethics Committee of our institution (CAAE protocol number 32898114.9.0000.5149), in accordance with institutional guidelines. Two pathologists (RSL and MMDAC) simultaneously reviewed original slides to confirm the diagnosis of GC and revised pathological parameters, including Laurén's histological subtyping, tumor grading and depth of invasion, presence of

lymphovascular and blood vessel invasion. Tumors were divided into two groups according to gastric topography: distal and proximal tumors, the latter category included carcinomas from the GEJ. The TNM system criteria and recommendations from the seventh Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual were used for tumor staging [19,20]. Synchronous lymph node metastasis were present in 85 cases (62%).

New 4µm-thick sections from formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks of the primary tumor and metastatic lymph nodes were submitted to immunohistochemistry (IHC) using DAKO HercepTest™ kit (Dako, Glostrup, Denmark), according to the manufacturer's instructions. All slides were counterstained with hematoxylin. In-house pre-tested HER2-positive breast cancer tissue sections and positive control sections supplied by DAKO (Dako, Glostrup, Denmark) were used as external positive controls. HER2 protein expression was assessed according to Hofmann's and Rüschoff's [21,22] recommendations for gastric surgical specimens using the following score: 0, no staining, or membranous staining in < 10% of neoplastic cells; 1+, faint and discontinuous membranous staining in > 10% of neoplastic cells; 2+, weak to moderate complete or basolateral membranous staining in > 10% of neoplastic cells; 3+, strong complete or basolateral membranous staining in > 10% of neoplastic cells. Samples that scored 2 + or 3+ were considered positive for HER2 protein overexpression, while cases that fell into 0 or 1+ categories were regarded as HER2 negative.

Concordance between HER2 status in the primary tumor and related metastatic lymph node was calculated using Cohen's kappa (κ). A κ -value 0-0.2 indicates no agreement, 0.21-0.4 fair agreement, 0.41-0.6 moderate agreement, 0.61-0.8 substantial agreement and 0.81-1 an almost perfect agreement. The Pearson chi-square test was

conducted to correlate HER2 expression with clinicopathological features. This test was also used to verify if there were any associations between clinicopathological parameters and concordant and discordant cases for HER2 status, considering results for primary and metastatic tumor samples from the same patient. A *P* value of less than 0.05 was regarded as statistically significant and all *P* values were two-sided. Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Among 137 patients included in this study, there were 72 men (52.6%) and 65 women (47.4%). Patients' age at the time of diagnosis varied from 28 to 92 years (median: 63.2 years). Distal tumors were identified in 112 patients (81.8%) and proximal GC in 25 patients (18.2%). According to Laurén's classification system, 68 cases (49.6%) showed intestinal morphology, while 22 (16.1%) were categorized as diffuse, and 39 (28.5%) as of mixed subtype. The eight remaining cases (5.8%) were classified as undetermined. Well and moderately differentiated tumors were observed in 15 (10.9%) and 47 (34.3%) cases, respectively, while poorly differentiated tumors were present in 75 cases (54.8%). Advanced tumors (pT2, pT3 and pT4 categories) accounted for 119 cases (86.9%). Blood-vessel invasion was found in 49 cases (35.8%) whereas lymphovascular invasion was more frequently identified (103 cases, 75.2%). An average of 30.1 lymph nodes per case were found in the adipose tissue (range, 2 to 80). Lymph node metastases were detected in 85 patients (62.0%) with an average of 9.9 metastatic nodes per case (range, 1 to 73).

Clinicopathological characteristics and their association with HER2 status in primary GC and lymph node metastases are shown in Table 1.

Immunohistochemical evaluation of 137 primary tumor samples uncovered 17 HER2-positive cases (12.4%), from which 12 (8.8%) were IHC 3+ and five (3.6%) were IHC 2+. There were 120 cases negative for HER2 protein expression, seven of them (5.1%) classified as IHC 1+. There was a positive association between HER2 positivity and histological grade of tumors ($P=0.005$), as well as with Laurén's intestinal subtype ($P=0.026$).

Considering metastatic samples from 85 patients with lymph node involvement, 12 cases (14.1%) were positive for HER2, five of which (5.9%) were IHC 3+. There were 73 (85.9%) HER2-negative cases, with four cases (4.7%) classified as IHC 1+. Statistically significant associations were also found between HER2-positive status in lymph node metastasis and tumor grade ($P<0.001$) and histological classification ($P=0.008$).

There was no association between HER2 expression in primary GC or metastatic samples and tumor topography in the stomach, patients' age or gender.

The overall concordance rate between HER2 status in primary tumors and matched synchronous metastases was 88.2%, with a κ -value of 0.515 (95% confidence interval: 0.302-0.727, $P<0.001$), indicative of a moderate agreement. While 68 cases were concordantly negative for HER2 expression in primary GC and related nodal metastasis, seven cases were considered HER2-positive in both gastrectomies and metastatic samples.

Discordant IHC results were seen in 10 cases (11.8%). A negative conversion, when the HER2 status was positive in the primary tumor and negative in the lymph node metastasis, was evidenced in 5 cases (5.9%) (Figure 1). The remaining five cases (5.9%)

showed a positive conversion, demonstrated by a HER2-negative result in the primary sample and a HER2-positive status in the matched synchronous metastasis (Figure 2).

Table 2 displays more detailed information on these ten discordant cases.

No statistical significance was found when patients were divided into two groups, according to HER2 concordant and discordant IHC results, and were confronted with clinicopathological characteristics, as shown in Table 3.

Discussion

In the present study, we found a HER2 overexpression rate of 12.4% in primary tumor samples and of 14.1% in nodal metastases, with an overall agreement between the primary tumor and metastatic lymph nodes of 88.2%. HER2 positivity rates vary greatly among different studies in the literature, ranging from 2 to 45% in primary GC samples, mainly due to differences in methods applied for HER2 testing, patient selection and sampling but a large systematic review including data from 49 studies and 11,337 patients with GC found a median rate of 18% for HER2 positivity [23]. The frequency of HER2-positive cases in our study was expected to be lower than this since our series encloses few cases of tumors emerging from the GEJ, which tend to overexpress HER2 more often [4,24]. The slightly larger proportion of HER2-positive cases among metastatic lymph nodes versus primary tumors (14.1% versus 12.4%) could be partially explained by the intrinsic selection of a more aggressive tumor biology in this group of metastatic carcinomas, considering that HER2 overexpression has been associated with metastatic pathways and poor prognosis in GC [4,23,25-27].

Statistically significant associations were found between HER2 status in primary GC and clinicopathological features, such as Laurén's intestinal subtype ($P=0.026$) and well

to moderately differentiated tumors ($P=0.005$), similarly to other reports in the literature [4,23,24]. Actually, in a recent meta-analysis comprising 15 studies and 5,290 patients, authors concluded that Laurén's subtyping and tumor grade were both associated with HER2 positivity in GC [27]. In our study, this was also demonstrated between HER2-positive cases in metastatic lymph nodes and the same pathological parameters ($P=0.008$ for histological classification and $P<0.001$ for tumor grade). The overall concordance rate for IHC results between primary GC and matched lymph node metastases was 88.2% with 10 discordant cases and a κ -value of 0.515, showing a moderate agreement. Table 4 summarizes results from various studies [9,14-18] concerning HER2 positivity concordance rates between primary GC and paired metastatic lymph nodes. Although there is a reasonably wide variation among the concordance rates (from 78.2 to 93.0%), most of them were able to uncover numbers around 90%, an indication of a strong agreement between results. Some of those studies obtained HER2 status by using IHC and *in situ* hybridization (ISH) for gene amplification, which might make their results more difficult to compare to ours [9,15-18]. A recent meta-analysis comparing 18 studies with a total of 1,867 primary GC paired with samples from different metastatic sites demonstrated a pooled concordance proportion of 92.0% in studies using IHC alone [28]. When studies using IHC and ISH were taken into account, 85.0% was the pooled concordance proportion found. For loco-regional lymph nodes only, there were 15 studies involved and a concordance rate of 93.0% on average [28]. The best HER2 testing method and assay for prediction of therapy response in patients with GC is still controversial [4,22,25]. It has been suggested that protein expression assessed by IHC correlates better with trastuzumab response than gene amplification by ISH, which may not be the primary

mechanism for HER2 overexpression in GC [4]. Considering that trastuzumab is a monoclonal antibody targeting HER2 protein on the cell surface [3], it seems reasonable to think that IHC better reflects the quantity of HER2 receptor expression, instead of HER2 gene copies by ISH.

Nevertheless, every one of the studies in Table 4 uncovered discordant cases and there was a tendency to find more positive than negative conversions (ranging from 3.7 and 15.3% for positive conversion versus 1.2 and 6.5% for negative conversion). Our study demonstrated the same proportion of cases showing positive and negative conversions (5.9%). The pooled proportion of negative and positive conversions in meta-analysis was 17% and 4%, respectively, but these numbers included cases that also compared primary samples and distant metastases [28].

When faced with loss of HER2 expression in metastatic deposits (negative conversion), it is tempting to speculate that a mixed-type tumor demonstrated glandular formation in the primary sample but only presented the diffuse component in metastatic lymph nodes, which is usually HER2-negative. This seems not to be the case in our series, since none of the mixed-type tumors showed this behavior, as shown in Table 2. On the other hand, at least one case displayed undetermined morphology in the metastasis while the primary tumor was classified as of intestinal-type, which could account for changes in HER2 expression.

Divergent results could also be related to tumor representation issues but this was less of a problem in our series since we used whole-tissue sections instead of tissue microarrays and primary tumor samples were obtained from surgical resections and not from endoscopic biopsies.

Alterations between HER2 status in primary GC and matched metastatic lymph nodes might be also partially explained by HER2 heterogeneity. Although Rüschoff *et al.* [29] recently established HER2 heterogeneity in GC as positive staining of less than 30% of neoplastic cells, other studies have used diverse definitions that remarkably vary from 5 to 90% of reported heterogeneity [30,31]. Indeed, all the primary GC samples in our series with HER2 overexpression in more than 60% of tumor cells revealed concordant results in related metastases. Furthermore, in four cases displaying positive conversion, the extension of HER2 expression in metastatic tumor cells was lower than 50%. Only one case demonstrated no reaction in the primary GC and strong immunostained pattern in 99% of metastatic deposits (Figure 2), possibly because of subclonal selection related to disease progression.

Although there was a concordance rate of 88.2% among primary GC and corresponding nodal metastases in the present study, our data implies that 5.9% of patients may lose the chance to receive anti-HER2 therapy if HER2 testing is performed only in the primary GC site. Therefore, we endorse the recommendation for HER2 testing in both primary GC and metastatic lymph nodes whenever possible, as suggested by other authors [15-17,28]. Although Hedner *et al.* [18] recently found that discordant HER2 overexpression in primary GC and paired lymph node metastases correlates with poor prognosis, we stress that studies to elucidate the clinical significance for treatment change in patients with GC and HER2 status discordance between primary and metastases are still needed.

Conclusions

In conclusion, HER2 protein expression in our series was often concordant between primary GC and paired synchronous lymph node metastases (88.2%). However, according to our data, when HER2 testing is performed only in the surgical resection specimen, 5.9% of patients with a negative primary tumor but positive metastases may be excluded from receiving HER2 targeted therapies. Whenever possible, HER2 testing should be conducted in both primary tumor samples and metastatic lymph nodes in order to avoid that eligible patients for anti-HER2 treatment remain undetected.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, et al., Global cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69-90.
- [2] D.G. Power, D.P. Kelsen, M.A. Shah, Advanced gastric cancer--slow but steady progress, *Cancer Treat. Rev.* 36 (2010) 384-392.
- [3] A. Bilici, Treatment options in patients with metastatic gastric cancer: current status and future perspectives, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 3905-3915.
- [4] Y.J. Bang, E. Van Cutsem, A. Feyereislova, 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* 376 (2010) 687-697.

- [5] A.H. Marx, L. Tharun, J. Muth, et al., HER2 amplification is highly homogenous in gastric cancer, *Hum. Pathol.* 40 (2009) 769–777.
- [6] J.H. Kim, M.A. MA, H.S. Lee, et al., Comparative analysis of protein expressions in primary and metastatic gastric carcinomas, *Hum. Pathol.* 40 (2009) 314–322.
- [7] M.A. Kim, H.J. Lee, H.K. Yang, et al., Heterogeneous amplification of ERBB2 in primary lesions is responsible for the discordant ERBB2 status of primary and metastatic lesions in gastric carcinoma, *Histopathology* 59 (2011) 822–831.
- [8] C. Bozzetti, F.V. Negri, C.A. Lagrasta, et al., Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma, *Br. J. Cancer* 104 (2011) 1372–1376.
- [9] M. Fassan, K. Ludwig K, M. Pizzi, et al., Human epithelial growth factor receptor 2 (HER2) status in primary and metastatic esophagogastric junction adenocarcinomas, *Hum. Pathol.* 43 (2012) 1206-1212.
- [10] E.Y. Cho, K. Park, I. Do, et al., Heterogeneity of ERBB2 in gastric carcinomas: a study of tissue microarray and matched primary and metastatic carcinomas, *Mod. Pathol.* 26 (2013) 677-684.
- [11] R. Shibata, S. Nimura, T. Hashimoto, et al., Expression of human epidermal growth factor receptor 2 in primary and paired parenchymal recurrent and/or metastatic sites of gastric cancer, *Mol. Clin. Oncol.* 2 (2014) 751-755.
- [12] Y. Geng, X. Chen, J. Qiu, et al., Human epidermal growth factor receptor-2 expression in primary and metastatic gastric cancer, *Int. J. Clin. Oncol.* 19 (2014) 303-311.

- [13] O. Gumusay, M. Benekli, O. Ekinçi, et al., Discordances in HER2 status between primary gastric cancer and corresponding metastatic sites, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 45 (2015) 416-421.
- [14] Q. Wei, J. Xu, L. Shen, et al., HER2 expression in primary gastric cancers and paired synchronous lymph node and liver metastases. A possible road to target HER2 with radionuclides, *Tumour Biol.* 35 (2014) 6319-6326.
- [15] M. Kochi, M. Fujii, S. Masuda, et al., Differing deregulation of HER2 in primary gastric cancer and synchronous related metastatic lymph nodes, *Diagn. Pathol.* 8 (2013) 191.
- [16] A. Ieni, V. Barresi, R. Caltabiano, et al., Discordance rate of HER2 status in primary gastric carcinomas and synchronous lymph node metastases: a multicenter retrospective analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 22331–22341.
- [17] F. Selcukbiricik, S. Erdamar, E. Buyukunal, et al., Is her-2 status in the primary tumor correlated with matched lymph node metastases in patients with gastric cancer undergoing curative gastrectomy? *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* 15 (2014) 10607-10611.
- [18] C. Hedner, L. Tran, D. Borg, et al., Discordant human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in primary and metastatic upper gastrointestinal adenocarcinoma signifies poor prognosis, *Histopathology* 68 (2016) 230-240.
- [19] L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind, editors, *TNM classification of malignant tumours*, 7th ed., Wiley-Blackwell, New York, 2009.
- [20] S. Edge, D.R. Byrd, C.C. Compton, et al., editors, *AJCC cancer staging manual*, 7th ed., Springer-Verlag, New York, 2009.

- [21] M. Hofmann, O. Stoss, D. Shi, et al., Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study, *Histopathology* 52 (2008) 797-805.
- [22] J. Rüschoff, M. Dietel, G. Baretton, S. Arbogast, A. Walch, G. Monges, et al., HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing, *Virchows Arch.* 457 (2010) 299-307.
- [23] T.C. Chua, N.D. Merrett, Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes - a systematic review, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 2845-2856.
- [24] L. Shan, J. Ying, N. Lu, HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population, *Diagn. Pathol.* 8 (2013) 76.
- [25] C. Gravalos, A. Jimeno, HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target, *Ann. Oncol.* 19 (2008) 1523-1529.
- [26] C. Chen, J.M. Yang, T.T. Hu, et al., Prognostic role of human epidermal growth factor receptor in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis, *Arch. Med. Res.* 44 (2013) 380-389.
- [27] J.W. Liang, J.J. Zhang, T. Zhang, et al., Clinicopathological and prognostic significance of HER2 overexpression in gastric cancer: a meta-analysis of the literature, *Tumour Biol.* 35 (2014) 4849-4858.
- [28] Z. Peng, J. Zou, X. Zhang, et al., HER2 discordance between paired primary gastric cancer and metastasis: a meta-analysis, *Chin. J. Cancer Res.* 27 (2015) 163-171.
- [29] J. Rüschoff, W. Hanna, M. Bilous, et al., HER2 testing in gastric cancer: a practical approach, *Mod. Pathol.* 25 (2012) 637-650.

- [30] H.E. Lee, K.U. Park, S.B. Yoo, et al., Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer, *Eur. J. Cancer* 49 (2013) 1448–1457.
- [31] Y. Kurokawa, N. Matsuura, Y. Kimura, et al., Multicenter large-scale study of prognostic impact of HER2 expression in patients with resectable gastric cancer, *Gastric Cancer* 18 (2015) 691-697.

Figure captions

Figure 1. Negative conversion of the HER2 status between the primary gastric tumor and paired metastatic lymph node. (A) primary tumor H&E stained; (B) primary tumor HER2-positive (3+); (C) metastatic lymph node H&E stained; (D) metastatic lymph node HER2-negative (0). (A,C and D: x100 field magnification; B: x200 field magnification).

Figure 2. Positive conversion of the HER2 status between the primary gastric tumor and paired metastatic lymph node. (A) primary tumor H&E stained; (B) primary tumor HER2-negative (0); (C) metastatic lymph node H&E stained; (D) metastatic lymph node HER2-positive (3+). (A-B: x400 field magnification; C-D: x100 field magnification).

Table 1

Table 1. Association between clinicopathological parameters and HER2 status in primary tumor samples and lymph node metastases

Parameter	Primary tumor n=137 (%)	HER2 negative 120 (87.6)	HER2 positive 17(12.4)	P value	Lymph node n=85 (%)	HER2 negative 73 (85.9)	HER2 positive 12(14.1)	P value
Age at diagnosis				0.418				0.587
< 60 years	44 (32.1)	40	4		27 (31.8)	24	3	
≥ 60 years	93 (67.9)	80	13		58 (68.2)	49	9	
Gender				0.580				0.819
Female	65 (47.4)	58	7		38 (44.7)	33	5	
Male	72 (52.6)	62	10		47 (55.3)	40	7	
Tumor topography				0.547				0.213
Proximal stomach/GEJ	25 (18.2)	21	4		17 (20.0)	13	4	
Distal stomach	112 (81.8)	99	13		68 (80.0)	60	8	
Histological subtype				0.026				0.008
Diffuse	22 (16.1)	22	0		7 (8.2)	7	0	
Intestinal	68 (49.6)	54	14		39 (45.9)	28	11	
Mixed	39 (28.5)	36	3		33 (38.8)	32	1	
Undetermined	8 (5.8)	8	0		6 (7.1)	6	0	
Histological grade				0.005				<0.001
Well	15 (10.9)	10	5		5 (5.9)	2	3	
Moderately	47 (34.3)	39	8		34 (40.0)	26	8	
Poorly	75 (54.8)	71	4		46 (54.1)	45	1	
Lymphovascular invasion				0.183				0.697
Negative	34 (24.8)	32	2		5 (5.9)	4	1	
Positive	103 (75.2)	88	15		80 (94.1)	69	11	
Blood vessel invasion				0.619				0.306
Negative	88 (64.2)	78	10		47 (55.3)	42	5	
Positive	49 (35.8)	42	7		38 (44.7)	31	7	
pT status				0.151				0.832
pT1	18 (13.1)	18	0		1 (1.2)	1	0	
pT2	37 (27.0)	33	4		20 (23.5)	17	3	
pT3	75 (54.7)	62	13		60 (70.6)	51	9	
pT4	7 (5.2)	7	0		4 (4.7)	4	0	
pN status				0.486				0.863
pN0	44 (32.1)	40	4		0 (0.0)	0	0	
pN1	26 (19.0)	24	2		22 (25.9)	19	3	
pN2	25 (18.2)	20	5		23 (27.0)	19	4	
pN3	42 (30.7)	36	6		40 (47.1)	35	5	
pM status				0.344				0.470
pM0	119 (86.9)	103	16		72 (84.7)	61	11	
pM1	18 (13.1)	17	1		13 (15.3)	12	1	

Table 2

Table 2. Clinicopathological features of 10 cases with discordant HER2 results in surgical resection specimens and matched metastatic lymph nodes

Immunohistochemical results (intensity and extension of reactive cells)		Parameter							
Primary cancer (PC)	Lymph node (LN)	Gender	Age	pT	pN	Láuren (PC)	Láuren (LN)	Grade (PC)	Grade (LN)
3+ (strong, 30%)	0 (0%)	male	78	3	3b	mixed	intestinal	2	2
3+ (strong, 50%)	0 (0%)	male	60	3	2	intestinal	undetermined	3	3
2+ (moderate, 50%)	1+ (weak, 10%)	female	77	3	3b	mixed	mixed	3	2
3+ (strong, 40%)	0 (0%)	male	78	2	2	intestinal	intestinal	1	2
3+ (strong, 50%)	1+ (weak, 50%)	female	47	2	2	mixed	intestinal	3	2
0 (0%)	3+ (strong, 99%)	female	89	2	1	intestinal	intestinal	2	2
0 (0%)	2+ (moderate, 40%)	female	83	3	2	intestinal	intestinal	2	2
0 (0%)	2+ (moderate, 30%)	female	78	3	3a	mixed	mixed	3	3
1+ (weak, 10%)	2+ (moderate, 10%)	male	60	2	2	intestinal	intestinal	2	2
0 (0%)	2+ (moderate, 10%)	male	47	3	1	intestinal	intestinal	2	2

PC primary cancer, LN lymph node metastasis.

Table 3

Table 3. Association between clinicopathological characteristics and HER2 status in surgical resection specimens and paired lymph node metastases according to concordant and discordant results

Parameter		HER2 results		P value
		Concordant	Discordant	
		75 (88.2%)	10 (11.8%)	
Age at diagnosis	< 60 years	25	2	0.395
	≥ 60 years	50	8	
Gender	Female	33	5	0.720
	Male	42	5	
Tumor topography	Proximal stomach/GEJ	14	3	0.400
	Distal stomach	61	7	
Histological subtype	Diffuse	7	0	0.526
	Intestinal	33	6	
	Mixed	29	4	
	Undetermined	6	0	
Histological grade	Well differentiated	4	1	0.598
	Moderately differentiated	29	5	
	Poorly differentiated	42	4	
Lymphovascular invasion	Negative	4	1	0.556
	Positive	71	9	
Blood vessel invasion	Negative	41	6	0.750
	Positive	34	4	
pT status	pT1	1	0	0.541
	pT2	16	4	
	pT3	54	6	
	pT4	4	0	
pN status	pN1	20	2	0.217
	pN2	18	5	
	pN3	37	3	
pM status	pM0	62	10	0.153
	pM1	13	0	

Table 4**Table 4. Results from different studies considering HER2 concordance rates between primary resection specimens and synchronous lymph node metastases**

Study	Year	Number of patients	HER2 concordance rate (κ -value)	Positive conversion	Negative conversion
Kim, M [9]	2011	124	78.2% (NA)	15.3%	6.5%
Kochi M [15]	2013	102	86.3% (0.629)	7.8%	5.9%
Ieni A [16]	2014	108	90.7% (0.651)	3.7%	5.6%
Wei Q [14]	2014	29	93.0% (NA)	10.3%	3.4%
Selcukbiricik F [17]	2014	81	92.5% (NA)	6.2%	1.2%
Hednen C [18]	2016	70	87.1% (NA)	8.6%	4.3%
Laboissiere RS	2016	85	88.2% (0.515)	5.9%	5.9%

NA not available.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

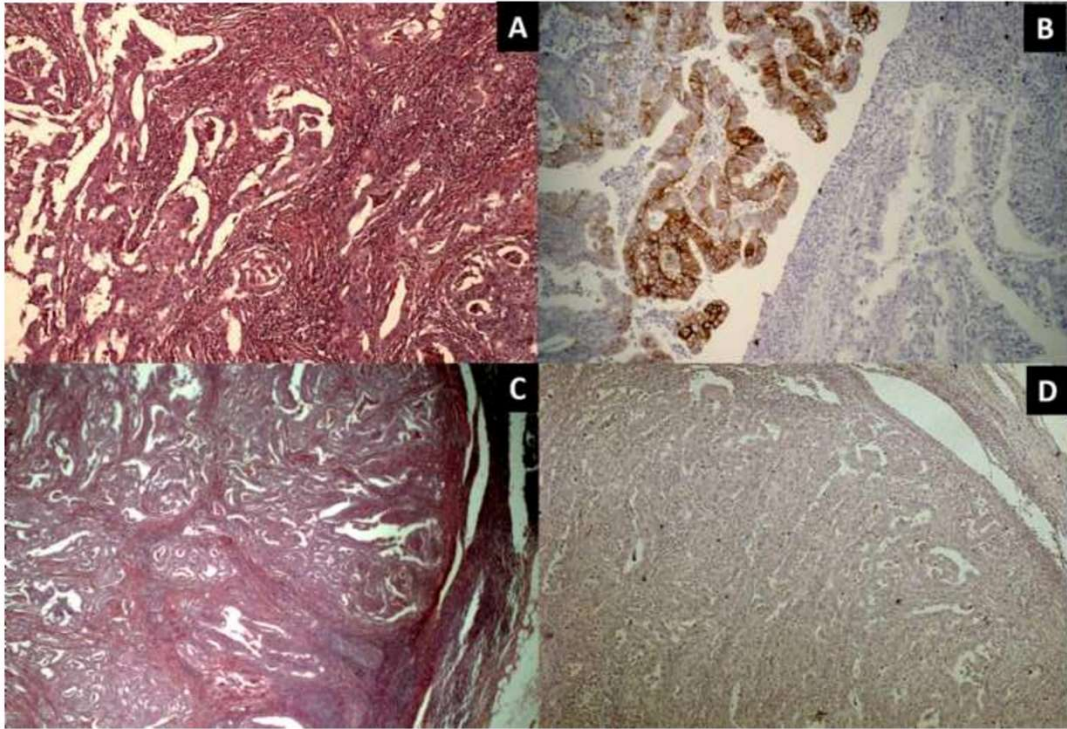
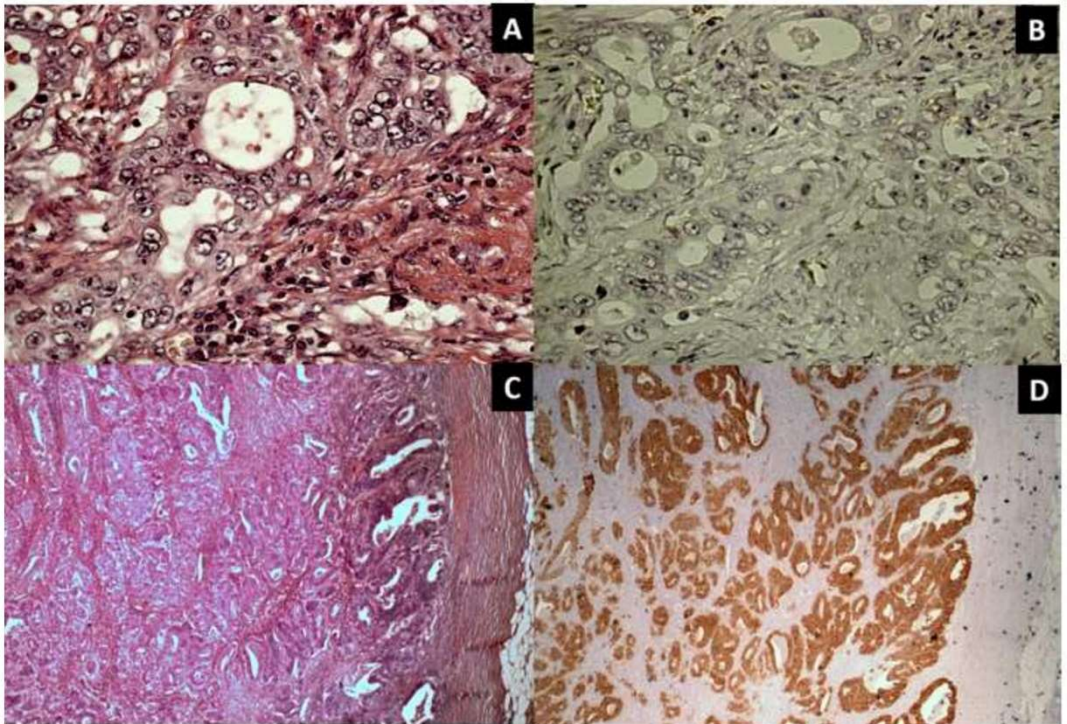


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



5. CONCLUSÕES

A superexpressão de HER2 por IHQ (casos 3+) no câncer gástrico dos pacientes incluídos neste estudo foi observada em 12/137 dos tumores primários (8,8%) e 5/85 das amostras de metástases linfonodais (5,8%), utilizando-se o anticorpo do kit HercepTest®. Com o anticorpo 4B5, verificou-se superexpressão de HER2 em 13/124 dos espécimes primários de CG (10,5%).

Não se identificou amplificação gênica por SISH em nenhum dos 10/124 casos de tumor primário que foram considerados equívocos (2+) por IHQ com o anticorpo 4B5.

Aplicando-se o fluxograma para a seleção de pacientes elegíveis ao tratamento com trastuzumabe, foram identificados 13/124 pacientes da nossa série (10,5%) com *status* HER2 positivo, que poderiam potencialmente se beneficiar com o uso de terapia anti-HER2 (tumores 3+ ou 2+ com amplificação por ISH).

Houve associação estatisticamente significativa entre positividade para HER2 e subtipo intestinal, baixo grau de diferenciação e presença de invasão linfática.

A taxa de concordância entre a superexpressão do HER2 por IHQ em amostras de tumor primário e metástases linfonodais pareadas foi de 88,2% (κ : 0,515), utilizando-se o anticorpo do kit HercepTest®.

Foi observada conversão positiva para a superexpressão de HER2 entre os tumores gástricos primários e metástases linfonodais correlatas em 5/85 dos casos (5,9%). A taxa de conversão negativa foi também de 5/85 casos (5,9%).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora de distribuição heterogênea entre diferentes regiões do globo, o câncer gástrico figura como a quinta neoplasia maligna mais diagnosticada no mundo, sendo a terceira mais letal (FERLAY et al., 2015). Entre os países com incidência elevada, inclui-se o Brasil, onde os diagnósticos são comumente realizados em fase tardia da doença, quando as opções de tratamento são restritas (INCA, 2016).

A indicação de uso de trastuzumabe em pacientes com CG metastático positivos para HER2 surgiu recentemente como uma nova opção terapêutica que tem se provado capaz de prolongar a sobrevida dos doentes (BANG et al., 2010). Neste cenário, destaca-se o papel do médico patologista, responsável por selecionar os pacientes elegíveis à terapia anti-HER2 por meio da execução e interpretação de testes para caracterização do *status* HER2 em amostras de câncer gástrico. Apesar da experiência acumulada nas últimas duas décadas com a aplicação clínica dessas estratégias terapêuticas em câncer de mama e detecção de tumores mamários positivos para HER2, descortinam-se novos desafios diante da realização dos testes em espécimes gástricos. Não há outro caminho a se trilhar na tentativa de superar esses desafios senão aquele proposto pela observação de evidências científicas a respeito da relação entre o câncer gástrico e o HER2.

Nesse sentido, nosso estudo está de acordo com outras observações reportadas na literatura, como, por exemplo, a maior positividade em tumores do tipo intestinal e bem diferenciados, além da heterogeneidade da expressão de HER2 comumente observada no câncer gástrico (LIANG et al., 2014; RÜSCHOFF et al., 2010). Da mesma forma, identificamos casos com *status* HER2 discordante entre amostras de tumor primário e metástases linfonodais pareadas, levantando questões sobre a potencial recomendação de testes em biópsias de sítios metastáticos, como observado também por outros autores (PENG et al., 2015).

Outras questões que frequentemente surgem na literatura mundial, como estudos que comparam a eficácia de diferentes anticorpos e metodologias de ISH para a detecção de HER2, infelizmente não puderam ser abordadas em nosso estudo devido à não disponibilidade de técnicas de ISH para aplicação em larga escala em nossas amostras (PARK et al., 2012). Mesmo que tenhamos empregado dois tipos de anticorpos primários anti-HER2 nos espécimes gástricos

e realizado o SISH nos casos de tumor primário equívoco (2+) por IHQ, acreditamos ser uma limitação do nosso trabalho não podermos ter submetido toda a casuística ou pelo menos grande parte dela a testes de ISH. Caso isso tivesse sido possível, em muito ganharíamos com a chance de podermos comparar a superexpressão de HER2 por IHQ com a amplificação gênica por ISH, além de obtermos valores de sensibilidade e especificidade dos testes com diferentes anticorpos anti-HER2 a partir do uso dos resultados de ISH como “padrão-ouro”.

Além disso, ainda que não haja consenso na literatura sobre o fato do *status* HER2 ser fator prognóstico no câncer gástrico, o difícil acesso a dados clínicos de sobrevida dos doentes envolvidos neste estudo impossibilitou a verificação dessa hipótese, o que também é uma limitação que deve ser apontada (JØRGENSEN et al., 2012).

À parte das questões comumente levantadas na literatura mundial sobre o HER2 no câncer gástrico, há que se discutir, contudo, as possíveis peculiaridades dessa relação no contexto de nosso país. Isso se mostra mais evidente quando observamos que há uma tendência, nos trabalhos envolvendo pacientes brasileiros, de haver menor frequência de positividade para HER2 se comparada a outras regiões do mundo, em semelhança aos valores determinados em nosso estudo (ABRAHÃO-MACHADO et al., 2013; BEGNAMI et al., 2011; DAMASCENO et al., 2014; LIANG et al., 2014). Levantamos a hipótese de isso se justificar em parte pelo fato de ser menos incidente o adenocarcinoma da junção esofagogástrica no Brasil, já que há indícios de que esses tumores expressam HER2 em proporção maior do que os carcinomas gástricos distais, mais comuns em nosso meio (BANG et al., 2010; CHO et al., 2013; MATSUSAKA et al., 2015; SHAN et al., 2013).

Diante da elevada frequência dessa neoplasia maligna no Brasil somada ao fato de ainda não se disponibilizar a terapia anti-HER2 aos pacientes com câncer gástrico atendidos pelo SUS, acreditamos que o conhecimento cada vez mais profundo sobre a relação entre HER2 e câncer gástrico em nosso meio possa, nesse sentido, servir de base à elaboração de novas estratégias terapêuticas e políticas públicas que otimizem o tratamento desses doentes no Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO-MACHADO, L. F. et al. HER2 in gastric cancer: comparative analysis of three different antibodies using whole-tissue sections and tissue microarrays. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 6438-6446, 2013.

AHMED, S.; SAMI, A.; XIANG, J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 22, n. 2, p. 101-116, 2015.

AIZAWA, M. et al. Evaluation of HER2-based biology in 1,006 cases of gastric cancer in a Japanese population. **Gastric Cancer**, v. 17, n. 1, p. 34-42, 2014.

BANG, Y. J. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 376, n. 9742, p. 687-697, 2010.

BEGNAMI, M. D. et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 22, p. 3030-3036, 2011.

BEGNAMI, M. D. et al. Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 279-286, 2005.

BOERS, J. E.; MEEUWISSEN, H.; METHORST, N. HER2 status in gastro-oesophageal adenocarcinomas assessed by two rabbit monoclonal antibodies (SP3 and 4B5) and two in situ hybridization methods (FISH and SISH). **Histopathology**, v. 58, n. 3, p. 383-394, 2011.

BOKU, N. Chemotherapy for metastatic gastric cancer in Japan. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 483-487, 2008.

BORRMANN, R. Geshwulste des Magens und Duodenums. In: HENKE, F. et al (Ed.). **Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie**. Berlin: Springer-Verlag, p. 865, 1926.

BOSMAN, F. T. et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. **World Health Organization classification of tumours**, Lyon Oxford: IARC Press, Oxford University Press, v. 3, 2010.

BOZZETTI C. et al. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma, **British Journal of Cancer**, v. 104, p. 1372–1376, 2011.

BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T. et al. Sobrevida em pacientes com câncer gástrico em Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 1611-1618, 2006.

CAMPOS, E. C. R. et al. Análise de fatores prognósticos no tratamento cirúrgico do câncer gástrico. **Revista do Médico Residente**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2012.

CAPPELLESSO, R. et al. HER2 status in gastroesophageal cancer: a tissue microarray study of 1040 cases. **Human Pathology**, v. 46, n. 665-672, 2015.

CARNEIRO, F. Classification of gastric carcinomas. **Current Diagnostic Pathology**, v. 4, n. 1, p. 51-59, 1997.

CHO, J. et al. A large cohort of consecutive patients confirmed frequent HER2 positivity in gastric carcinomas with advanced stages. **Annals of Surgical Oncology**, v. 20, p. 477-484, 2013.

CHO, E.Y. et al. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. **Pathology**, v. 44, n. 3, p. 216-220, 2012.

CHUA, T. C.; MERRETT, N. D. Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes - a systematic review, **International Journal of Cancer**, v. 130, p. 2845-2856, 2012.

CIRNE-LIMA, F. K. et al. Immunohistochemical expression of HER-2/NEU-CERBB-2 in patients with adenocarcinoma of the stomach. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 36, n. 2, p. 131-134, 2009.

COLEMAN, M. et al. Trends in cancer incidence and mortality. **IARC Scientific Publications**, v. 121, p. 1-806, 1993.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Research**, v. 52, n. 24, p. 6735-6740, 1992.

CORREA, P. et al. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet**, v. 2, n. 7924, p. 58-60, 1975.

CUNNINGHAM, D. et al. Upper Gastrointestinal Clinical Studies Group of the National Cancer Research Institute of the United Kingdom. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 1, p. 36-46, 2008.

DAMASCENO, E. A. et al. IMP3 expression in gastric cancer: association with clinicopathological features and HER2 status. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 12, p. 2163-2168, 2014.

DE CARLI, D. M. et al. Immunohistochemical expression of her2 in adenocarcinoma of the stomach. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, n. 2, p. 152-155, 2015.

EDGE, S. et al. (editores) **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, p. 117-126, 2010.

FAN, X. S. et al. Differences in HER2 over-expression between proximal and distal gastric cancers in the Chinese population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 3316-3323, 2013.

FENOGLIO-PREISER, C. et al. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. **Seminars in Oncology** [S.I.], v. 23, n. 3, p. 292-306, Jun 1996.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FORMAN, D.; BURLEY, V. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 20, n. 4, p. 633-649, 2006.

FUKUSHIGE, S. et al. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 3, p. 955-958, 1986.

GARCÍA-GARCÍA, E. et al. Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel

fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method. **Histopathology**, v. 59, n. 1, p. 8-17, 2011.

GENG, Y. et al. Human epidermal growth factor receptor-2 expression in primary and metastatic gastric cancer, Int. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, p. 303-311, 2014.

GOBBI, H.; ROCHA, R. M.; NUNES, C. B. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 127-136, 2008.

GONZÁLEZ, V. et al. Post-marketing safety of antineoplastic monoclonal antibodies: rituximab and trastuzumab. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 17, n. 7, p. 714-721, 2008.

GOUVÊA, A. P. et al. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 14, n. 1, p. 103-108, 2006.

GOUVÊA, A. P. et al. HER-2/neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the HercepTest™. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 1, p. 27-32, 2004.

GRAUS-PORTA, D. et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **EMBO Journal**, v. 16, n. 7, p. 1647-1655, 1997.

GRIN, A. et al. HER2 in situ hybridization in gastric and gastroesophageal adenocarcinoma: comparison of automated dual ISH to FISH. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 21, n. 6, p. 561-566, 2013.

GUMUSAY, O. et al. Discordances in HER2 status between primary gastric cancer and corresponding metastatic sites, **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 45, p. 416-421, 2015.

HOFMANN, M. et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. **Histopathology**, v. 52, n. 7, p. 797-805, 2008.

HUDIS, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 1, p. 39-51, 2007.

IENI, A. et al. Discordance rate of HER2 status in primary gastric carcinomas and synchronous lymph node metastases: a multicenter retrospective analysis, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22331–22341, 2014.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016-2017: Incidência de Câncer no Brasil**. Consulta em <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, p. 38-39, 2014.

JÁCOME, A. A. et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptors in gastric cancer: a survival analysis by Weibull model incorporating long-term survivors. **Gastric Cancer**, v. 17, p. 76-86, 2014.

JAPANESE GASTRIC CANCER ASSOCIATION. Japanese Classification of Gastric Carcinoma. 2nd English Edition. **Gastric Cancer**, v. 1, n. 1, p. 10-24, 1998.

JØRGENSEN, J. T.; HERSOM, M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature. **Journal of Cancer**, v. 3, p. 137-144, 2012.

JUNG, J. E.; IOSHII, S. O. Immunohistochemical assessment of HER2 expression in gastric cancer in a cohort of 118 Brazilian patients. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, p. 361-367, 2013.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 14, p. 2137-2150, 2006.

KIM, K. C. 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. **Annals of Surgical Oncology**, v. 18, p. 2833-2840, 2011.

KIYOSE, S. et al. Chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER2 gene amplification in breast and gastric cancer: comparison with immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). **Pathology International**, v. 62, n. 11, p. 728-734, 2012.

KOCHI, M. et al. Differing deregulation of HER2 in primary gastric cancer and synchronous related metastatic lymph nodes, **Diagnostic Pathology**, v. 8, p. 191, 2013.

LAURÉN, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 31-49, 1965.

LEMES, L. A. O. et al. Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 9, 2003.

LIANG, J. W. et al. Clinicopathological and prognostic significance of HER2 overexpression in gastric cancer: a meta-analysis of the literature, **Tumour Biology**, v. 35, p. 4849-4858, 2014.

LONG, X. Y. et al. Dual-color silver-enhanced in-situ hybridization and fluorescence in-situ hybridization for determination of HER2 gene status in gastric carcinoma. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 40, n. 5, p. 300-303, 2011.

MALENFANT, S. J.; ECKMANN, K. R.; BARNETT, C. M. Pertuzumab: a new targeted therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. **Pharmacotherapy**, v. 34, n. 1, p. 60-71, 2014.

MATSUSAKA, S. et al. Clinicopathological factors associated with HER2 status in gastric cancer: results from a prospective multicenter observational cohort study in a Japanese population (JFMC44-1101). **Gastric Cancer**, publicado on line ago 12, 2015.

MING, S. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. **Cancer**, v. 39, n. 6, p. 2475-2485, 1977.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6469-6487, 2007.

NEYT, M.; ALBRECHT, J.; COCQUYT, V. An economic evaluation of Herceptin in adjuvant setting: the Breast Cancer International Research Group 006 trial. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 3, p. 381-390, 2006.

NUNES, C. B. et al. False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 11, p. 946-950, 2013.

NUNES, C. B. et al. Comparative analysis of six different antibodies against Her2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridisation in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 8, p. 934-938, 2008.

NUNES, C. B. et al. Concordância interobservador na interpretação imunohistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em array de carcinomas mamários. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 365-371, 2007.

PALA, E. E. et al. HER2 status in gastric cancer: a comparison of two novel in situ hybridization methods (IQ FISH and dual color SISH) and two immunohistochemistry methods (A0485 and HercepTest™). **Pathology Research and Practice**, v. 209, n. 9, p. 548-554, 2013.

PARK, Y. S. et al. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use? **Human Pathology**, v. 43, n. 3, p. 413-422, 2012.

PENG, Z. et al. HER2 discordance between paired primary gastric cancer and metastasis: a meta-analysis, **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 27, p. 163-171, 2015.

POWER, D. G.; KELSEN, D. P.; SHAH, M. A. Advanced gastric cancer--slow but steady progress. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 5, p. 384-392, 2010.

ROSS, J. S. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. **Drug News & Perspectives**, v. 22, n. 2, p. 93-106, 2009.

ROSS, P. et al. Prospective randomized trial comparing mitomycin, cisplatin, and protracted venous-infusion fluorouracil (PVI 5-FU) With epirubicin, cisplatin, and PVI 5-FU in advanced esophagogastric cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 8, p. 1996-2004, 2002.

RÜSCHOFF, J. et al., HER2 testing in gastric cancer: a practical approach, **Modern Pathology**, v. 25, p. 637-650, 2012.

RÜSCHOFF, J. et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. **Virchows Archive**, v. 457, n. 3, p. 299-307, 2010.

RUTEGÅRD, M. et al. Oesophageal adenocarcinoma: the new epidemic in men? **Maturitas**, v. 69, n. 3, p. 244-248, 2011.

SAKAI, K et al. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 77, n. 5, p. 1047-1052, 1986.

SHAH, S.; CHEN, B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. **Pathology Research International**, v. 2011, n. 903202. 2010.

SHAN, L.; YING, J.; LU, N. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. **Diagnostic Pathology**, v. 8, n. 76. 2013.

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, p. 177-182, 1987.

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. (editores) **TNM classification of malignant tumours**. 7th ed. Nova Iorque: Wiley-Blackwell, p. 73-78, 2009.

TZAHAR, E. et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 10, p. 5276-5287, 1996.

VAN CUTSEM, E. et al. HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. **Gastric Cancer**, v. 18, n. 3, p. 476-484, 2015.

VAN CUTSEM, E. et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 31, p. 4991-4997, 2006.

WAGNER, A. D. et al. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18, p. 2903-2909, 2006.

WOLFF, A. C. et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, 2013.

YAN, B. et al. A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 9, p. 839-842, 2010.

ZILBERSTEIN, B. et al. Brazilian Association of Gastric Cancer. Brazilian consensus in gastric cancer: guidelines for gastric cancer in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 26, n. 1, p. 2-6, 2013.

8. ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO DE ANÁLISE DE PEÇAS CIRÚRGICAS DE CARCINOMA GÁSTRICO UTILIZADO NO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM PATOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL

Carcinomas do estômago

nº do exame _____

Procedimento cirúrgico: ☐ gastrectomia total ☐ antrectomia
☐ gastrectomia subtotal ☐ coto gástrico
☐ quase total ☐ com _____ (outro órgão)

Exame macroscópico

Peça cirúrgica

Dimensões: pequena curvatura _____ cm; grande curvatura _____ cm;
 Duodeno: ☐ ausente ☐ presente _____ cm; ☐ não comprometido ☐ comprometido _____ cm
 Esôfago: ☐ ausente ☐ presente _____ cm; ☐ não comprometido ☐ comprometido _____ cm
 Jejuno: ☐ ausente ☐ presente _____ cm; ☐ não comprometido ☐ comprometido _____ cm
 Epíplon: ☐ ausente ☐ presente _____ cm; ☐ não comprometido ☐ comprometido _____ cm

Tumor

Dimensões: _____ x _____ x _____ cm (LxTxP)
 Localização: ☐ 1/3 distal ☐ 1/3 médio ☐ 1/3 proximal ☐ peq. curvatura ☐ gr. curvatura
☐ parede anterior ☐ parede posterior ☐ circunferencial

Aspecto macroscópico (classificação):

Tipo ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV de Borrmann
☐ I ☐ IIA ☐ IIB ☐ IIC ☐ III (SJED- p/ neoplasia precoce)

Infiltração da parede gástrica até a:

☐ mucosa ☐ submucosa ☐ muscular própria ☐ subserosa ☐ serosa

Margens de ressecção:

Proximal ☐ livre (_____ cm) ☐ envolvida
 Distal ☐ livre (_____ cm) ☐ envolvida

Mucosa gástrica: adjacente à lesão _____;
 restante _____

Outros tecidos/órgãos: _____

Exame microscópico

Classificação histológica da neoplasia

OMS ☐ adenocarcinoma SOE ☐ adenocarcinoma papilar ☐ adenocarcinoma tubular
☐ carcinoma mucinoso (colóide: > 50% do tumor) ☐ ca células anel de sinete
☐ ca adenoescamoso ☐ ca células escamosas ☐ ca indiferenciado ☐ ca pequenas células
 Laurén tipo ☐ intestinal ☐ difuso ☐ não classificável (misto) ☐ não classificável
 Ming tipo ☐ infiltrativo ☐ expansivo

Invasão vascular: sanguínea ☐ presente ☐ ausente ☐ não avaliável
 linfática ☐ presente ☐ ausente ☐ não avaliável
 Invasão perineural: ☐ presente ☐ ausente ☐ não avaliável

Invasão da parede gástrica (pT): ☐ tumor restrito à mucosa – pT1a
☐ invasão até a submucosa – pT1b
☐ invasão até a muscular própria – pT2a
☐ invasão até a subserosa – pT2b
☐ penetração da serosa (peritônio visceral) – pT3
☐ invasão direta de
 (órgãos/estruturas adjacentes) – pT4

Invasão do duodeno ☐ não ☐ sim _____ cm; esôfago ☐ não ☐ sim _____ cm

Margens de ressecção: proximal _____ cm; distal _____ cm

Linfonodos:

pequena curvatura: _____ dissecados; _____ com metástases

grande curvatura: _____ dissecados; _____ com metástases

em correspondência c/ _____ (tronco vascular): _____ dissecados; _____ com metástases

Estadiamento (UICC- pN): ☐ pNx (não avaliável)
☐ pN0 – não se observam metástases em linfonodos regionais
☐ pN1 – metástases em linfonodos perigástricos (1- 6)
☐ pN2 – metástases em linfonodos perigástricos (7-15 ou mais)
☐ pN3 – metástases em linfonodos perigástricos (> 15)

Estômago não neoplásico:

Estadiamento patológico (UICC): ☐ pT ☐ pN ☐ pM ☐ estágio

Outros tecidos/órgãos: _____

Conclusão:

ANEXO B - PROTOCOLO PARA ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO COM O KIT HERCEPTEST®

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO

Considerações iniciais: Todos os reagentes devem ser equilibrados em temperatura ambiente (20–25°C) antes da imunocoloração. Da mesma forma, todas as incubações devem ser feitas em temperatura ambiente. Não permitir que as secções de tecido sequem durante o procedimento de coloração.

Desparafinização e reidratação: Antes da coloração, as lâminas de tecido devem ser desparafinizadas, de forma a remover o meio de impregnação, e reidratadas. Remover totalmente a parafina. A presença de resíduos de meio de impregnação aumentará a coloração não específica. Esta etapa deve ser realizada à temperatura ambiente.

Etapa 1: Recuperação do epítipo

Colocar os frascos de coloração contendo a solução de recuperação do epítipo num tanque de imersão. Aquecer o banho de água e a solução de recuperação de epítipo a 95–99°C. Após o aquecimento a Epitope Retrieval Solution adquire um aspecto turvo. Cobrir os frascos com tampas para estabilizar a temperatura e evitar a evaporação. Imergir as secções desparafinizadas em temperatura ambiente na solução de recuperação de epítipo pré-aquecida nos frascos de coloração.

Incubar por 40 (± 1) minutos a 95–99°C. Retirar completamente da água o frasco contendo as lâminas. Permitir o resfriamento das lamelas na solução de recuperação do epítipo por 20 (± 1) minutos em temperatura ambiente. Decantar a solução de recuperação do epítipo e enxaguar as secções com o tampão de lavagem diluído. Para obter o desempenho ideal, mergulhar as secções em tampão de lavagem por 5–20 minutos depois da recuperação do epítipo e antes da coloração.

Etapa 2: Reagente de bloqueio da peroxidase

Remover o tampão excedente com ligeiras pancadas. Utilizar um tecido liso, limpar cuidadosamente ao redor da amostra para remover qualquer líquido ali depositado e para manter os reagentes dentro da área prescrita. Contornar a secção do tecido com uma Caneta Dako. Aplicar 3 gotas (100 μ L) de reagente de bloqueio de peroxidase para cobrir as amostras. Incubar a 5 (± 1) minutos. Lavar suavemente com água destilada e colocar num banho tamponado fresco.

Etapa 3: Anticorpo primário ou reagente de controlo negativo

Retirar o excesso de tampão e limpar as lamelas conforme descrito anteriormente. Cobrir as amostras com 3 gotas (100 μ L) de proteína anti-HER2. Incubar a 30 ($\pm$ 1) minutos. Lavar suavemente com tampão de lavagem e colocar num banho tamponado fresco.

Etapa 4: Reagente de visualização

Retirar o excesso de tampão e limpar as lamelas conforme descrito anteriormente. Cobrir as amostras com 3 gotas (100 μ L) de reagente de visualização. Incubar durante 30 ($\pm$ 1) minutos. Lavar as lamelas conforme descrito na etapa 3.

Etapa 5: Solução de substrato-cromogénio (DAB)

Limpar as lamelas conforme descrito anteriormente. Cobrir as amostras com 3 gotas (100 μ L) de solução de substrato-cromogénio (DAB). Incubar durante 10 ($\pm$ 1) minutos. Lavar suavemente com água destilada. Recolher os restos da solução de substrato-cromógeno (DAB) num contentor de materiais perigosos para a eliminação adequada dos mesmos.

Etapa 6: Contra-coloração com a hematoxilina

Imergir as lamelas num tanque com hematoxilina. Incubar por 2–5 minutos dependendo da concentração da hematoxilina utilizada. Lavar suavemente no tanque de imersão com água destilada. Assegurar que toda a hematoxilina residual seja limpa.

Etapa 7: Montagem

É recomendado um meio de montagem não aquoso e permanente.

ANEXO C – COMPROVANTE DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO

View Letter

Close

Date: 21 Oct 2015
To: "Renato Santos Laboissiere" renatoslab@gmail.com
From: "BMC Gastroenterology - Editorial Office" bmcgastroenterol@biomedcentral.com
Subject: Decision on your Submission to BMC Gastroenterology - BMGE-D-15-00063R3

BMGE-D-15-00063R3

Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: a retrospective study using whole-tissue sections

Renato Santos Laboissiere, M.D.; Marcelo Araújo Buzelin; Débora Balabram, M.D., PhD; Marina De Brot, M.D., PhD; Cristiana Buzelin Nunes, M.D., PhD; Rafael Malagoli Rocha, PhD; Mônica Maria Demas Álvares Cabral, M.D., PhD; Helenice Gobbi, M.D., PhD

BMC Gastroenterology

Dear Mr. Santos Laboissiere,

I am pleased to inform you that your manuscript "Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: a retrospective study using whole-tissue sections" (BMGE-D-15-00063R3) has been accepted for publication in BMC Gastroenterology.

Before publication, our production team will check the format of your manuscript to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will be in touch shortly to request any necessary changes, or to confirm that none are needed.

Any final comments from our reviewers or editors can be found below and our production department will be in contact with you shortly.

Please do not hesitate to contact us if you have any questions regarding your manuscript and I hope that you will consider BMC Gastroenterology again in the future.

Best wishes,

Ines Lopes de Sousa
 BMC Gastroenterology
<http://www.biomedcentral.com/bmcgastroenterol/>

Comments:

--

Please also take a moment to check our website at
 for any additional comments that were saved as attachments. Please note that as BMC
 Gastroenterology has a policy of open peer review, you will be able to see the names of the
 reviewers.

Close

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO



Renato Laboissiere <renatoslab@gmail.com>

Submission Confirmation

1 mensagem

Bernd Wuesthoff <bernd.wuesthoff@medizin.uni-magdeburg.de>
Para: renatoslab@gmail.com

28 de janeiro de 2016 16:05

Article type: Full Length Article

Dear Prof. Renato Santos Laboissiere,

We have received your article "A parallel between HER2 protein expression in primary gastric carcinoma and corresponding synchronous lymph node metastases" for consideration for publication in Pathology - Research and Practice.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/prp/>

2. Enter these login details:

Your username is: renatoslab@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PRP/automail_query.asp.

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Pathology - Research and Practice

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO E – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 32898114.9.0000.5149

**Interessado(a): Prof^a. Helenice Gobbi
Departamento de Anatomia Patológica e Medicina
Legal
Faculdade de Medicina- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação do HER2 em câncer gástrico: correlação entre expressão proteica, amplificação gênica e características clínico-patogênicas"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

**Prof^a. Dr^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO F – ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	UFMG 
---	---	--

ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DO ALUNO

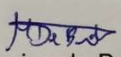
RENATO SANTOS LABOISSIÈRE

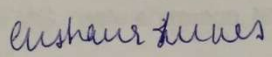
Realizou-se, no dia 07 de julho de 2014, às 14:00 horas, Sala 340, Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a apresentação do exame de qualificação do aluno **RENATO SANTOS LABOISSIÈRE**, número de registro 2012652209, intitulado *Avaliação do HER2 em câncer gástrico: correlação entre expressão protéica, amplificação gênica e características clinicopatológicas*, perante a Comissão Examinadora composta pelos professores: Prof(a). Marina de Brot Andrade (UFMG), Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (UFMG). Terminada a apresentação, foi considerado:

(X) aprovado () reprovado

e, para constar, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 07 de julho de 2014.


Prof(a). Marina de Brot Andrade (Doutora)


Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (Doutora)

ANEXO G – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DA TESE

Artigo completo publicado em periódico

LABOISSIERE, R.S.; BUZELIN, M.A.; BALABRAM, D.; DE BROT, M.; NUNES, C.B.; ROCHA, R.M.; CABRAL, M.M.D.A.; GOBBI, H. Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: a retrospective study using whole-tissue sections. *BMC Gastroenterology* (Online), v. 15, p. 157, 2015.

Artigo completo submetido a periódico

LABOISSIERE, R.S.; BUZELIN, M.A.; BALABRAM, D.; CABRAL, M.M.D.A.; GOBBI, H. A parallel between HER2 protein expression in primary gastric carcinoma and corresponding synchronous lymph node metastases. *Pathology Research and Practice*, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **LABOISSIÈRE, R.S.**, BUZELIN, M. A., BALABRAM, DÉBORA, DE BROT, MARINA, NUNES, CRISTIANA BUZELIN, ROCHA, RAFAEL MALAGOLI, CABRAL, M. M. D. A., GOBBI, H. Association between HER2 Status in Gastric Cancer and Clinicopathological Features: A Retrospective Study Using Whole-Tissue Sections In: United States & Canadian Academy of Pathology 105th Annual Meeting, 2016, Seattle. United States & Canadian Academy of Pathology 105th Annual Meeting Abstracts. *Modern Pathology*, 2016. v.26. p.180A.
2. **LABOISSIÈRE, R.S.**; BUZELIN, M.A.; CABRAL, M.M.D.A.; GOBBI, H. HER2 status in gastric cancer: a parallel between clinical data, pathological analysis and immunohistochemical profile in a brazilian cohort of patients. In: XXIX Congresso Brasileiro de Patologia, 2013, Florianópolis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial - Suplementos Patologia*, 2013. v. 49.
3. **LABOISSIÈRE, R.S.**; BUZELIN, M. A.; CABRAL, M. M. D. A.; GOBBI, H. Immunohistochemical analysis of 129 cases of gastric cancer surgically resected in a University Hospital: HER2 protein expression. In: XVI Pathology Meeting, VI International Meeting of Investigative Pathology, 2013, São Paulo. *Applied Cancer Research* (Impresso), 2013. v. 33. p. 44.

4. **LABOISSIÈRE, R.S.**; CABRAL, M. M. D. A.; GOBBI, H. Clinical and pathological analysis of 140 consecutive cases of gastric cancer surgically resected in a university hospital. In: XV Pathology Meeting, V International Meeting of Investigative Pathology, 2012, São Paulo. Applied Cancer Research (Impresso), 2012. v. 32. p. 43.

Trabalho selecionado para apresentação oral

LABOISSIÈRE, R.S.; BUZELIN, M. A.; CABRAL, M. M. D. A.; GOBBI, H. HER2 status in gastric cancer: a parallel between clinical data, pathological analysis and immunohistochemical profile in a brazilian cohort of patients. 2013.

(Trabalho premiado entre os 10 melhores trabalhos selecionados para apresentação oral)

Prêmio SBP - 10 melhores trabalhos apresentados XXIX Congresso Brasileiro de Patologia - sessão de apresentação oral/tema livre, Sociedade Brasileira de Patologia. 2013.

Participação em eventos

1. USCAP Meeting 2016 – Congresso da Academia de Patologia dos Estados Unidos e Canadá (a ser realizado em março 2016). Trabalho aceito como apresentação de pôster.
2. IV Encontro de Pós-Graduação em Patologia da UFMG. Mesa-redonda: Problematicando nossa Pós-Graduação. 2014.
3. XXIX Congresso Brasileiro de Patologia. 2013. Apresentação oral.
4. VI Encontro Internacional de Patologia Investigativa do A.C. Camargo Cancer Center. 2013. Apresentação de pôster.
5. XVI Jornada de Patologia do Hospital A.C. Camargo. 2013.
6. V Encontro Internacional de Patologia Investigativa. 2012. Apresentação de pôster.
7. XV Jornada de Patologia do Hospital A.C. Camargo. 2012.
8. III Encontro de Pós-Graduação em Patologia da UFMG. 2012. Apresentação de pôster.